



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

FACOLTA' DI FARMACIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXIV

**SINTESI E STUDIO DI SISTEMI
POLIETEROCICLICI A POTENZIALE ATTIVITÀ
BIOLOGICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.mo Prof. Adriana Chilin

Dottoranda: Francesca Tonus

INDICE

1. RIASSUNTO	pag.1
2. ABSTRACT	pag.3
3. INTRODUZIONE	pag.5
3.1. ANGIOGENESI	pag.6
3.1.1. ANGIOGENESI TUMORALE	pag.9
3.2. PROTEINCHINASI	pag.10
3.2.1. TIROSINCHINASI	pag.11
a) Tirosinchinasi recettoriali	pag.11
EGFR	pag.13
VEGFR-2	pag.14
FGFR-2	pag.15
PDGFR	pag.16
b) Tirosinchinasi citoplasmatiche	pag.17
Src	pag.18
Abl	pag.19
3.3. TIROSINCHINASI E CANCRO	pag.20
3.4. INIBITORI TIROSINCHINASICI	pag.22
3.4.1. ANTICORPI MONOCLONALI	pag.23
3.4.2. INIBITORI TIROSINCHINASICI ATP-MIMETICI	pag.23
3.5. RESISTENZA AGLI INIBITORI TIROSINCHINASICI ATP-MIMETICI	pag.28

4. OBIETTIVO	pag.31
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag.33
5.1. SINTESI DEI SOSTITUENTI IN POSIZIONE 4	pag.35
5.1.1. SINTESI DI 3-IDROSSIBIFENILE	pag.35
5.1.2. SINTESI DI DERIVATI <i>m</i> -ETEROARILANILINICI.....	pag.36
5.1.3. SINTESI DI DERIVATI 2-AMMINO-4-ARIL-PIRIMIDINICI	pag.40
5.2. SINTESI DI VANDETANIB	pag.42
5.3. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINAMMINICI	pag.45
5.3.1. SINTESI DI DERIVATI 5,6-DI(2'-METOSSIE- ETOSSI)CHINAZOLINILAMMINICI	pag.45
5.3.2. SINTESI DI DERIVATI 7-METOSSIE-6-(3'- <i>N</i> - MORFOLINO)PROPOSSICHINAZOLINILAMMINICI.....	pag.47
5.3.3. SINTESI DI DERIVATI 6,7-DIMETOSSIE- CHINAZOLINILAMMINICI	pag.49
5.3.4. SINTESI DI DERIVATI DIIDRODIOSINOCHINAZOLINIL AMMINICI.....	pag.50
5.3.5. SINTESI DI DERIVATI 6-METOSSIE-7-ALLIL- OSSICHINAZOLIN-4-AMMINICI.....	pag.52
5.3.6. SINTESI DI (6-ALLILOSSI-7-METOSSICHINAZOLIN-4-IL)- (3-BIFENIL)AMMINA CLORIDRATO.....	pag.54
5.4. SINTESI DI DERIVATI BIFENILOSSICHINAZOLINICI	pag.55
5.5. VALUTAZIONE BIOLOGICA	pag.64
5.5.1. VALUTAZIONE <i>IN VITRO</i> DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA	pag.64
a) Effetti sulla proliferazione cellulare: cellule A431	pag.65
b) Valutazione della percentuale di cellule AnnV ⁺ , PI ⁺	pag.68
c) Reversibilità degli effetti antiproliferativi	pag.70
d) Effetti sulla proliferazione cellulare: cellule NIH3T3....	pag.71

e) Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da EGF esogeno.....	pag.73
5.5.2. EFFETTI SULL'ATTIVITÀ TIROSINCHINASICA	pag.74
a) Saggio di immunoprecipitazione e Western Blott.....	pag.74
b) Saggio di inibizione della fosforilazione di un substrato.....	pag.75
5.5.3. VALUTAZIONE <i>IN VITRO</i> DELL'ATTIVITÀ ANTIANGIOGENICA.....	pag.76
a) Effetti sulla proliferazione cellulare: HUVEC	pag.76
b) Reversibilità degli effetti antiproliferativi.....	pag.78
c) Effetti sulla migrazione cellulare	pag.78
d) Morfogenesi su Matrigel	pag.78
e) Effetti sulla morfogenesi indotta da citochine esogene	pag.81
FGF-2.....	pag.81
VEGF.....	pag.83
5.5.4. VALUTAZIONE <i>IN VIVO</i> DEI COMPOSTI.....	pag.85
5.5.5. VALUTAZIONE ATTIVITÀ MULTI-INIBITORIA	pag.86
6. CONCLUSIONI	pag.89
7. PARTE SPERIMENTALE	pag.93
7.1. MATERIALI	pag.93
7.2. STRUMENTAZIONE	pag.93
7.3. METODI DI SINTESI	pag.95
7.3.1. SINTESI DI SINTONI AMMINO E IDROSSIBIARILICI.....	pag.95
7.3.2. SINTESI DI 4-METOSSI-3-IL-[(1'-METILPIPERIDIN-4'- IL)METOSSI]NITROBENZENE	pag.107
7.3.3. SINTESI DI 3,4-DI(2'-METOSSIETOSSI)NITROBENZENE	pag.110

7.3.4. SINTESI DI 3-METOSSI-4-(3'-N-MORFOLINO)PROPOSSI NITROBENZENE	pag.112
7.3.5. SINTESI DI DERIVATI ALLILOSSIMETOSSINITRO BENZENICI.....	pag.114
7.3.6. SINTESI DEI PRECURSORI ANILINICI DI NUCLEI CHINAZOLINICI	pag.116
7.3.7. SINTESI DI ETIL CARBAMMATI DI DERIVATI ANILINICI	pag.120
7.3.8. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINICI.....	pag.124
7.3.9. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINONICI.....	pag.128
7.3.10. SINTESI DI DERIVATI CLOROCHINAZOLINICI.....	pag.134
7.3.11. SINTESI DI DERIVATI ARILAMMINOCHINAZOLINICI	pag.139
7.3.12. SINTESI DI DERIVATI BIFENILOSSICHINAZOLINICI	pag.159
7.4. METODI DI VALUTAZIONE BIOLOGICA.....	pag.163
7.4.1. COLTURE CELLULARI.....	pag.163
7.4.2. DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE	pag.164
7.4.3. VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI CELLULE ANN V ⁺ ,PI ⁺	pag.166
7.4.4. REVERSIBILITA' DEGLI EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI.....	pag.167
7.4.5. EFFETTI SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE INDOTTA DA EGF ESOGENO.....	pag.168
a) Incubazione con i composti, rimozione e aggiunta di EGF esogeno.....	pag.168
b) Incubazione contemporanea con i composti ed EGF esogeno.....	pag.168
7.4.6. EFFETTI SULL'ATTIVITA' TIROSINCHINASICA	pag.169
a) Valutazione dell'attività tirosinchinasica <i>in vitro</i>	pag.169
b) Determinazione della fosforilazione di EGFR da lisato cellulare	pag.170
7.4.7. MIGRAZIONE CELLULARE	pag.172

7.4.8. MORFOGENESI <i>IN VITRO</i>	pag.173
a) Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i>	pag.174
b) Effetti sulla morfogenesi <i>in vitro</i> indotta da citochine esogene	pag.175
7.4.9. SAGGIO <i>IN VIVO</i> CON <i>PLUG</i> DI MATRIGEL.....	pag.176
a) Impianto dei <i>plug</i> di matrigel	pag.177
b) Determinazione del contenuto di emoglobina.....	pag.177
8. BIBLIOGRAFIA	pag.179

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.	<i>Struttura generale dei lead compounds: n=1, composto 1; n=2, composto 2; n=3, composto 3.....</i>	<i>pag.1</i>
Figura 2.	<i>Bilanciamento tra attivatori e inibitori dell'angiogenesi.....</i>	<i>pag.8</i>
Figura 3.	<i>Schema che illustra come la sovra-espressione di VEGFR e VEGF stimoli l'angiogenesi patologica.</i>	<i>pag.9</i>
Figura 4.	<i>Rappresentazione schematica dell'attivazione di una RTK.....</i>	<i>pag.12</i>
Figura 5.	<i>Struttura schematica di EGFR in equilibrio tra due conformazioni. L'interazione con il fattore di crescita induce un cambiamento conformazionale e la successiva dimerizzazione.....</i>	<i>pag.13</i>
Figura 6.	<i>Coinvolgimento di VEGF in vari processi fisiologici.....</i>	<i>pag.15</i>
Figura 7.	<i>Organizzazione dei domini nelle maggiori famiglie di NRTK.....</i>	<i>pag.17</i>
Figura 8.	<i>Rappresentazione schematica del cambiamento conformazionale indotto dopo la fosforilazione e attivazione di Src.....</i>	<i>pag.19</i>
Figura 9.	<i>Rappresentazione schematica del cambiamento conformazionale indotto dopo la fosforilazione e attivazione di c-Abl.....</i>	<i>pag.20</i>
Figura 10.	<i>Rappresentazione schematica del sito catalitico delle tirosinchinasi.....</i>	<i>pag.24</i>
Figura 11.	<i>a) struttura generale di una 4-anilinochinazolina; b) struttura di PD153035.....</i>	<i>pag.25</i>
Figura 12.	<i>Interazione di Erlotinib con EGFR.....</i>	<i>pag.25</i>
Figura 13.	<i>Relazioni struttura-attività di 4-anilinochinazoline.....</i>	<i>pag.26</i>
Figura 14.	<i>Strutture a scaffold pirimidinico.....</i>	<i>pag.26</i>
Figura 15.	<i>Strutture di inibitori irreversibili in fasi cliniche:Canertinib, Afatinib e Neratinib.....</i>	<i>pag.29</i>
Figura 16.	<i>Strutture di alcuni inibitori multi-target approvati.....</i>	<i>pag.30</i>
Figura 17.	<i>Struttura del composto 2.....</i>	<i>pag.31</i>
Figura 18.	<i>Strutture e IC₅₀ dei lead compounds studiati in parte in un lavoro precedente.....</i>	<i>pag.33</i>

Figura 19.	Struttura generale dei composti della classe 1.	pag.34
Figura 20.	Struttura generale dei composti della classe 2.	pag.34
Figura 21.	Struttura generale dei composti della classe 3.	pag.34
Figura 22.	Struttura generale dei composti della classe 4.	pag.34
Figura 23.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di {6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolin-4-il}-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato (Vandetanib).....	pag.56
Figura 24.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina (41a).	pag.56
Figura 25.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina (41b).	pag.56
Figura 26.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina (50a).	pag.57
Figura 27.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina.	pag.57
Figura 28.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina (55a).	pag.57
Figura 29.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina (55b).	pag.58
Figura 30.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina cloridrato (61b).	pag.58
Figura 31.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(furan-2''-il)fenil]ammina cloridrato (61c).	pag.58
Figura 32.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(piridin-2''-il)fenil]ammina cloridrato (61d).	pag.59
Figura 33.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(pirrol-2''-il)fenil]ammina cloridrato (61e).	pag.59
Figura 34.	Spettro 1H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-(4'-fenilpirimidin-2'-il)ammina (61f).	pag.59

Figura 35.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-(4'-(piridin-3''-il)pirimidin-2'-il)ammina (61g).	pag.60
Figura 36.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina (69a).	pag.60
Figura 37.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-bromofenil)ammina (69h).	pag.60
Figura 38.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-trifluorometilfenil)ammina (69i).	pag.61
Figura 39.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-metilfenil)ammina (69j).	pag.61
Figura 40.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(4-bromo-2-fluoro-fenil)ammina (69k).	pag.61
Figura 41.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-allilossi-7-metossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)-ammina cloridrato(75).	pag.62
Figura 42.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [(6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere (76).	pag.62
Figura 43.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere.....	pag.62
Figura 44.	Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)etere (78).	pag.63
Figura 45.	Strutture dei composti utilizzati come riferimento nei saggi condotti.....	pag.65
Figura 46.	Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431.	pag.67
Figura 47.	Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulle cellule A431. Analisi Annessina V e Propidio Ioduro al citofluorimetro.	pag.69
Figura 48.	Reversibilità dell'effetto antiproliferativo dei derivati 4-amminochinazolinici sulle A431..	pag.70
Figura 49.	Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431 e NIH3T3.....	pag.72
Figura 50.	Effetti sulla stimolazione della crescita cellulare indotta da EGF esogeno..	pag.74
Figura 51.	Immagine ottenuta dopo immunoprecipitazione di EGFR da lisato cellulare (A431) e analisi Western Blott.....	pag.75

Figura 52.	<i>Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione delle HUVEC.....</i>	<i>pag.77</i>
Figura 53.	<i>Reversibilità dell'effetto antiproliferativo dei derivati 4-amminochinazolinici sulle HUVEC.</i>	<i>pag.78</i>
Figura 54.	<i>Effetti sulla migrazione cellulare.</i>	<i>pag.79</i>
Figura 55.	<i>Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi.....</i>	<i>pag.81</i>
Figura 56.	<i>Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 50 ng/mL di FGF-2 e i derivati 4-amminochinazolinici in concentrazione 0.1 μM.....</i>	<i>pag.82</i>
Figura 57.	<i>HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate (B) per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2.....</i>	<i>pag.82</i>
Figura 58.	<i>Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0.1 μM e 50 ng/mL di FGF-2.</i>	<i>pag.83</i>
Figura 59.	<i>Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 20 ng/mL di VEGF e i derivati 4-amminochinazolinici in concentrazione 0.1 μM.....</i>	<i>pag.84</i>
Figura 60.	<i>HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF (B). (C)Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF.....</i>	<i>pag.84</i>
Figura 61.	<i>Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0.1 μM e 20 ng/mL di VEGF.</i>	<i>pag.85</i>
Figura 62.	<i>Determinazione della concentrazione di emoglobina presente nei plug di Matrigel.</i>	<i>pag.86</i>

INDICE DEGLI SCHEMI

Schema 1.	<i>Strategia generale di sintesi per l'ottenimento dei composti progettati.....</i>	<i>pag.35</i>
Schema 2.	<i>Sintesi di 3-idrossibifenile.</i>	<i>pag.35</i>
Schema 3.	<i>Sintesi di derivati m-eteroarilanilini.</i>	<i>pag.36</i>
Schema 4.	<i>Meccanismo radicalico proposto per la reazione di copulazione.</i>	<i>pag.37</i>
Schema 5.	<i>Sintesi di 3-(pirrol-2'-il)anilina.</i>	<i>pag.38</i>
Schema 6.	<i>Meccanismo della reazione di Suzuki.</i>	<i>pag.39</i>
Schema 7.	<i>Sintesi di derivati 2-ammino-4-arilpirimidinici.</i>	<i>pag.40</i>
Schema 8.	<i>Sintesi di 2-ammino-4-fenilpirimidina. Meccanismo di reazione del primo step.</i>	<i>pag.40</i>
Schema 9.	<i>Sintesi di 2-ammino-4-fenilpirimidina. Meccanismo di reazione del secondo step.</i>	<i>pag.41</i>
Schema 10.	<i>Sintesi di Vandetanib.....</i>	<i>pag.42</i>
Schema 11.	<i>Metodica per la sintesi di nuclei chinazolinici.....</i>	<i>pag.43</i>
Schema 12.	<i>Meccanismo di ossidazione del nucleo chinazolinico.</i>	<i>pag.43</i>
Schema 13.	<i>Sintesi di derivati 5,6-di(2'-metossietossi)chinazolinilamminici.</i>	<i>pag.45</i>
Schema 14.	<i>Sintesi di derivati 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolinilamminici.</i>	<i>pag.47</i>
Schema 15.	<i>Sintesi di derivati 6,7-dimetossichinazolinilamminici.</i>	<i>pag.49</i>
Schema 16.	<i>Sintesi di derivati diidrodiossinochinazolinilamminici.</i>	<i>pag.50</i>
Schema 17.	<i>Sintesi di derivati 6-metossi-7-allilossichinazolamminici.....</i>	<i>pag.52</i>
Schema 18.	<i>Sintesi di derivati 6-allilossi-7-metossichinazolamminici.....</i>	<i>pag.54</i>
Schema 19.	<i>Sintesi di derivati bifenilossichinazolinici.....</i>	<i>pag.55</i>

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.	<i>Farmaci antitumorali in grado di inibire l'azione delle TK fino ad oggi approvati..</i> pag.27
Tabella 2.	<i>Strutture dei derivati sintetizzati con i nuclei chinazolinici di Erlotinib, Gefitinib e PD153035.</i> pag.64
Tabella 3.	<i>Strutture dei derivati 6,7-etilendiossichinazolinici sintetizzati.</i> pag.64
Tabella 4.	<i>Strutture dei derivati 7-allilossichinazolinici sintetizzati.</i> pag.65
Tabella 5.	<i>Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 con i derivati chinazolinici.</i> pag.68
Tabella 6.	<i>Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 e NIH3T3 con i derivati 4-amminochinazolinici.</i> pag.73
Tabella 7.	<i>Inibizione della fosforilazione di un substrato da parte di EGFR, VEGFR-2 e FGFR-1: (-) ≤20% @ 0.1μM; (+) 20÷50% @ 0.1μM; (++) ≥ 50% @ 0.1μM.</i> pag.76
Tabella 8.	<i>Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con i derivati 4-amminochinazolinici.</i> pag.77
Tabella 9.	<i>Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72h delle cellule A431, NIH3T3, HUVEC, MCF-7, HT-29 e HeLa con i derivati 4-amminochinazolinici.</i> pag.87
Tabella 10.	<i>Inibizione delle chinasi isolate e attive da parte dei composti alla concentrazione 0.1 μM. Inibizione: - ≤20%@ 0.1μM; + 20÷50% @ 0.1μM; ++ ≥ 50%@ 0.1μM. (n.d.= non ancora determinata)</i> pag.88

ABBREVIAZIONI

A431	Cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano
Abl	<i>Abelson kinase</i>
AcOH	Acido acetico
AKT	Proteinchinasi B (o PKB)
Ang-1	Angiopietina-1
AR	<i>Amphiregulin</i> (anfiregulina)
ATP	Adenosinatrifosfato
Boc	Terbutilossicarbonile
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina di siero bovino)
CAM	Membrana corioallantoidea di pollo
CAN	Cerio ammonio nitrato
CE	Cicloesano
c-Kit	Recettore per <i>Stem Cell Factor</i>
ClCOOEt	Etile cloro formiato
CML	<i>Chronic Myeloid Leukemia</i> (Leucemia mieloide cronica)
CRC	<i>Colorectal Cancer</i> (cancro del colon retto)
Cys	Cisteina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindolo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Acido deossiribonucleico
DTT	Ditiotreitolo

EC	<i>Endothelial Cells</i> (cellule endoteliali)
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (matrice extracellulare)
EDTA	Acido etilendiamminicotetracetico
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fattore di crescita epidermico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Recettore per EGF)
EGTA	Acido etilenglicole-tetracetico
ER	<i>Epiregulin</i> (epiregulina)
ESI-TOF	<i>Electrospray Ionization – Time of Flight</i> (Ionizzazione Elettrospray – Tempo di Volo)
EtOAc	Etile acetato
EtOH	Etanolo
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (citofluorimetro a flusso)
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (siero bovino fetale)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (siero di vitello fetale)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (fattore di crescita dei fibroblasti)
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> (recettore per FGF)
FITC	Fluoresceina Isotiocianato
FRS2	<i>FGFR Substrate 2</i>
GIST	<i>GastroIntestinal Stromal Tumor</i> (tumore stromale gastrointestinale)
Gln	Glutamina
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosinatrifosfato
HB-EGF	<i>Heparin-Binding Growth Factor</i>
HeLa	Cellule tumorali umane di cervice uterina
HepG2	Cellule di epatocarcinoma umano

HER	<i>Human Epidermal Receptor</i> (recettore epidermico umano)
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HMTA	<i>Hexamethylenetetramine</i> (Urotropina)
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (perossidasi del rafano)
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i> (proteoglicani ad eparan solfato)
HT-29	Cellule di adenocarcinoma umano di colon
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> (cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale umano)
IC ₅₀	concentrazione che provoca il 50% di inibizione
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IgG	Immunoglobulina G
ⁱ PrOH	Isopropanolo
MAb	<i>Monoclonal antibody</i> (anticorpo monoclonale)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	Cellule di adenocarcinoma mammario umano
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase kinase</i> (o chinasi MAP/ERK).
MeOH	Metanolo
Met	Metionina
MMP	<i>Matrix Metallo Proteinases</i> (metalloproteinasi della matrice)
Mn(OAc) ₃	Manganese acetato
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> (acido 3-(N-morfolino)-propansolfonico)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro
MW	Microonde
NaOEt	Sodio etilato

NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NIH3T3	Fibroblasti murini embrionali
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Risonanza magnetica nucleare)
NO	ossido nitrico
Nonidet P-40	<i>octylphenoxyethoxyethanol</i>
NR	<i>neuregulin</i>
NRTK	<i>Non Receptor Tyrosine Kinase</i> (tirosinchinasi non recettoriali)
NSCLC	<i>Non Small Cells Lung Cancer</i>
O/N	<i>Overnight</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (tampone sodio-fosfato)
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i> (Recettore del fattore di crescita piastrinico)
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> (o CD31)
Ph	<i>Phenyl</i> (fenile)
PI	Propidio Ioduro
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i> (fosfatidilinositolo-3 chinasi)
PLC γ	<i>Phospholipase C γ</i>
PS	<i>Phosphatidyl Serine</i> (fosfatidilserina)
PY	<i>Phosphotyrosine</i> (fosfotirosina)
Py	<i>Pyridine</i> (Piridina)
Pz	Pozzetto
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> (tirosinchinasi recettoriali)
SCCHN	<i>Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck</i> (carcinoma a cellule squamose della testa e del collo)
SDS	Sodio dodecil solfato
SH	<i>Src Homology domain</i>

STAT	<i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i> (trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione)
STK	<i>Serin-Threonin Kinases</i> (serin-treoninchinasi)
TA	Temperatura ambiente
TEA	Trietilammina
TFA	Acido trifluoroacetico
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
THF	Tetraidrofurano
Thr	Treonina
TK	<i>Tyrosine Kinases</i> (Tirosinchinasi)
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i> (Inibitori delle Tirosinchinasi)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia su strato sottile)
TMS	Tetrametilsilano
Tris-HCl	tris(idrossimetil)amminometano cloridrato
TsCl	Tosil cloruro
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioletto
VE-caderina	Caderina dell'endotelio vascolare
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fattore di crescita dell'endotelio vascolare)
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> (Recettore per VEGF)
d	doppietto
dd	doppietto di doppietti
dt	doppietto d tripletti
n.d.	non determinata
m	multipletto
p.f.	punto di fusione

s	singoletto
s all	singoletto allargato
t	tripletto
tt	tripletto di tripletti
q	quartetto
quint	quintetto

1. RIASSUNTO

Nell'ultimo decennio sono stati fatti molti progressi nell'ambito della terapia antitumorale, soprattutto grazie allo sviluppo della *targeted therapy* che ha portato all'approvazione di nuovi importanti farmaci. Tra i *target* di elezione per la *targeted therapy* particolare rilevanza hanno le tirosinchinasi. Le tirosinchinasi sono enzimi fondamentali nella trasduzione del segnale intracellulare e, quando sovra-esprese (come spesso accade nelle cellule tumorali), portano ad una de-regolazione e ad un'aumentata proliferazione cellulare. I farmaci approvati come inibitori tirosinchinasi sono per lo più molecole ad azione ATP-mimetica. Nonostante l'iniziale entusiasmo derivante dalla loro elevata efficacia terapeutica, oggi si riscontrano sempre più frequentemente fenomeni di resistenza che rendono inefficace la somministrazione di questi farmaci. Per cercare di superare questo problema la ricerca si sta impegnando nella scoperta di farmaci che siano multi-*target*, ovvero inibitori multi-chinasi.

A partire da queste considerazioni il progetto di dottorato è stato dedicato alla sintesi e alla valutazione biologica di nuovi potenziali inibitori tirosinchinasi. Da studi precedentemente effettuati all'interno dei laboratori di ricerca in cui questa tesi è stata svolta, era risultato che la funzionalizzazione con 3-amminobifenile di tre diversi nuclei chinazolinici (figura 1) conferiva una maggior potenza inibitoria nei confronti della proliferazione cellulare rispetto ad altri tipi di sostituenti anilini.

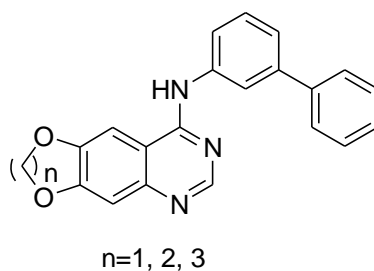


Figura 1. Struttura generale dei lead compounds: n=1, composto **1**; n=2, composto **2**; n=3, composto **3**.

Sono state quindi progettate e sintetizzate quattro classi di composti che differissero per il sostituente in 4 rispetto al nucleo diossanochinazolinico (n=2) o per i sostituenti in 6 o 7 all'anello chinazolinico.

I nuclei chinazolinici sono stati tutti ottenuti seguendo una metodica generale di sintesi messa a punto e validata nel nostro gruppo di ricerca.¹

Per tutti i composti sintetizzati sono stati valutati gli effetti antiproliferativi sulla linea cellulare A431 che sovra-esprime EGFR.² Il meccanismo di azione dei composti maggiormente attivi è stato quindi indagato, verificando l'irreversibilità dell'azione e la specificità nei confronti di EGFR. Sono stati valutati anche gli effetti sulla proliferazione, sulla migrazione e sulla morfogenesi di cellule HUVEC allo scopo di indagare l'attività antiangiogenica dei nuovi derivati.

Per avere un quadro più completo dell'attività di questi derivati sono stati, infine, valutati gli effetti antiproliferativi su un ampio pannello di linee cellulari tumorali umane e gli effetti inibitori su 7 diverse tirosinchinasi isolate (sia recettoriali che citoplasmatiche).

2. ABSTRACT

In the last decade, some progresses have been reached in the cancer treatment, mainly through the approval of novel key drugs based on the targeted therapy. In this respect, tyrosine kinases constitute one of the most relevant class of targets. Tyrosine kinases are key enzymes involved in the intracellular signal transduction and their up-regulation is often associated with cancer onset and progression. The tyrosine kinase inhibitors act mainly as ATP-mimic compounds. Despite the initial relevant clinical successes obtained through kinase inhibitor use, rapid drug resistance phenomena onset have been recently emerged when administering highly selective drugs. Consequently, a major goal in the field of tyrosine kinase inhibitor development is to find compounds able to inhibit more than one enzyme, thus overcoming the drug resistance onset.

The synthesis and the biological evaluation of new potential kinase inhibitors are described in this work. Three different quinazoline analogs have been previously identified by our research group, that share the same 3-aminobiphenyl function condensed at 4-position (Figure 1). These compounds were found to possess higher inhibitory potency against cell proliferation when compared with analogues bearing simple aniline moieties condensed at 4-position.

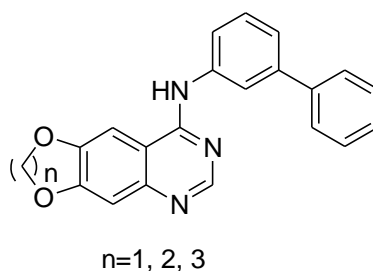


Figure 1. General structure of lead compounds: $n=1$, compound **1**; $n=2$, compound **2**; $n=3$, compound **3**.

Thus, starting from these results, four classes of quinazoline compounds have been synthesized. The designed derivatives are characterized by different substituents condensed on the dioxanoquinazoline nucleus ($n=2$) or by different side chains at the position 6 and 7 to the quinazoline nucleus. The quinazoline scaffolds have been synthesized according to an innovative and useful strategy developed by our research group.¹

All the synthesized compounds have been evaluated for their antiproliferative effects on A431 cells that over-express EGFR.² In order to define the mechanism of action of the most active compounds, the irreversibility of the effects on the cell growth as well as the interactions with EGFR have been investigated. The effects on HUVEC proliferation, migration and morphogenesis have also been evaluated to assess the antiangiogenic properties of the derivatives. Finally, the compounds have been tested on a panel of human tumor cell lines and on 7 different purified kinases.

3. INTRODUZIONE

Nei tessuti sani, i segnali che promuovono e regolano le varie fasi del ciclo e della crescita cellulare sono strettamente controllati. Il progressivo aumento delle conoscenze delle vie di trasduzione del segnale nelle cellule ha dimostrato che molti aspetti della funzionalità cellulare, incluse proliferazione e morte, sono regolati principalmente attraverso la produzione e il rilascio di fattori di crescita, ovvero messaggeri proteici che, legandosi a recettori presenti sulla superficie delle membrane cellulari, garantiscono la corretta funzionalità e conformazione del tessuto.³

La caratteristica principale delle formazioni neoplastiche, sia benigne che maligne, è la de-regolazione della crescita cellulare.⁴ Le neoplasie maligne hanno, inoltre, la capacità di invadere i tessuti sani circostanti.⁴ Ciò avviene perché le cellule tumorali maligne sono in grado di raggiungere organi e tessuti distanti mediante il torrente sanguigno, dando origine a nuove masse tumorali chiamate metastasi.⁵

Hanahan e Weinberg hanno descritto le caratteristiche che contraddistinguono le cellule tumorali, riassumendole in sei punti: (1) autosufficienza nella produzione dei segnali di crescita; (2) insensibilità ai segnali che inibiscono la proliferazione; (3) evasione dall'apoptosi; (4) potenziale replicativo illimitato; (5) induzione del processo angiogenico; (6) invasione e metastasi. Almeno la metà di queste caratteristiche coinvolgono recettori tirosinchinasici (*Receptor Tyrosine Kinase*, RTK) e le relative vie di trasmissione del segnale. Mutazioni attivanti e/o sovra-espressioni di RTK e dei loro ligandi possono portare, infatti, a de-regolazioni nella crescita cellulare.⁶

Fino ad una decina di anni fa il trattamento delle patologie tumorali avveniva solo attraverso approcci relativamente aspecifici, mirati alla rimozione (trattamento chirurgico) o alla riduzione (trattamento radioterapico e chemioterapico convenzionale) della massa tumorale.⁷ I farmaci antitumorali utilizzati nella chemioterapia convenzionale sono diretti verso enzimi metabolici (metotressato), DNA (cisplatino, ciclofosfamide), topoisomerasi (doxorubicina, etoposide), recettori nucleari per gli ormoni (tamoxifene e flutamide), stabilizzazione dei microtubuli (paclitassolo),⁸ ma non discriminano in modo efficace tra cellule sane in rapida divisione (cellule del midollo osseo e del tratto gastrointestinale) e cellule tumorali.⁹

Di conseguenza, l'approccio terapeutico classico ha come limite principale l'elevata tossicità sistemica.¹⁰ La risposta del tumore al trattamento chemioterapico è, inoltre, spesso solo parziale e non prevedibile in modo completo.⁹

Per questi motivi la ricerca si è rivolta verso lo sviluppo di farmaci in grado di sfruttare alcune delle caratteristiche peculiari delle sole cellule tumorali.¹⁰ La sopravvivenza delle cellule tumorali, infatti, è strettamente dipendente dai prodotti oncogenici. Colpire tali bersagli, scopo principale della *targeted therapy*, permette di avere un'azione farmacologica più selettiva in quanto le cellule tumorali sono più sensibili al trattamento rispetto alle cellule sane.⁷

Gli oncogeni codificano per proteine che controllano la proliferazione cellulare e l'apoptosi e comprendono fattori di trascrizione, fattori di crescita e recettori per i fattori di crescita, trasduttori del segnale e regolatori dell'apoptosi.⁷

Le nuove classi di farmaci antitumorali comprendono sia piccole molecole organiche che anticorpi monoclonali (mAb) e i progressi maggiori sono stati fatti nello sviluppo agenti atitumorali in grado di inibire l'attività enzimatica di proteinchinasi (Abl, c-Kit, EGFR e HER-2).⁷ L'esempio più noto è quello di Imatinib (Gleevec®), un inibitore competitivo al sito di *binding* dell'ATP di Bcr-Abl, una proteinchinasi mutata e caratteristica della leucemia mieloide cronica.¹⁰

Un altro approccio per contrastare la crescita tumorale è rappresentato dalla terapia antiangiogenica e anche in questo caso i *target* d'azione più studiati sono le proteinchinasi (come VEGFR-2 e FGFR-1) e i loro fattori di crescita.

3.1. ANGIOGENESI

La formazione della rete vascolare è composta essenzialmente da due processi: la vasculogenesi e l'angiogenesi.

Il termine vasculogenesi si riferisce alla formazione *ex-novo* di vasi sanguigni a partire da precursori cellulari pluripotent. La vasculogenesi può essere meglio descritta come la differenziazione di precursori cellulari, chiamati angioblasti, in cellule endoteliali (EC) che vanno poi a formare una rete vascolare primitiva. La vasculogenesi è normalmente coinvolta nei primi stadi dello sviluppo embrionale dei vasi.

Il termine angiogenesi si riferisce, invece, all'espansione della rete vascolare già esistente con la formazione di una rete di capillari. I nuovi capillari si formano a partire da vasi pre-esistenti e in seguito alla migrazione e proliferazione di cellule endoteliali differenziate.¹¹

In condizioni fisiologiche, i vasi sanguigni sono formati da un monostrato di EC ancorate su una membrana basale avvolta da cellule subendoteliali specializzate, quali periciti e cellule muscolari lisce. Il tutto è immerso nella matrice extracellulare (ECM), un complesso di fibroblasti, macrofagi e macromolecole prodotte dalle cellule e secrete nello spazio intercellulare che fornisce un reticolo organizzato all'interno del quale le cellule possono migrare ed interagire tra loro. L'endotelio non ha solamente un ruolo strutturale, ma è in grado di produrre diversi mediatori chimici, controllare tono e permeabilità vascolare, modulare i processi coagulativi e le interazioni con le cellule ematiche con cui viene a contatto.¹²

Il processo angiogenico avviene in più fasi:

1. iniziale dilatazione dei vasi esistenti;
2. aumento nelle permeabilità vasale e degradazione della matrice circostante;
3. attivazione e proliferazione delle cellule endoteliali che migrano e cominciano ad organizzarsi in strutture simil-capillari;
4. differenziazione e maturazione delle cellule endoteliali dei vasi nascenti supportate dalla rete circostante di periciti e di cellule della matrice.

La tappa iniziale dell'angiogenesi è, quindi, la vasodilatazione che viene prevalentemente indotta dal rilascio di ossido di azoto (NO) da parte dei tessuti ipossici; questo provoca un aumento della trascrizione di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*: il principale fattore di crescita coinvolto nell'angiogenesi), con conseguente aumento della permeabilità vascolare¹³ che permette lo stravasamento di proteine plasmatiche, come il fibrinogeno. Questo, a sua volta, viene convertito a fibrina che serve come matrice provvisoria per le EC,¹⁴ contemporaneamente si assiste anche alla redistribuzione di molecole di adesione intercellulari (PECAM-1 [*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*] e VE-caderina) e ad alterazioni nella struttura della membrana cellulare. Per permettere alle EC di migrare verso gli stimoli chemotattici, la membrana vascolare basale e la matrice extracellulare che circondano i capillari pre-esistenti vengono degradate dalle proteasi secrete dalle cellule tumorali,¹⁴ come le metalloproteasi di matrice (MMP).¹³ Per favorire questo processo le cellule tumorali producono

anche fattori di crescita (b-FGF [b-Fibroblast Growth Factor], VEGF e IGF-1 [Insulin-like Growth Factor-1]).¹³

Successivamente le EC migrano proliferano, invadono la matrice extracellulare circostante e aderiscono l'una sull'altra fino a formare un vaso. Quest'ultimo processo è accompagnato dalla produzione di Ang-1 (Angiopietina-1) e PDGF-B (Platelet Derived Growth Factor-B) che reclutano i periciti e portano alla formazione della membrana basale attorno ai nuovi vasi formati.¹⁴

I periciti e la matrice extracellulare sono critici per la formazione del supporto strutturale e funzionale della rete vascolare. Le cellule muscolari lisce vasali stabilizzano i vasi nascenti attraverso l'inibizione della proliferazione endoteliale e della migrazione. Inoltre i periciti sono metabolicamente attivi ed esprimono una varietà di peptidi vasoattivi, fattori di crescita e citochine che sono importanti per la funzionalità della rete vascolare. La matrice extracellulare è fondamentale anche per la crescita e il mantenimento dei vasi: funge infatti da magazzino dal quale poi i fattori di crescita vengono mobilizzati per mediare i segnali intercellulari in modo appropriato.¹³

I vasi sanguigni neoformati, infine, si fondono tra loro andando a formare la rete vascolare¹⁴ e le cellule endoteliali diventano quiescenti.¹³

L'angiogenesi è fondamentale durante lo sviluppo embrionale; nel periodo post-natale, invece, le EC diventano quiescenti e l'angiogenesi può avvenire solo in pochi siti ben determinati.¹⁵

L'angiogenesi viene regolata in modo rigoroso attraverso il bilanciamento tra molecole pro- e molecole anti-angiogeniche¹⁶ (Figura 2): nei tessuti sani, la produzione di inibitori dell'angiogenesi in eccesso rispetto agli stimolatori rende quiescente il processo di formazione di nuovi vasi.¹⁵

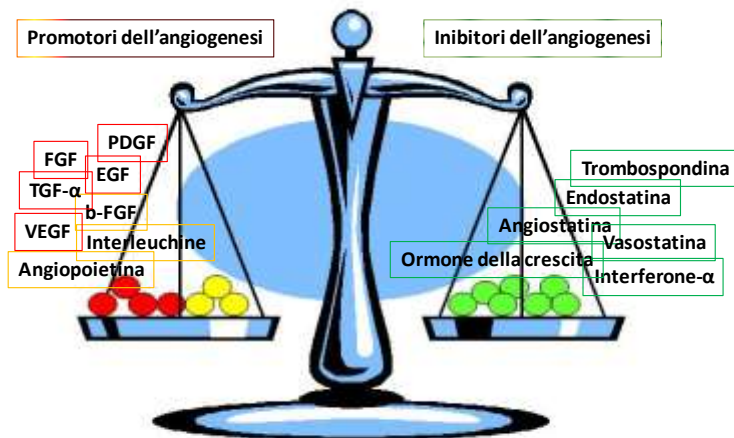


Figura 2. Bilanciamento tra attivatori e inibitori dell'angiogenesi.

Lo “switch on” dei fattori pro-angiogenici, che può derivare da un effettivo aumento di questi fattori e/o dalla diminuzione degli inibitori endogeni, porta ad un aumentato processo di vascolarizzazione. Ciò assume un ruolo importante nello sviluppo di molte patologie, tra cui il cancro.¹⁵

3.1.1. ANGIOGENESI TUMORALE

L’angiogenesi è vitale in quasi tutti gli stadi di crescita del tumore:¹⁵ come i tessuti sani, anche quelli neoplastici richiedono sia l’apporto di nutrienti e ossigeno che l’eliminazione di rifiuti metabolici e anidride carbonica. La neo-vascolarizzazione associata al tumore è generata dal processo di angiogenesi che diventa costante e attivo: per soddisfare queste necessità, le EC, normalmente quiescenti, vengono stimulate a crescere e a formare nuovi vasi che aiutino la sopravvivenza e l’espansione del tumore (Figura 3).³

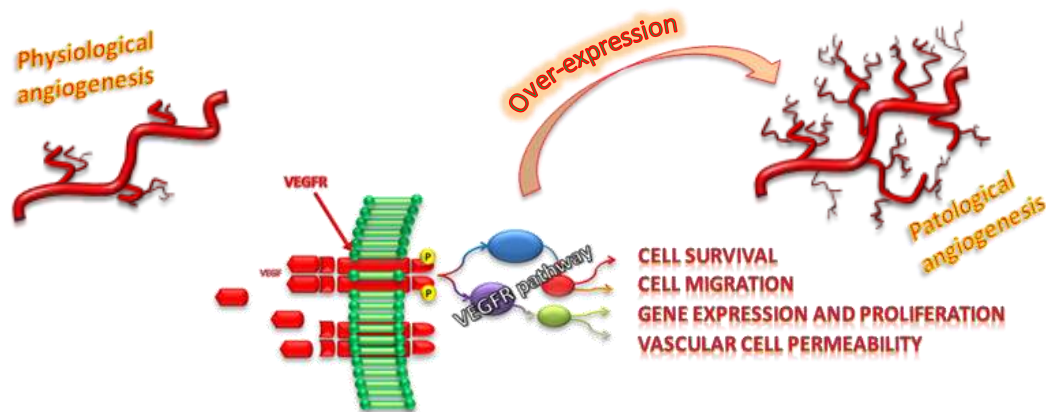


Figura 3. Schema che illustra come la sovra-espressione di VEGFR e VEGF stimoli l’angiogenesi patologica.

I vasi che si formano in questi processi patologici hanno caratteristiche ben diverse da quelle dei vasi che si formano nel processo fisiologico: infatti, mentre i vasi dei tessuti sani sono organizzati in maniera gerarchica (arterie, capillari, vene), la rete vascolare tumorale è disorganizzata e morfologicamente anormale. Inoltre, la struttura della membrana basale della rete vascolare può essere discontinua e i vasi tumorali possono essere fenestrati: ciò è dovuto solo in parte ad un supporto peri-vascolare insufficiente¹⁷. I tratti caratteristici dei vasi tumorali sono, infatti, in larga parte attribuibili alla sovra-espressione intra-tumorale di VEGF che agisce sulle EC aumentandone proliferazione,

sopravvivenza e migrazione e incrementando la permeabilità dei vasi. Inoltre, poiché molte cellule tumorali sovra-esprimono VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), VEGF può supportare la crescita del tumore e l'invasione con un effetto diretto sulle cellule tumorali stesse.¹⁷

Molti dei segnali extracellulari che portano alla crescita e alla sopravvivenza della cellula vengono amplificati e tradotti all'interno della cellula stessa attraverso tre meccanismi: attivazione di recettori tirosinchinasici, di recettori accoppiati a proteine G e di recettori per citochine. Tutti questi meccanismi, direttamente o indirettamente, coinvolgono proteinchinasi.⁸

3.2. PROTEINCHINASI

Fosforilazione e de-fosforilazione sono le più comuni modificazioni post-traduzionali delle proteine¹⁸ e sono tra i meccanismi più potenti sia per la trasmissione del segnale che per la regolazione di attività enzimatiche. Molti processi di fosforilazione regolano punti critici nella proliferazione cellulare inclusi mitosi, trascrizione di geni, progressione del ciclo cellulare e differenziazione.¹⁹ Per ragioni storiche e pratiche, è stato più facile studiare le proteinchinasi che le proteinfosfatasi, per cui la maggior parte della ricerca si è concentrata sulle chinasi.¹⁸

Le proteinchinasi costituiscono un'ampia famiglia di enzimi e rivestono notevole importanza poiché regolano la maggior parte di quei processi che controllano la crescita, la sopravvivenza e la divisione cellulare.²⁰

Le proteinchinasi sono enzimi che catalizzano il trasferimento del gruppo γ -fosfato da ATP (o, raramente, da GTP) a residui amminoacidici di appropriate proteine substrato¹⁸ e possono essere suddivise in due classi principali: le tirosinchinasi (*Tyrosine Kinases*, TK) e le serin-treoninchinasi (*Serin-Threonin Kinases*, STK). Le prime fosforilano il gruppo fenolico di residui tirosinici, mentre le seconde fosforilano il gruppo alcolico di residui di serina e/o treonina. Tutte le chinasi sono caratterizzate, nel sito catalitico, dalla presenza di una tasca di legame per l'ATP e da un sito di *binding* per il peptide substrato.²⁰

Il gruppo fosfato conferisce due cariche negative al singolo amminoacido cui viene legato, portando a profonde variazioni conformazionali della proteina, con conseguente

alterazione delle interazioni con altre macromolecole o substrati. Il gruppo fosfato può modulare l'attività di una proteina in tre modi diversi:

- interferenza diretta: attraverso il blocco del sito di legame per un ligando, a causa dell'ingombro sterico o della repulsione elettrostatica tra il fosfato e i substrati, se anche questi ultimi sono negativi;
- cambiamento conformazionale: un gruppo fosfato può partecipare a legami idrogeno e a interazioni elettrostatiche diverse da quelle a cui partecipa il gruppo ossidrilico di un amminoacido. In molti casi, queste interazioni di residui fosforilati cambiano la conformazione della proteina;
- creazione di siti di legame: la fosforilazione, essendo reversibile, controlla le interazioni tra proteine che richiedono un residuo fosforilato per legarsi ad un sito specifico.¹⁸

Sono stati identificati 518 geni che codificano per proteinchinasi nel genoma umano (circa il 2% del genoma): 358 trascrivono per serin-treoninchinasi, 90 per tirosinchinasi e 43 per proteine tirosinchinasi simili. Tra i 90 geni che trascrivono TK, 58 sono per tirosinchinasi recettoriali e 32 per citoplasmatiche. Il rapporto tra fosfoserina:fosfotreonina:fosfotirosina è di 3000:3001:1. A dispetto della minor rappresentanza in confronto alle altre due famiglie, le tirosinchinasi svolgono un ruolo di maggior importanza nella trasduzione del segnale. Infatti le serin-treoninchinasi tipicamente sono associate ad un' amplificazione del segnale (una proteina fosforila molte altre proteine substrato). Le tirosinchinasi invece solitamente danno inizio alla cascata del segnale catalizzando la fosforilazione di pochi substrati che sono spesso serin-treoninchinasi.²¹

3.2.1. TIROSINCHINASI

Le tirosinchinasi possono essere suddivise in due categorie: TK di membrana o recettoriali (RTK) e TK citoplasmatiche o NRTK (*Non Receptor Tyrosine Kinase*).²²

c) Tirosinchinasi recettoriali

La comunicazione inter- e intra-cellulare ha un ruolo fondamentale in molte fasi della vita della cellula: la complessa rete di segnali che la regola è controllata in larga parte da

fattori di crescita. Questi fattori possono influenzare la proliferazione cellulare in modo positivo o negativo e indurre una serie di risposte diversificate nelle cellule, come ad esempio la sopravvivenza, l'apoptosi e la differenziazione cellulare. L'interazione tra fattore di crescita e recettore, mediata da uno specifico *binding*, attiva una cascata di eventi biochimici intracellulari che è, in ultima analisi, responsabile della risposta osservata.²³

I recettori tirosinchinasici, conosciuti anche come recettori per i fattori di crescita, sono una famiglia di proteine trans-membrana che media importanti processi fisiologici sia nelle cellule sane che in quelle tumorali.²⁴ Le RTK hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi tissutale durante lo sviluppo e la vita degli organismi multicellulari.²⁵

I recettori tirosinchinasici sono costituiti da un dominio extracellulare deputato al riconoscimento con i fattori di crescita, un dominio trans-membrana, che ancora il recettore alla membrana,²³ e un dominio intracellulare con l'attività catalitica. Il *binding* con il ligando induce la dimerizzazione e l'autofosforilazione dei residui tirosinici citoplasmatici, in cui una subunità del dimero fosforila l'altra subunità (Figura 4).

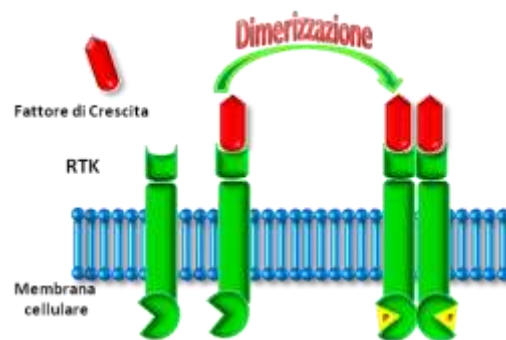


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'attivazione di una RTK.

Le funzioni tirosiniche fosforilate reclutano le proteine di trasmissione del segnale intracellulare, legandosi ai domini SH2. Inoltre, le proteine contenenti questi domini, come Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), hanno la funzione di adattatori nel reclutamento di altre proteine per le RTK, aumentando così il repertorio di proteine del segnale attivate da queste ultime²⁶ che trasmetteranno poi i segnali biologici per la regolazione della funzionalità cellulare.²⁴

La cascata Ras/Raf/MAPK svolge un ruolo fondamentale nel controllo della proliferazione cellulare. Il legame tra RTK e Ras, a cui provvede Grb2, dimostra chiaramente l'importanza di questa via del segnale.

La similarità delle sequenze dei domini extracellulari delle RTK ne determina la specificità di *binding* con i ligandi⁶ e ne permette la classificazione in famiglie.

Le RTK vengono trascritte a partire da un'importante famiglia di oncogeni che è comunemente affetta da mutazioni e alterazioni nei tumori umani.²⁵ La de-regolazione può avvenire attraverso vari meccanismi (ad esempio amplificazione genica, sovra-espressione di RTK, traslocazione di cromosomi) che portano alla produzione di RTK costitutivamente attive.²⁴ Quando i segnali indotti dalle RTK non sono più controllati si può avere la trasformazione cellulare.

➤ EGFR

La famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico (ErbB/HER) comprende quattro membri: EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*, HER-1 o ERBB1), EGFR-2 (più conosciuto come HER-2 o ERBB2), HER-3 (o ERBB3) e HER-4 (o ERBB4). Sono glicoproteine trans-membrana contenenti un dominio extracellulare che interagisce con un ligando e un dominio intracellulare con l'attività enzimatica.²⁷

La porzione extracellulare è a sua volta composta da quattro domini (I-IV). I domini I e III si legano al fattore di crescita. I domini II e IV sono ricchi in cisteina e, in assenza dell'interazione con il fattore di crescita, stabilizzano il dominio extracellulare in una conformazione chiusa mediata da interazioni intramolecolari; in seguito al *binding* con il ligando, avviene un cambiamento conformazionale che rompe queste interazioni permettendo al "braccio" di dimerizzazione del dominio II di interagire con il dominio II di un secondo recettore²⁸ (figura 5).

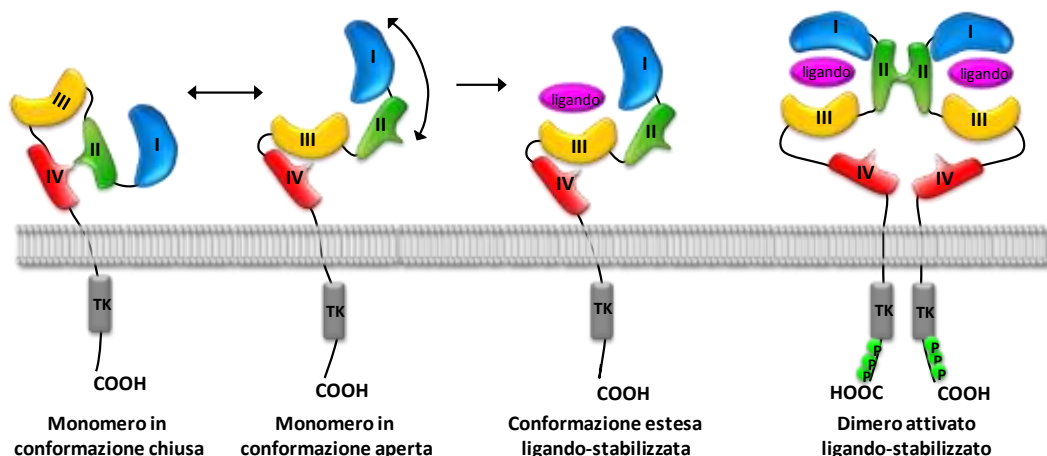


Figura 5. Struttura schematica di EGFR in equilibrio tra due conformazioni. L'interazione con il fattore di crescita induce un cambiamento conformazionale e la successiva dimerizzazione (adattata da Lammerts van Bueren et al²⁹).

Tra i membri di questa famiglia, EGFR e HER-4 vengono definiti autonomi perché, dopo il legame con il fattore di crescita, inducono una dimerizzazione del recettore e generano una cascata del segnale che porta a proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare. HER-2 invece, non ha la capacità di interagire con il ligando, mentre HER-3 ha una minore attività enzimatica. A dispetto di questa mancanza di autonomia, HER-2 ed HER-3 sono però in grado di formare dei complessi eterodimerici con gli altri membri della famiglia ErbB consentendo l'avvio di un'ampia cascata del segnale.²⁷

Esistono molti fattori di crescita in grado di interagire con questi recettori: EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), AR (*amphiregulin*), ER (*epiregulin*), NR (*neuregulin*), hb-EGF (*heparin binding-EGF*) e betacellulina.

Sono inoltre molti i meccanismi che possono portare ad un'aumentata cascata del segnale e al reclutamento di MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*), trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione (STAT, *Signal Transducers and Activators of Transcription*), come per esempio sovra-espressioni e/o mutazioni dei recettori. La via delle Ras-Raf-MAPK è quella maggiormente attivata dalla famiglia ErbB/HER. A seguito dell'attivazione di EGFR, e conseguente fosforilazione dei residui tirosinici citoplasmatici, il complesso proteico adattatore GRB/Sos si lega sia direttamente che indirettamente attraverso Shc, a specifici siti di interazione intracellulari di EGFR. La regolazione del segnale è complicata poiché sono presenti meccanismi di *cross-talk* tra EGFR con altri membri della famiglia ErbB e con altri recettori tirosinchinasici come VEGFR-2 e PDGFR.

I recettori della famiglia ErbB sono espressi in vari tessuti, sia di origine epiteliale che neuronale, dove hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella proliferazione e nella differenziazione.³⁰ Tuttavia, una de-regolazione di questi recettori, in particolare di EGFR e di HER-2, è implicata nello sviluppo di numerose patologie tumorali.³⁰

Tra i membri della famiglia ErbB il più indagato è sicuramente EGFR: un'aumentata attività e/o sue mutazioni sono infatti ben documentate in molti tipi di cancro con marcata tendenza ad aggressività tumorale e prognosi sfavorevole. EGFR è diventato quindi un *target* di prima scelta nella ricerca di agenti antitumorali.³¹

➤ **VEGFR-2**

Tra le varie molecole coinvolte nei processi di crescita e formazione della rete vascolare, i membri della famiglia del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) hanno un

ruolo predominante (Figura 6):¹⁶ gli effetti fisiologici di VEGF (VEGF-A) sono mediati dal *binding* a due recettori omologhi VEGFR-1 e VEGFR-2 che sono espressi sulle cellule endoteliali vascolari. Un terzo recettore, VEGFR-3, è coinvolto invece nella linfoangiogenesi mediata da VEGF-C e -D. Come per gli altri recettori tirosinici transmembrana, VEGFR va incontro a dimerizzazione ligando-indotta.³²

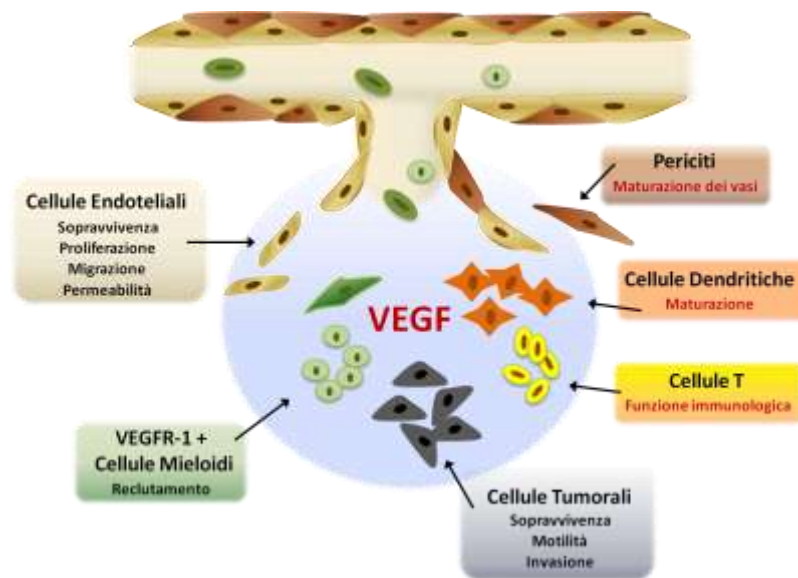


Figura 6. Coinvolgimento di VEGF in vari processi fisiologici (adattata da Tugues et al³³).

Molti studi hanno dimostrato che sia VEGFR-1 che VEGFR-2 sono essenziali per il normale sviluppo embrionale e post-natale. Questi due recettori presiedono a diverse vie di trasduzione del segnale: VEGFR-2 è il maggiore mediatore degli effetti mitogeni e angiogenici e dell'aumento della permeabilità indotti da VEGF; VEGFR-1, invece, è coinvolto principalmente nella differenziazione e nell'organizzazione dell'architettura dei vasi.³⁴

Le ultime ricerche hanno dimostrato come VEGFR-2 sia il principale mediatore dei segnali indotti da VEGF all'endotelio vascolare.³⁵

➤ **FGFR-2**

Come tutti i recettori tirosinchinasici, i 4 membri della famiglia di FGFR (FGFR-1 – FGFR-4, *Fibroblast Growth Factor Receptor*) sono costituiti da un dominio extracellulare che lega il fattore di crescita (FGF, *Fibroblast Growth Factor*), un singolo dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico contenente il *core* catalitico dell'enzima, oltre ad altre sequenze regolatorie. Il dominio extracellulare di FGFR è composto da 3 domini

immunoglobulin-like chiamati D1-D3.³⁶ Un tratto di sette/otto residui aminoacidici acidi (*acid box*) collega D1 e D2, mentre una regione conservata carica positivamente in D2 serve come sito di *binding* per l'eparina. La caratteristica principale di questa famiglia di RTK è l'elevata varietà di isoforme di FGFR che sono generate da *splicing* alternativi dei trascritti di FGFR e che hanno quindi anche ligandi diversi.³⁶ Tuttavia, grazie alla risoluzione di strutture tridimensionali mediante cristallografia ai raggi-X, è stato possibile proporre un modello che spieghi la dimerizzazione e l'attivazione ligando-indotta: il dimero FGFR è stabilizzato non solo dall'interazione con il fattore di crescita, ma anche da interazioni recettore-recettore.³⁶ I domini D2 e D3 costituiscono il sito di *binding* per il ligando.²⁵

Alcune tirosine intracellulari di FGFR, una volta fosforilate, diventano siti di *docking* per altre proteine contenenti il dominio SH2: tra queste vanno ricordate PLC γ (*Phospholipase C γ*), FRS2 (*FGFR Substrate 2*) che permette la successiva interazione con Grb2, le proteine della cascata Ras/MAPK e infine le STAT. Il segnale intracellulare attivato dalla famiglia FGFR stimola la proliferazione e la migrazione cellulare ed è cruciale durante le fasi dello sviluppo.²⁵

Il fattore che lega FGFR, FGF, d'altra parte ha un ruolo importante nella formazione dei vasi, influenzando altre proteine chiave come HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) e VEGFR; in particolare, FGFR-2 supporta il rinnovo indifferenziato delle cellule staminali embrionali umane. Il coinvolgimento dei membri della famiglia FGFR è stata riscontrata in molti tumori (seno, milza, prostata, polmone, mieloma multiplo).²⁵

➤ **PDGFR**

Il sistema PDGFR/PDGF include due recettori (PDGFR-A e PDGFR-B) e quattro ligandi (PDGFA, PDGFB, PDGFC e PDGFD). PDGFR regola la normale crescita cellulare e la differenziazione. L'espressione di PDGFR attivato promuove i processi di trasformazione oncogenica, rendendo evidente come mutazioni o riarrangiamenti nella sequenza genica possano avere un ruolo importante nello sviluppo di patologie tumorali.³⁷

I complessi PDGFR/PDGF hanno un ruolo importante anche nel processo angiogenico, reclutando vari tipi di cellule che sono richieste per la vascolarizzazione. Il rilascio di PDGF dalle EC è essenziale per il richiamo di periciti e cellule muscolari lisce che esprimono PDGFR-B e sono fondamentali per l'integrità e la stabilizzazione della rete

vascolare. Il ruolo di PDGFR nell'angiogenesi suggerisce come l'inibizione combinata di PDGFR e VEGFR sia un approccio razionale nella terapia antiangiogenica.³⁸

d) Tirosinchinasi citoplasmatiche

Le tirosinchinasi citoplasmatiche, o non recettoriali (NRTK) sono codificate da oncogeni e si distinguono strutturalmente dalle RTK principalmente per la mancanza del dominio extracellulare con il sito di *binding* per il ligando. La maggior parte delle TK citoplasmatiche si trova nel citoplasma. Tuttavia, alcune NRTK sono ancorate alla membrana cellulare: questo è permesso da alcune modificazioni alla funzione amminica terminale, come la miristoilazione o la palmitoilazione.³⁹ Presentano inoltre il dominio catalitico che contiene un sito specifico per il *binding* dell'ATP.⁴⁰

Le NRTK possiedono dei domini che mediano le interazioni proteina-proteina, proteina-lipidi e proteina-DNA. I domini di interazione proteina-proteina più comuni sono denominati *Src homology 2* (SH2) e 3 (SH3). Il dominio SH2 è costituito da circa 100 residui in grado di interagire con residui fosfotirosinici in modo sequenza-specifico. Il dominio SH3 è più piccolo (circa 60 residui) e riconosce sequenze ricche di prolina. Alcune NRTK contengono ulteriori domini di interazione: Abl, per esempio, oltre ai domini SH2 e SH3, possiede un dominio che lega la F-actina e uno che lega il DNA (Figura 7).³⁹

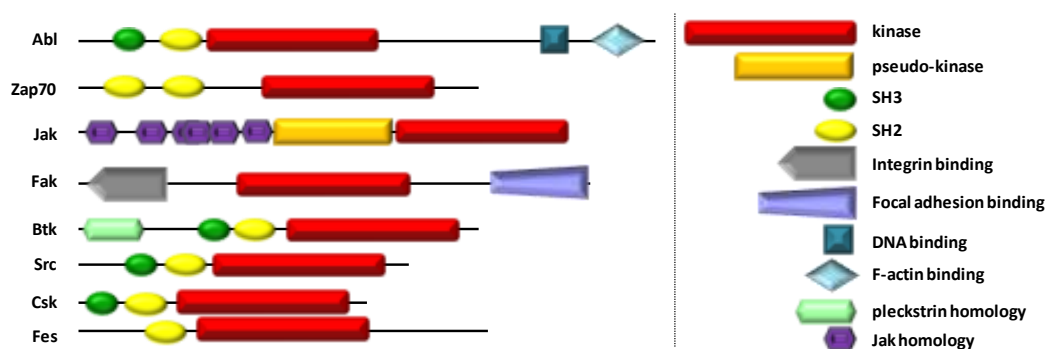


Figura 7. Organizzazione dei domini nelle maggiori famiglie di NRTK. Il gruppo ammino-terminale è a sinistra dello schema, mentre il carbossi-terminale si trova sulla destra. La lunghezza delle varie NRTK è solo parzialmente in scala. (adattata da Hubbard et al³⁹).

La regolazione delle NRTK avviene attraverso la fosforilazione di residui tirosinici che porta, normalmente, all'attivazione del *loop* di attivazione e all'aumento dell'attività enzimatica. La fosforilazione del *loop* di attivazione avviene attraverso la trans-autofosforilazione o la fosforilazione da parte di un'altra NRTK. La fosforilazione di altre

tirosine, che non si trovino nel *loop* di attivazione, può invece regolare in modo negativo l'attività chinasi.³⁹

Le tirosinchinasi citoplasmatiche sono parte integrante della cascata del segnale a cui danno inizio le RTK e gli altri recettori di membrana (come i recettori accoppiati a proteine G).³⁹

Le tirosinchinasi citoplasmatiche infatti, interagendo con i domini intracellulari autofosforilati delle RTK, vengono attivate e promuovono la cascata del segnale all'interno della cellula.⁷

Normalmente, l'attivazione di questi mediatori molecolari è finemente regolata³⁹ ma una loro de-regolazione⁷ può sovra-stimolare la crescita cellulare.³⁹ Esempi di tirosinchinasi citoplasmatiche sono Abl (*Abelson kinase*), Src e FAK (*Focal Adhesion Kinase*).³⁹

➤ **Src**

La più grande famiglia di tirosinchinasi citoplasmatiche è la famiglia Src. I membri di questa famiglia partecipano ad una grande varietà di processi, tra i quali la mitosi, la ristrutturazione del citoscheletro e sono componenti chiave nella regolazione del sistema immunitario per l'attivazione di cellule T e B. Sono stati descritti molti substrati per Src che includono, tra gli altri, PDGFR e EGFR. Src è implicata, oltre che nella regolazione di vari processi fisiologici, in molti tumori umani (mammella, polmone e colon).³⁹

Src e i membri della sua famiglia contengono un ammino-gruppo terminale miristoilato, residui carichi positivamente che interagiscono con le teste dei gruppi fosfolipidici, una regione a bassa omologia di sequenza, un dominio SH3, un dominio SH2, un dominio tirosinico e una corta porzione carbossi-terminale.

L'attività di Src viene regolata attraverso la distruzione delle interazioni tra il dominio chinasi e i domini SH2 e SH3. Lo spostamento dei domini SH2 e SH3 dal C-terminale e del *linker* (Figura 8), avvengono in seguito al *binding* con un ligando, portando all'attivazione della proteina. Src può, per esempio, essere attivata attraverso il *binding* del suo dominio SH2 al recettore PDGF auto fosforilato.³⁹

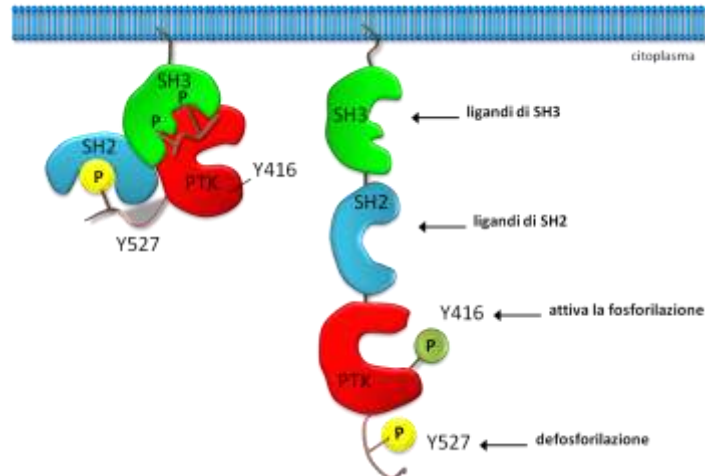


Figura 8. Rappresentazione schematica del cambiamento conformazionale indotto dopo la fosforilazione e attivazione di Src (adattata da Guarino ⁴¹).

Una volta attivata, Src è coinvolta nella regolazione di molti processi, inclusi la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare, la motilità e l'angiogenesi. È stato stabilito che la sola sovra-espressione di Src costituisce di per sé un debole segnale oncogenico. Inoltre, raramente si assiste a mutazioni che portino ad un'attivazione costitutiva di Src nei tumori umani.

Recenti evidenze sperimentali hanno però suggerito che la sovra-espressione della forma *wild-type* di Src è in grado di aumentare l'attività di altre molecole che controllano altre vie del segnale mediante l'interazione con molte altre proteine, inclusi i recettori tirosinchinasici (come PDGFR, VEGFR-2, EGFR, HER-2).⁴² Src, infatti, riveste un ruolo importante nelle risposte proliferative RTK-mediate attraverso l'attivazione delle cascate Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt.⁴²

Src e la sua famiglia hanno un ruolo importante nell'oncogenesi del cancro alla prostata, al colon, al seno, al polmone e in molti altri tumori.⁴² Tuttavia Src ha prevalentemente un ruolo nel mantenimento del fenotipo neoplastico e nella progressione tumorale, piuttosto che nell'iniziazione e crescita del tumore.⁴¹

➤ Abl

c-Abl è localizzata in numerosi siti cellulari (nucleo, citoplasma, mitocondri, reticolo endoplasmatico) nei quali interagisce con varie proteine, come adattatori della cascata del segnali, chinasi, fosfatasi, regolatori del ciclo cellulare e fattori di trascrizione.⁴¹

Strutturalmente Abl è organizzata come Src: possiede i domini SH2 e SH3 e un sito chinamico, ma la sua attività enzimatica viene regolata in modo diverso. Abl non ha il sito

regolatore negativo di fosforilazione all'estremità carbossi-terminale, presente invece in Src, e, di conseguenza, questa estremità non ha alcun ruolo sul controllo dell'attività chinasi. Il dominio SH3 è invece implicato nella repressione dell'attività enzimatica: mutazioni a livello di questo dominio possono infatti portare all'attivazione costitutiva di Abl e a conseguente trasformazione cellulare.

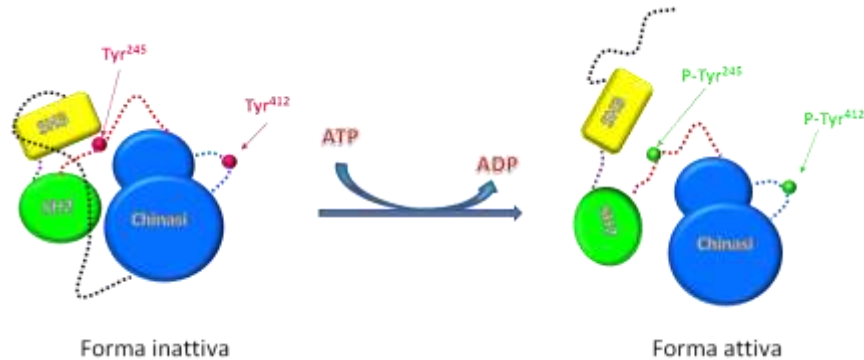


Figura 9. Rappresentazione schematica del cambiamento conformazionale indotto dopo la fosforilazione e attivazione di c-Abl.

c-Abl è implicata nella regolazione di un ampio numero di processi cellulari, incluse la crescita e la sopravvivenza cellulare; il controllo dell'attività chinasi di questo enzima è quindi essenziale: è sufficiente una sola mutazione specifica che causi un'anomalia nell'attività enzimatica perché si abbia insorgenza di leucemia nell'uomo. In particolare, a causa della traslocazione di un gene tra il cromosoma 22 e il cromosoma 9 si ha la formazione del cromosoma Philadelphia, in cui la sequenza del primo esone *ABL1* viene rimpiazzata dalle sequenze del gene *BCR*, portando all'espressione della proteina di fusione Bcr-Abl.⁴¹ Bcr-Abl è estremamente importante dal punto di vista patologico in quanto questa proteina causa un aumento della proliferazione cellulare, modifiche nella morfologia della cellula e perdita dell'inibizione da contatto. La leucemia mieloide cronica (*Chronic Myeloid Leukemia*, CML) e alcuni sottotipi della leucemia linfatica acuta sono collegati in modo causale all'espressione di questa proteina mutata.⁴¹

3.3. TIROSINCHINASI E CANCRO

La correlazione tra proteinchinasi e il cancro è nota da almeno trent'anni, cioè da quando, nel 1975 Harold Varmus e Michael Bishop, individuarono il primo oncogene cellulare, *v-src*; solo più tardi si scoprì che codificava per una tirosinchinasi. Oltre 500

proteinchinasi sono state identificate da allora⁴³ e, tra queste, molte sono strettamente coinvolte nei processi che portano alla proliferazione e alla sopravvivenza delle cellule tumorali. L'attivazione costitutiva di alcune classi di proteinchinasi è necessaria ed essenziale per la crescita e il sostentamento del tumore.⁴⁴

Le recenti scoperte nella fisiopatologia del cancro a livello molecolare hanno rivelato che, proprio a causa del loro ruolo, molte proteinchinasi, ed in particolare le tirosinchinasi recettoriali, se alterate, mutate o sovra-esprese sono direttamente correlate con l'insorgenza di malattie iperproliferative. Le RTK possono portare ad un aumento o ad una diminuzione, rispettivamente, della trascrizione di oncogeni o di geni soppressori del tumore⁴⁵ e più del 50% delle RTK risultano mutate o sovra-esprese nei tumori maligni.²⁵

In particolare, il coinvolgimento delle proteinchinasi nello sviluppo e mantenimento del tumore può avvenire attraverso:

- un riarrangiamento genomico, incluse traslocazioni cromosomiali che generano proteine di fusione (come la proteina Bcr-Abl);
- mutazioni che portano ad un'attivazione costitutiva dell'attività chinastica (come succede per c-kit, il recettore per *Stem Cell Factor*);
- una de-regolazione dell'attività chinastica attraverso l'attivazione di oncogeni o la perdita dei soppressori del tumore;
- una de-regolazione dell'attività chinastica causata da una sovra-espressione di TK, come nel caso di EGFR: l'effetto trasformante è ascrivibile ad un aumento dell'attività enzimatica in parte dovuto alla maggiore frequenza di dimerizzazione, che ha come risultato l'alterazione sia qualitativa che quantitativa della cascata del segnale;
- un'espressione autocrina dei fattori di crescita (EGF, VEGF e FGF) che può contribuire allo sviluppo e al mantenimento del fenotipo neoplastico.

Molte tirosinchinasi vengono espresse nei tumori e possono essere attivate da varie mutazioni, come nel caso già citato di Bcr-Abl. Anche modifiche nella sequenza nucleotidica di geni per il dominio trans-membrana possono indurre un'iperattivazione chinastica ligando-indipendente; delezioni nel dominio extracellulare, invece, inducono un'attivazione oncogenica e, infine, mutazioni nel sito di *binding* del fosfato portano ad una de-regolazione enzimatica.⁴⁰ tutti questi segnali si traducono in segnali oncogenici e portano quindi alla crescita neoplastica.²⁴

3.4. INIBITORI TIROSINCHINASICI

Il grande interesse nei confronti delle chinasi come *target* per lo sviluppo di farmaci antitumorali è dovuta a diversi fattori:

- I. approssimativamente, ogni processo di trasduzione del segnale avviene attraverso il trasferimento di gruppi fosfato che è mediato dalle chinasi, suggerendo come l'inibizione dell'attività chinasica possa dare origine ad una risposta apprezzabile;
- II. nonostante l'alto grado di conservazione del sito di *binding* dell'ATP, esistono delle peculiari differenze che rendono possibile sviluppare molecole in grado di inibire selettivamente determinate chinasi;
- III. l'inibizione dell'attività enzimatica delle chinasi viene tollerata sorprendentemente bene dalle cellule sane; gli inibitori delle TK hanno infatti una finestra terapeutica piuttosto ampia; ad esempio, Dasatinib, recentemente approvato per la CML Gleevec®-resistente, pur inibendo tutti e 9 i membri della famiglia di Src, presenta un profilo di sicurezza migliore rispetto ai chemioterapici classici;
- IV. farmaci come il Gleevec® hanno un elevato profilo di successo, con una risposta positiva nell'80% dei casi di pazienti con CML in fase cronica.⁴⁴

Le TK, e in particolare le RTK sono quindi ottimi *target* nella terapia anti-tumorale. Attualmente, nella pratica clinica, l'inibizione delle RTK può venir ottenuta mediante due diverse strategie: l'utilizzo degli anticorpi monoclonali o la somministrazione di piccole molecole organiche ad azione ATP-mimetica. mAb e TKI (*Tyrosine Kinase Inhibitors*) interferiscono con l'attività delle RTK con meccanismi differenti: mAb diretti contro il dominio extra-cellulare dei recettori o contro i ligandi stessi non hanno bisogno di essere internalizzati nella cellula tumorale per esercitare la loro attività inibitoria. Al contrario, i TKI si legano al dominio chinasico intracellulare delle proteine, nel sito di *binding* dell'ATP, e devono quindi attraversare la membrana. A causa del diverso sito d'azione, queste due classi di farmaci mostrano anche un diverso meccanismo d'azione: mAb diretti contro il recettore possono attivare l'inibizione in modo diverso a seconda del sito bersaglio, ma hanno come effetto comune quello di portare all'internalizzazione del recettore e contribuire alla sua *down-regulation*, che diventa particolarmente efficace quando l'attivazione delle RTK è causata da una loro sovra-espressione. Inoltre la

somministrazione di mAb ha il vantaggio esclusivo di poter evocare una risposta immunitaria, anche se il contributo di questa attività è difficile da quantificare.⁴⁶

I TKI agiscono invece bloccando il sito di *binding* dell'ATP nel dominio catalitico, prevenendo l'autofosforilazione del recettore e l'attivazione della cascata del segnale intracellulare. I TKI competono con l'ATP, che è presente in elevata concentrazione nella cellula, e quindi vengono somministrati a dosaggi elevati. Tuttavia, nella prospettiva di un approccio multi-*target*, i TKI sono i candidati ideali per la loro capacità di legarsi a RTK diverse e a TK citoplasmatiche, poiché la struttura della tasca di *binding* dell'ATP è altamente conservata tra le varie famiglie di tirosinchinasi. Al contrario, gli anticorpi monoclonali sono, per definizione, agenti *single-target* per la specificità del riconoscimento del sito *binding* che è univoco.⁴⁶

3.4.1. ANTICORPI MONOCLONALI

L'unicità strutturale dei domini extracellulari dei recettori è stata utile nel creare specifici mAb che potessero riconoscere e inibire uno specifico *target*. Questi anticorpi possono svolgere la loro funzione in più modi: impedendo il *binding* con il ligando, inibendo la dimerizzazione del recettore o favorendo la degradazione del recettore stesso. Herceptin® è stato il primo mAb diretto contro HER-2 e viene impiegato in terapia nel trattamento del tumore al seno sovra-esprimente questa TK. Un altro mAb entrato in terapia è Cetuximab (Erbix®) diretto contro EGFR, che agisce impedendo il *binding* del fattore di crescita al recettore; è stato approvato in combinazione con la radioterapia nel trattamento del SCCHN (*Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*), ma anche nel cancro al colon metastatico.⁴⁰

3.4.2. INIBITORI TIROSINCHINASICI ATP-MIMETICI

La risoluzione mediante cristallografia ai raggi-X dei complessi fra TK e ATP ha permesso la determinazione delle interazioni che si instaurano tra sito catalitico e substrato (Figura 10). Di conseguenza, quindi, è stato anche possibile sviluppare molecole in grado di inibire in maniera specifica proteine ad attività tirosinchinasica.²⁰

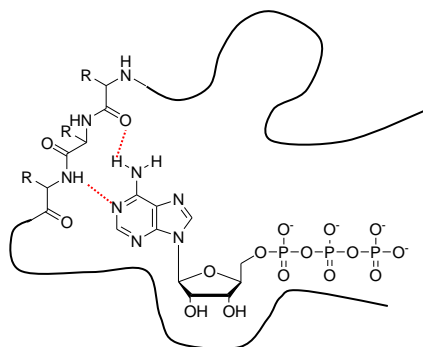


Figura 10. Rappresentazione schematica del sito catalitico delle tirosinchinasi.

La porzione purinica dell'ATP instaura due legami ad idrogeno con lo scheletro della proteina. Il residuo di ribosio viene alloggiato in una cavità nota come tasca per il ribosio, mentre il terminale trifosfato interagisce con due ioni magnesio e con numerosi amminoacidi. La tasca per l'ATP presenta anche diverse regioni normalmente libere, ma di notevole importanza dal punto di vista chimico-farmaceutico. Una di queste zone è nota come superficie di specificità, mentre un'altra consiste in una tasca idrofobica (opposta alla tasca per il ribosio) che l'ATP non occupa.²¹ All'ingresso di questa tasca idrofobica è presente un importante residuo amminoacidico, chiamato *gatekeeper* che, in alcune chinasi, genera un elevato ingombro sterico, rendendo impossibile l'accesso alla tasca. Per contro, in altre chinasi, il *gatekeeper* è più piccolo e permette di accedere alla tasca stessa. Tali differenze si possono sfruttare per l'ottenimento di inibitori selettivi per le varie classi di TK.²⁰

I TKI possono legarsi alle chinasi in modo reversibile o irreversibile. Gli inibitori reversibili si legano tipicamente al sito di *binding* dell'ATP con la chinasi in conformazione attiva (inibitori di tipo I) o inattiva (inibitori di tipo II). Gli inibitori irreversibili possiedono di solito gruppi funzionali elettrofilici come funzioni carboniliche α,β -insature e cloro/fluorometil carbonili, in grado di reagire con il residuo tiolico nucleofilo di una Cys presente nel sito attivo.⁴⁷

Inizialmente la ricerca di TKI si era concentrata sui recettori della famiglia ErbB, in particolare EGFR:⁴⁸ i derivati chinazolinici (Figura 11) hanno avuto un enorme interesse negli ultimi anni per le loro molteplici attività biologiche, soprattutto come inibitori di chinasi:⁴⁹ Con l'identificazione della struttura 4-anilinochinazolinica è stato fatto un grande passo in avanti in termini di potenza e selettività di questi inibitori.⁴⁸ La prima generazione di derivati chinazolinici, come PD153035, aveva dimostrato un'elevata affinità per EGFR ma poca attività *in vivo*.

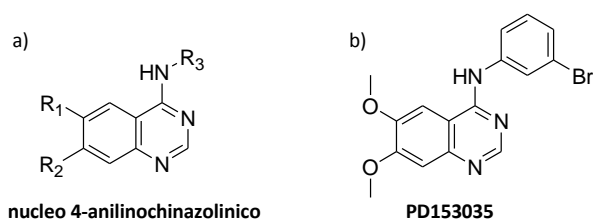


Figura 11. a) struttura generale di una 4-anilinochinazolina; b) struttura di PD153035.

In seguito, lo sviluppo di molecole come Gefitinib (Iressa®) e Erlotinib (Tarceva®), ha portato ai primi successi in ambito clinico. Lo *scaffold* 4-anilinochinazolinico si è dimostrato in grado sia di portare a inibizione selettiva di EGFR (come nel caso di Gefitinib e Erlotinib), sia di consentire lo sviluppo di molecole *multi-target* (come Vandetanib e Lapatinib), cioè di molecole in grado di inibire contemporaneamente più TK.⁵⁰

Mediante le strutture cristallografiche di TKI complessati con i recettori bersaglio è stato possibile determinare i punti di interazione *farmaco-target* (Figura 12).

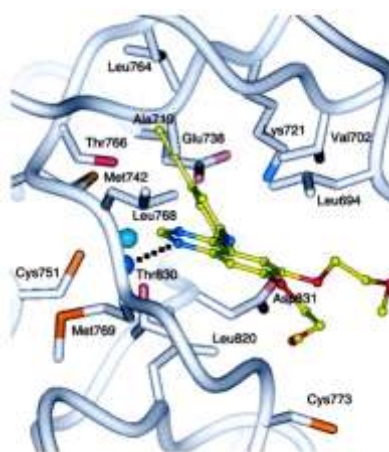


Figura 12. Interazione di Erlotinib con EGFR.²¹

In particolare, per quanto riguarda l'interazione Erlotinib-EGFR, l'azoto in posizione 1 della chinazolina forma un legame idrogeno con l'NH ammidico della Met769; una molecola d'acqua funge da ponte nel formare legami a idrogeno tra l'azoto in posizione 3 dell'anello chinazolinico e l'ossidrile della Thr766. La funzione anilina, inoltre, è orientata in modo da posizionare la funzione acetilenica verso la tasca idrofobica della chinasi.²¹ Le stesse interazioni sono confermate anche dalle strutture cristallografiche di Lapatinib e Gefitinib complessati con EGFR. Ulteriori studi di tipo 3D-QSAR sui derivati

anilinochinazolinici hanno, inoltre, permesso di delineare degli esaustivi rapporti struttura-attività (Figura 13).⁴⁸

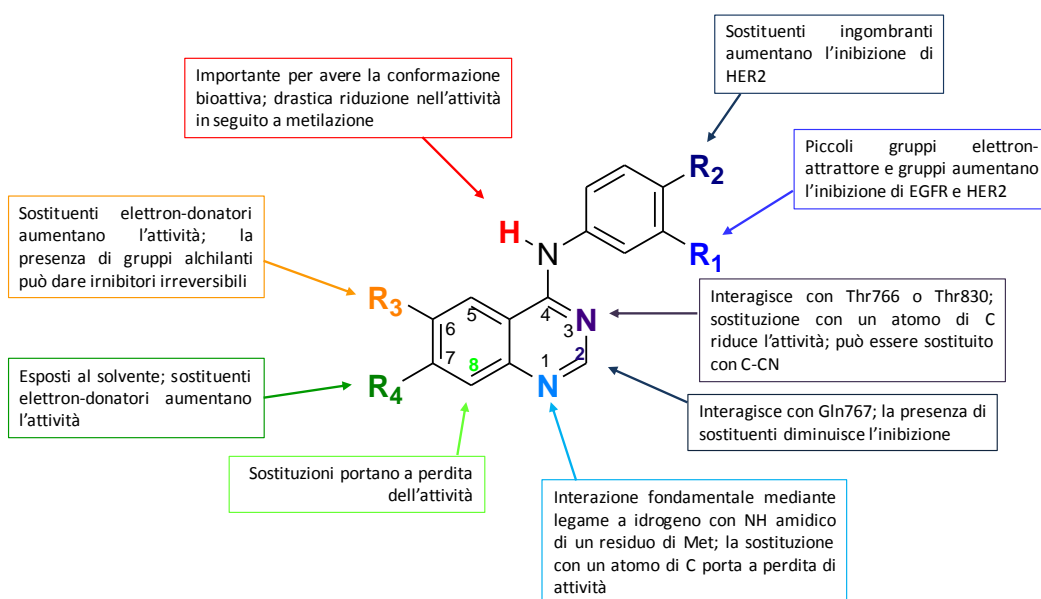


Figura 13. Relazioni struttura-attività di 4-anilinochinazoline (adattata da Fry⁴⁸).

Partendo dalle informazioni ricavate dagli studi cristallografici, sono stati anche individuati nuovi *template* strutturali in grado di mantenere le interazioni fondamentali con la tasca dell'ATP. Tra gli *scaffold* che hanno permesso lo sviluppo delle molecole più interessanti ci sono i nuclei pirido-pirimidinico, pirimido-indolinico, pirazolo-pirimidinico (Figura 14) ed alcune molecole tricicliche (come imidazo-chinazoline e pirrolo-chinazoline).⁴⁸

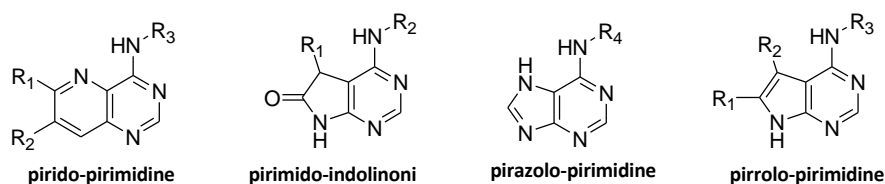


Figura 14. Strutture a scaffold pirimidinico.

Gli sforzi fatti per identificare farmaci che inibiscano i segnali chiave coinvolti nella patogenesi del cancro hanno portato allo sviluppo di molti agenti (mAb e TKI) che hanno dimostrato un'eccellente attività antitumorale con profili di citotossicità accettabili e che hanno migliorato la qualità di vita e la sopravvivenza di molti pazienti oncologici.⁵⁰

Dal 2001 (anno dell'immissione in commercio del Gleevec®) ad oggi la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato 4 mAb e 12 TKI per la cura di diverse tipologie di cancro (Tabella 1).

FARMACO	SPECIALITA'	CLASSE	TARGET	APPROVATI PER
Bevacizumab	Avastin®	mAb	VEGFR2	Glioblastoma, NSCLC, metastasi del cancro alla mammella, metastasi del CRC, rene metastatico.
Panitumumab	Vectibix®	mAb	EGFR	Metastasi del cancro al colon.
Cetuximab	Erbitux®	mAb	EGFR	Carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, CRC.
Trastuzumab	Herceptin®	mAb	HER2	Adenocarcinoma della giunzione gastrica o gastroesofagea, cancro alla mammella che sovraesprime HER2.
Imatinib	Gleevec®	TKI	ABL, KIT, PDGFRβ	GIST, Leucemia, dermatofibrosarcoma, sindrome mielodisplasica/mieloproliferativa, mastocitosi sistemica.
Gefitinib	Iressa®	TKI	EGFR	NSCLC.
Erlotinib	Tarceva®	TKI	EGFR	NSCLC, cancro al pancreas.
Lapatinib	Tykerb®	TKI	EGFR, HER2	Cancro metastatico alla mammella.
Nilotinib	Tasigna®	TKI	Abi	CML.
Dasatinib	Sprycell®	TKI	ABL, EPHA2, FYN, KIT, LCK, PDGFRβ, SRC, YES	CML, Leucemia linfoblastica acuta.
Pazopanib	Votrient®	TKI	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, C-kit, PDGFRα e β	Carcinoma delle cellule renali in stadio avanzato.
Sunitinib	Sutent®	TKI	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, CSF1R, FLT3, KIT, PDGFR α e β, RET	Carcinoma metastatico alle cellule renali, GIST resistente all'imatinib, tumori neuroendocrini del pancreas.
Sorafenib	Nexavar®	TKI	PDGFRα e β, KIT, RAF1, VEGFR-2, VEGFR-3	Carcinoma delle cellule renali in stadio avanzato, carcinoma epatocellulare.
Vandetanib	Zactima®	TKI	EGFR, VEGFR-2, RET	Carcinoma midollare della tiroide.
Vemurafenib	Zelboraf®	TKI	RAF	Melanoma.
Crizotinib	Xalkori®	TKI	ALK	NSCLC.

Tabella 1. Farmaci antitumorali in grado di inibire l'azione delle TK fino ad oggi approvati.

Tabella adattata da <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>.

NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer, tumore del polmone a cellule non piccole;

CRC: Colorectal Cancer, cancro del colon retto;

GIST: GastroIntestinal Stromal Tumor, tumore stromale gastrointestinale;

CML: Chronic Myelogenous Leukemia, leucemia mieloide cronica.

3.5. RESISTENZA AGLI INIBITORI TIROSINCHINASICI ATP-MIMETICI

A dispetto di un sorprendente successo terapeutico iniziale di Gefitinib e Erlotinib in pazienti con NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*), è stato riscontrato che, dopo non molto tempo, questi inibitori vanno rapidamente incontro a problemi di resistenza dovuti ad una particolare mutazione (T790M).^{40,51}

Allo stesso modo, anche nel trattamento della CML con il Gleevec®, si può assistere a insorgenza di resistenza. Nei pazienti con CML positivi al cromosoma Philadelphia in fase di crisi blastica è stata riscontrata un'aumentata attività di Bcr/Abl nonostante la terapia con il Gleevec® e il trattamento di questa patologia ha cominciato ad essere problematico.⁴⁰

Diventa quindi necessario conoscere i meccanismi di resistenza per mettere in atto e studiare le opportune strategie per diminuirne l'insorgenza.⁵² La resistenza ai farmaci può essere causata da diversi meccanismi tra i quali un'aumentata produzione del *target*, alterazioni nella struttura della proteina-bersaglio, diminuito *up-take* del farmaco e un'aumentata detossificazione.⁴⁰

Nel tentativo di superare l'insorgenza di resistenza, le compagnie farmaceutiche stanno cercando combinazioni di terapie sempre più potenti e inibitori che abbiano come bersaglio più tirosinchinasi. Attualmente sono in fase clinica molte combinazioni fra inibitori tirosinchinasi con mAb o con chemioterapici classici.

I tentativi di superare la resistenza al Gleevec® hanno portato alla scoperta di Nilotinib, un nuovo inibitore di Bcr/Abl, circa 30 volte più potente del Gleevec® e in grado di superare la maggior parte delle mutazioni di Bcr/Abl che portano alla resistenza verso il questo farmaco.⁴⁰

La resistenza che insorge in seguito alla somministrazione di Gefitinib e Erlotinib ha anche posto l'attenzione sullo sviluppo di inibitori irreversibili. La maggior parte di questo tipo di composti presenta uno scaffold 4-anilinochinazolinico: nei *clinical trials* sono presenti Canertinib (fase II) e Afatinib (fase III) (Figura 15). A dispetto delle difficoltà spesso associate ai farmaci che legano covalentemente il/i proprio/i *target*, come una potenziale cross-reattività con altri bersagli molecolari, questi composti sono promettenti candidati farmaci poiché spostano l'equilibrio fisiologico tra ATP e chinasi-*target* bloccando in modo permanente l'attività catalitica dell'enzima.⁵³

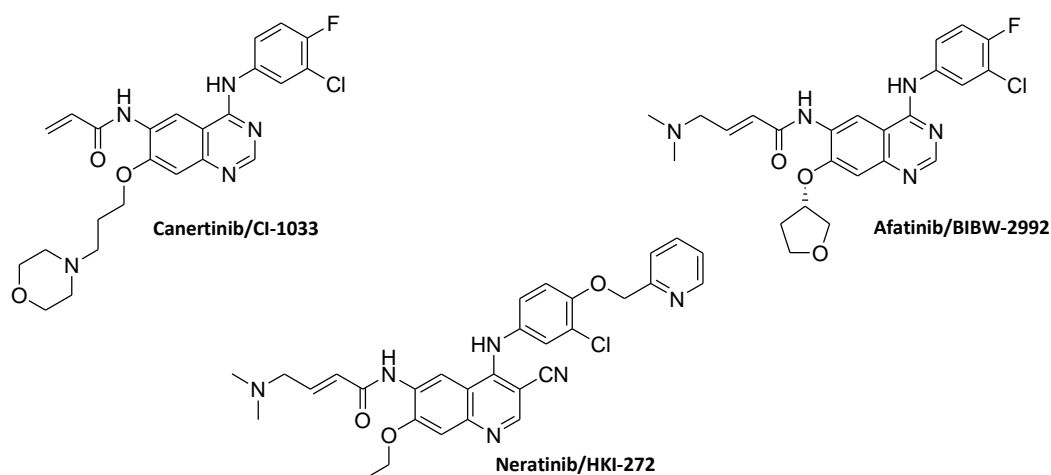


Figura 15. Strutture di inibitori irreversibili in fasi cliniche: Canertinib, Afatinib e Neratinib.

Per questo motivo, si comportano da inibitori ATP-non competitivi legando covalentemente e irreversibilmente la chinasi e rappresentano un vantaggio in presenza di elevate concentrazioni intracellulari di ATP. Inoltre, questi inibitori rimangono nel sito attivo della chinasi e restano attivi sulle cellule tumorali anche quando i livelli plasmatici scendono dopo la somministrazione dei composti: questo aspetto diventa particolarmente importante data la breve emivita del complesso EGF/EGFR. Un altro punto importante è la capacità di questi composti di sfruttare il gruppo sulfidrilico di una Cys particolarmente reattiva, presente all'entrata della tasca di *binding* dell'ATP che si trova in tutti i membri della famiglia ErbB e in poche altre chinasi, rendendoli inibitori duali di EGFR e HER-2. Questo aspetto porta al loro meccanismo di azione un valore aggiunto visto che spesso il partner di dimerizzazione di EGFR nei tumori è HER-2.⁵³ Vari inibitori irreversibili sono attualmente in fase di valutazione clinica per il trattamento di NSCLC: Afatinib (BIBW2992) (Boehringer Ingelheim; Ingelheim, Germania) inibitore di EGFR/HER2, Canertinib (CI-1033, PD183805, Pfizer Inc, New Jersey, US) che inibisce tutti e quattro i membri della famiglia ErbB e Neratinib (Pfizer; New London, CT, US), attivo nei confronti di EGFR/HER-2.⁵⁴

Un altro tipo di approccio per superare i fenomeni di resistenza è lo sviluppo di singoli inibitori che abbiano come *target* più tirosinchinasici, obiettivo che può essere raggiunto solo con molecole ATP-mimetiche: GlaxoSmithKline ha per esempio sviluppato Lapatinib, inibitore di EGFR ed HER-2 e ha dato buoni risultati nel tumore al seno metastatico; Pfizer ha, invece, sviluppato Sunitinib che ha 4 diverse chinasi come *target*.⁴³ Vandetanib, prodotto dall'Astra Zeneca, è un inibitore duale di EGFR e VEGFR-2 (Figura 16).

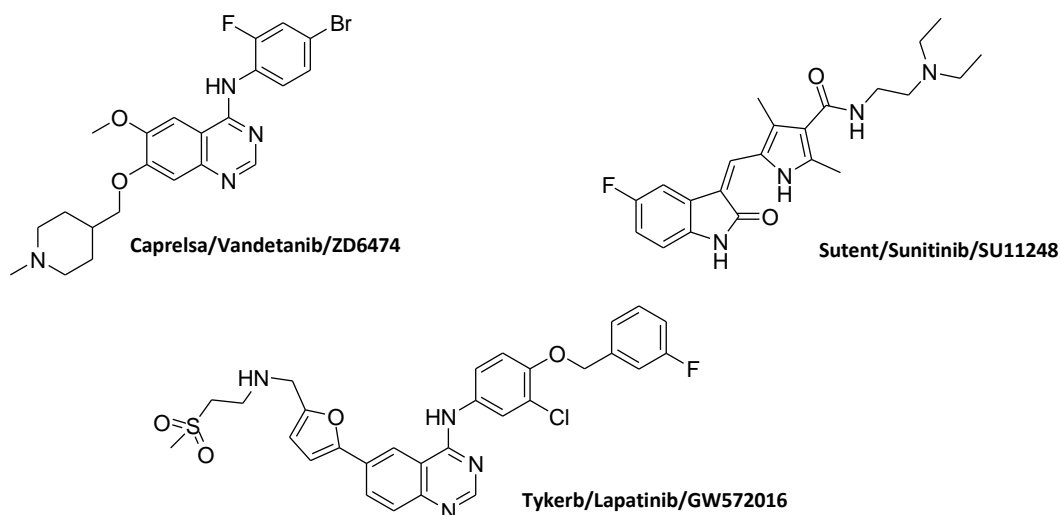


Figura 16. Strutture di alcuni inibitori multi-target approvati.

La principale preoccupazione per quanto riguarda gli agenti multi-*target* sono gli effetti collaterali che possono causare: “Una terapia ad ampio spettro può essere molto più efficace, ma ha come prezzo da pagare una maggiore tossicità” (D. Parkinson, capo del reparto sviluppo in clinica oncologica alla Amgen).

Nonostante le problematiche che riguardano lo sviluppo della resistenza, le piccole molecole che inibiscono le tirosinchinasi potrebbero essere assunte per l'intera durata della vita del paziente, poiché non eradicano definitivamente il tumore e non hanno effetti collaterali particolarmente severi, diversamente dai farmaci della chemioterapia tradizionale. McMahon, vice-presidente del settore *drug discovery* della Sugen, pensa che la relativa sicurezza di questo tipo di molecole sia dovuta al fatto che si legano al proprio *target* in un unico modo, essendo per la maggior parte ATP-mimetiche. Sunitinib occupa parte della tasca dell'ATP, ma la maggior parte degli effetti inibitori sono dovuti a interazioni più deboli con altre regioni dei recettori. Si lega quindi ad uno specifico *subset* di chinasi e questo può spiegare i ridotti effetti collaterali sulle altre 500 chinasi, molte delle quali sono coinvolte in processi biologici cruciali.⁴³

I risultati ottenuti con i TKI ATP-mimetici sono soddisfacenti in termini di efficacia terapeutica e bassa tossicità ma anche e soprattutto per il fatto che sono stati fatti molti passi in avanti in pochi anni. Tuttavia la ricerca in questo campo non si è fermata, anzi, è in continua evoluzione per scoprire nuove molecole che superino soprattutto i problemi di resistenza riscontrati finora.

4. OBIETTIVO

Le tirosinchinasi sono emerse, negli ultimi anni, come uno dei *target* molecolari più studiati. Tali enzimi sono infatti coinvolti nel controllo di molti processi fondamentali per la regolazione del ciclo cellulare, e risultano sovra-espressi in quasi tutti i tipi di tumore.

L'interesse crescente verso queste proteine ha portato allo sviluppo e all'approvazione di diversi inibitori ATP-mimetici per la terapia anticancro. La ricerca di nuove molecole a potenziale attività antitumorale è un ambito di ricerca di notevole interesse. In particolare, recenti studi hanno messo in luce come molecole in grado di inibire contemporaneamente più tirosinchinasi, presentino minore probabilità di andare incontro a resistenza e siano quindi di maggior interesse rispetto a molecole estremamente selettive. In tale contesto si inserisce questo lavoro, il cui obiettivo si può riassumere nei due punti seguenti:

- progettazione e sintesi di nuove molecole ATP-mimetiche a struttura chinazolinica che si differenzieranno per i sostituenti in posizione 6, 7 o 4 rispetto al composto **2** (figura 17) preso come riferimento per le modifiche strutturali operate. Tutti i derivati verranno sintetizzati seguendo una metodica generale per la formazione del nucleo chinazolinico messa a punto precedentemente da questo gruppo di ricerca.¹

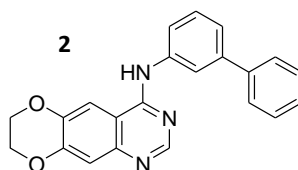


Figura 17. Struttura del composto **2**.

- valutazione biologica di tutti i composti sintetizzati. Per la valutazione dell'attività antitumorale verranno utilizzate inizialmente due linee cellulari, A431 (cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano che sovra-esprimono EGFR²) e NIH3T3 (fibroblasti murini di origine embrionale non esprimenti EGFR).⁵⁵ Successivamente verrà valutata sia *in vitro* che *in vivo* l'attività antiangiogenica di tali derivati e la loro capacità di contrastare gli effetti proangiogenici di citochine esogene. Infine si provvederà ad ampliare il pannello di linee tumorali (MCF-7, HT-

29, HeLa e HepG2) sulle quali verrà valutata l'attività antitumorale dei composti e verranno prese in considerazione più tirosinchinasi per studiare la capacità dei derivati di inibire l'azione catalitica di questi enzimi.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

La prima parte del progetto di questa tesi di dottorato ha riguardato la sintesi di nuovi potenziali TKI a struttura 4-amminochinazolinica.

I composti sintetizzati sono stati progettati a partire da tre composti (Figura 18), precedentemente sviluppati dai gruppi di ricerca in cui questa tesi è stata svolta, che avevano mostrato una spiccata attività citotossica nei confronti delle linee cellulari A431 e NIH3T3 ed erano risultati in grado di inibire *in vitro* alcuni *step* fondamentali del processo angiogenico.

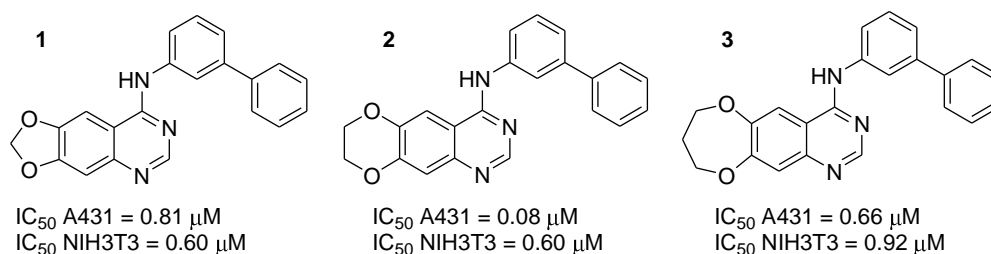


Figura 18. Strutture e IC₅₀ dei lead compounds precedentemente studiati.

I composti **1-3** sono caratterizzati dalla condensazione di un anello diossigenato nelle posizioni 6 e 7 del nucleo chinazolinico e dalla funzionalizzazione in posizione 4 con un sostituito amminobifenilico. Di particolare interesse era risultata proprio la funzione amminobifenilica: gli analoghi dei composti **1-3** con un sostituito di natura anilina in posizione 4 (3-metilnilina, 3-bromoanilina, 2-fluoro-4-bromoanilina, 3-cloro-4-fluoroanilina), infatti, erano risultati da 10 a 100 volte meno citotossici.⁵⁶

Partendo, quindi, da questi dati preliminari sul composto **2**, sono stati apportati quattro tipi di modifiche strutturali, ottenendo così quattro nuove classi di composti:

Classe 1: è stata mantenuta la porzione amminobifenilica (oppure l'anello aromatico in posizione 3' è stato sostituito con il tiofene quale isostero classico), mentre nelle posizioni 6 e 7 del nucleo chinazolinico sono state condensate le catene laterali di due farmaci noti (Erlotinib e Gefitinib) e di PD153035 (Figura 19);

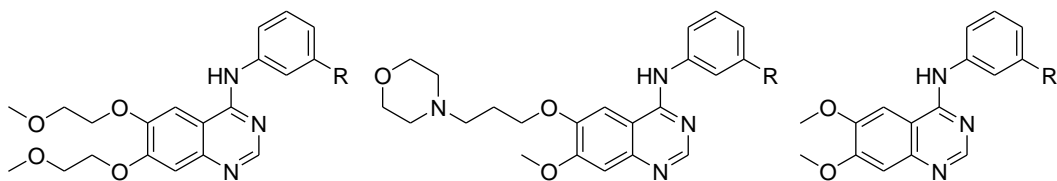


Figura 19. Struttura generale dei composti della classe 1.

Classe 2: è stato mantenuto il nucleo diossanico e sono state fatte modifiche solo a livello del sostituente in posizione 4, condensando diversi sostituenti amminoeterobiarilici (Figura 20);

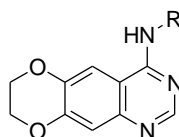


Figura 20. Struttura generale dei composti della classe 2.

Classe 3: in posizione 6 e 7 sono state condensate delle funzioni alliliche allo scopo di ottenere potenziali inibitori irreversibili (Figura 21);

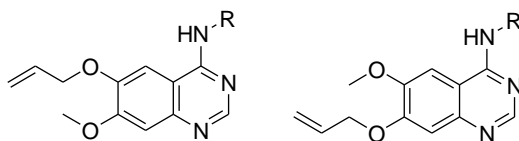


Figura 21. Struttura generale dei composti della classe 3.

Classe 4: il ponte amminico è stato sostituito con un ponte etereo (Figura 22).

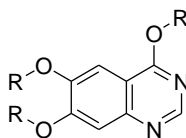
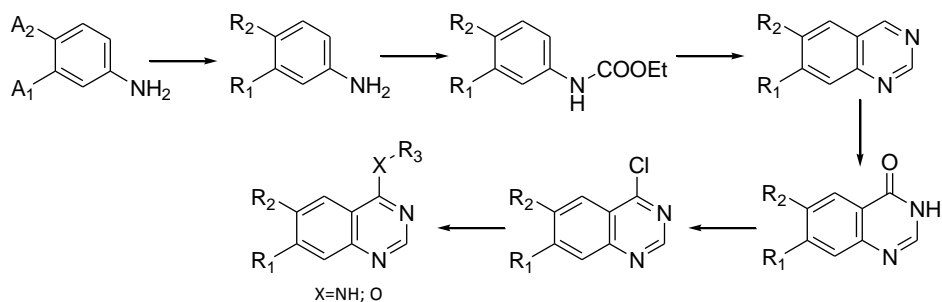


Figura 22. Struttura generale dei composti della classe 4.

In ogni caso, la strategia utilizzata per la preparazione dei composti a struttura chinazolinica è stata caratterizzata dai seguenti passaggi sintetici (Schema 1):

- a) ottenimento di un derivato anilnico opportunamente funzionalizzato;
- b) protezione del gruppo amminico come etil carbammato;
- c) ciclizzazione a derivato chinazolinico;
- d) ossidazione a chinazolinone;
- e) funzionalizzazione a derivato clorochinazolinico;
- f) condensazione finale con l'opportuno derivato aromatico.



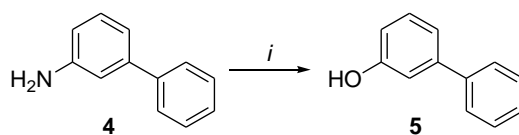
Schema 1. Strategia generale di sintesi per l'ottenimento dei composti progettati.

Per quanto riguarda i sostituenti in posizione 4 del nucleo chinazolinico, la maggior parte dei derivati *m*-amminobiarilici considerati non è commercialmente disponibile, quindi è stato necessario studiare e mettere a punto diverse strategie sintetiche per il loro ottenimento.

5.1. SINTESI DEI SOSTITUENTI IN POSIZIONE 4

5.1.1. SINTESI DI 3-IDROSSIBIFENILE

La sintesi del 3-idrossibifenile (**5**) è stata ottenuta a partire dal 3-amminobifenile (**4**) mediante reazione di diazotazione e successiva idrolisi in ambiente acido per acido solforico (Schema 2).



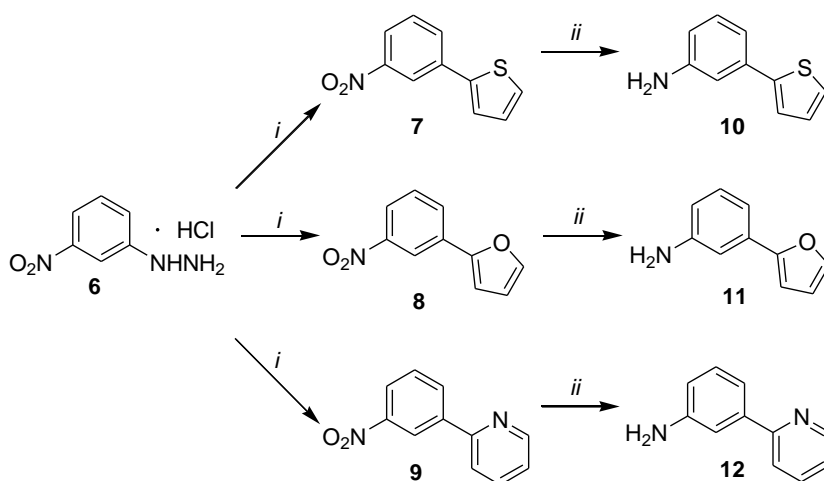
Schema 2. Sintesi di 3-idrossibifenile. Condizioni di reazione:

- i. 1) H_2SO_4 , ghiaccio, $NaNO_2$, 10 minuti;
- 2) H_2SO_4 , H_2O , $160^\circ C$, 15 minuti, resa 48%.

5.1.2. SINTESI DI DERIVATI *m*-ETEROARILANILINICI

I derivati *m*-eteroarilanilini progettati sono stati ottenuti con due vie sintetiche differenti.

I composti in cui un anello benzenico del bifenile è sostituito con furano, tiofene o piridina, rispettivamente **10**, **11** e **12**, sono stati ottenuti utilizzando come prodotto di partenza la 3-nitrofenilidrazina cloridrato (**6**) (Schema 3).

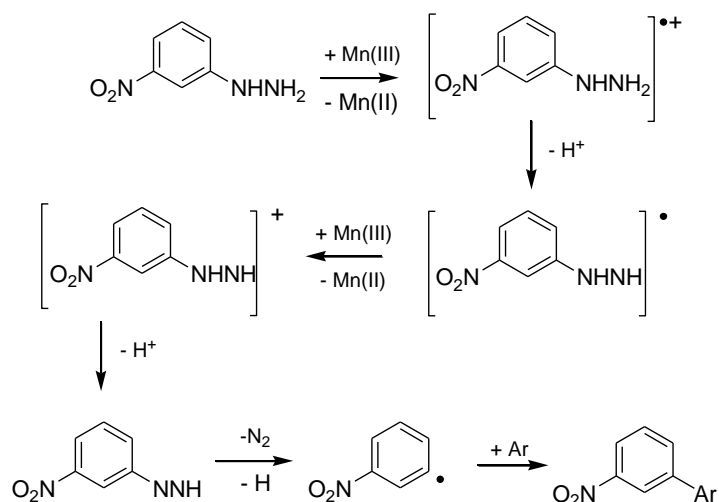


Schema 3. Sintesi di derivati *m*-eteroarilanilini. Condizioni di reazione:

- i. $Mn(OAc)_3$, eteroarile, riflusso, 2 - 4 ore, rese da 25 a 100%.
- ii. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, riflusso, 2 ore, rese da 57% a 80%.

La 3-nitrofenilidrazina cloridrato (**6**) è stata posta a riflusso in presenza di manganese acetato e dell'eterociclo desiderato, ottenendo gli intermedi **7**, **8** e **9**.

Tale reazione procede con meccanismo di tipo radicalico: lo ione manganese trivalente agisce da specie ossidante, portando alla formazione di un radicale fenilidrazinico, che, per perdita di azoto, si trasforma in radicale benzenico. Quest'ultimo va infine incontro a condensazione con l'eterociclo, formando il prodotto desiderato (Schema 4).



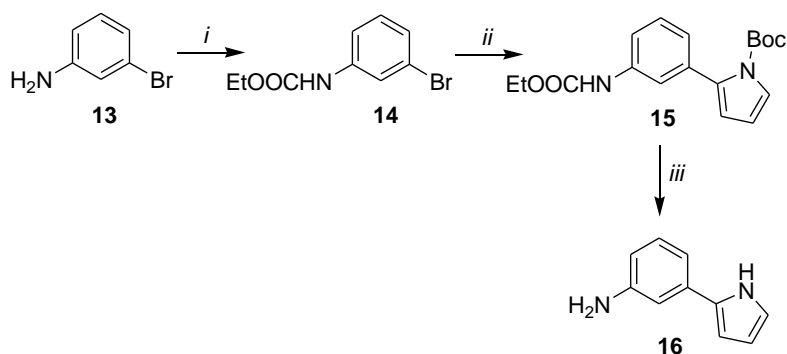
Schema 4. Meccanismo radicalico proposto per la reazione di copulazione.

Nella reazione l'eterociclo aromatico funge sia da reagente che da solvente. Per tentare di ridurre la quantità di eterociclo necessaria è stata sperimentata la diluizione con un diverso solvente. Per questo motivo, la sintesi del 3-(furan-2'-il)nitrobenzene (**8**) è stata tentata in tetraidrofurano, riducendo la quantità di furano, senza tuttavia assistere alla formazione di alcun prodotto di reazione.

La condensazione con furano e tiofene si è dimostrata totalmente regioselettiva: sono stati infatti ottenuti solamente i composti di condensazione in posizione 2 dell'eteroarile. Al contrario, la reazione con piridina, ha portato ad una miscela di prodotti di condensazione, da cui è stato comunque possibile isolare il composto desiderato **9**.

Le 3-(eteroaril)aniline **10**, **11** e **12** sono state infine ottenute dai corrispondenti nitroderivati **7**, **8**, **9** per trattamento con stagno cloruro in etanolo a refluxo.

Per l'ottenimento della 3-(pirrol-2'-il)anilina (**16**) è stato invece utilizzato un diverso approccio sintetico (Schema 5).

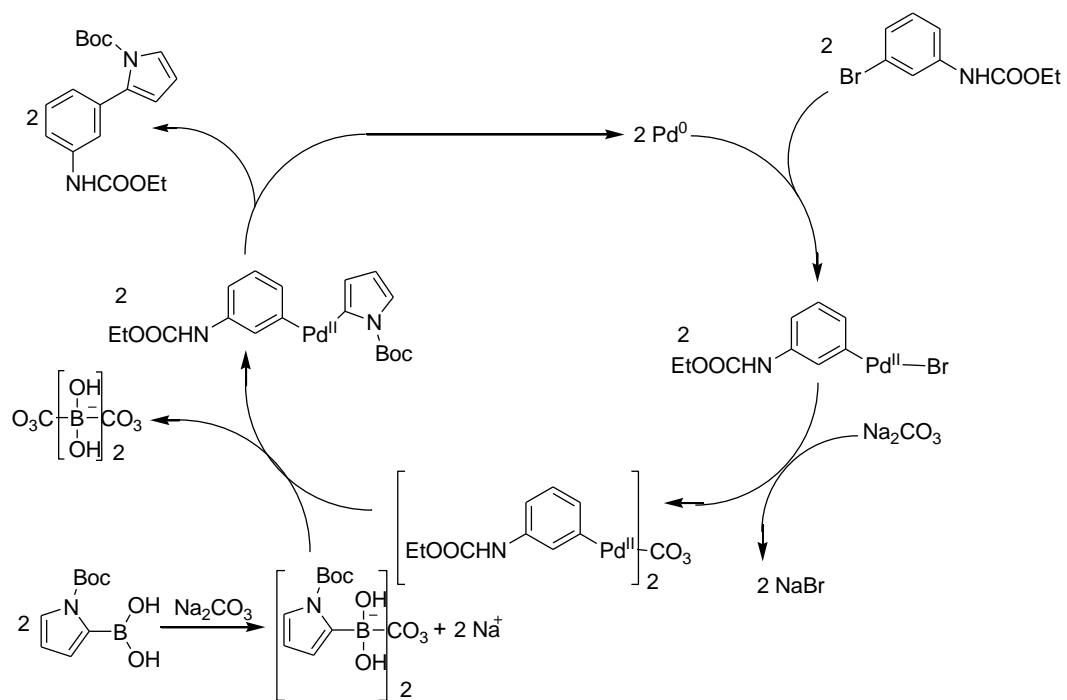


Schema 5. Sintesi di 3-(pirrol-2'-il)anilina. Condizioni di reazione:

- i. ClCOOEt, TEA, THF, riflusso, 1 ora, resa 84%.
- ii. Acido N-Boc-2-pirrolilboronico, Na₂CO₃, H₂O, etilenglicole dimetiletere, Pd tetrakis, riflusso, 4 ore, resa 64%.
- iii. NaOH, H₂O, riflusso, 4 ore, resa quantitativa.

Come prodotto di partenza è stata utilizzata la 3-bromoanilina (**13**), il cui gruppo amminico è stato protetto sotto forma di etil carbammato, ottenendo il composto **14**. Su questo è stata eseguita la reazione di Suzuki con acido N-Boc-2-pirrolilboronico in etilenglicole dimetiletere, in presenza di sodio carbonato e palladio tetrakis(trifenilfosfina), ottenendo l'etile [3-(1'-terbutilossicarbonilpirrol-2'-il)fenil]carbammato (**15**).

Il meccanismo di tale reazione prevede anzitutto l'addizione ossidativa del palladio all'alogeno aromatico, con formazione di un complesso organo-palladio. L'alogeno viene quindi sostituito dallo ione alcalino presente nel mezzo di reazione, consentendo così la transmetallazione con il derivato boronico. Infine, l'eliminazione riduttiva porta alla contemporanea formazione del prodotto desiderato ed al ripristino del catalizzatore nella sua forma originaria (Schema 6).

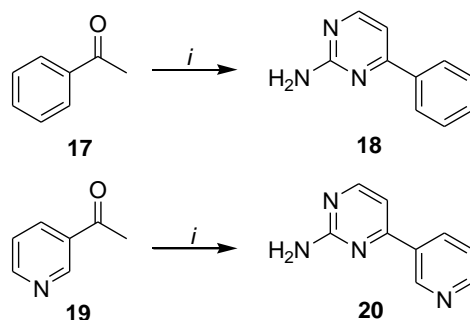


Schema 6. Meccanismo della reazione di Suzuki.

Il composto **15** è stato infine deprotetto per trattamento con una soluzione acquosa di potassio idrossido a refluxo, ottenendo la 3-(pirrol-2'-il)anilina (**16**).

5.1.3. SINTESI DI DERIVATI 2-AMMINO-4-ARILPIRIMIDINICI

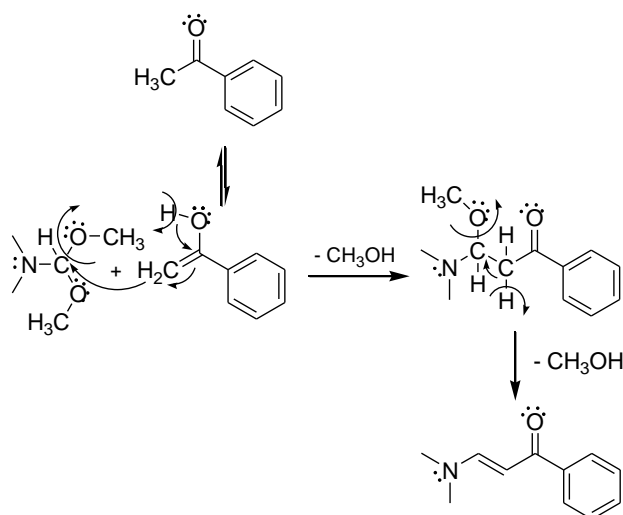
I derivati 2-ammino-4-arilpirimidinici sono stati ottenuti a partire dagli appropriati arilmetilchetoni (Schema 7).



Schema 7. Sintesi di derivati 2-ammino-4-arilpirimidinici. Condizioni di reazione:

- i.* 1) *N,N*-dimetilformammide dimetilacetale, MW, 200 °C, 4 minuti;
2) guanidina cloridrato, NaOEt/EtOH, MW, 170 °C, 10 minuti, rese 41% per **18**, 75% per **20**.

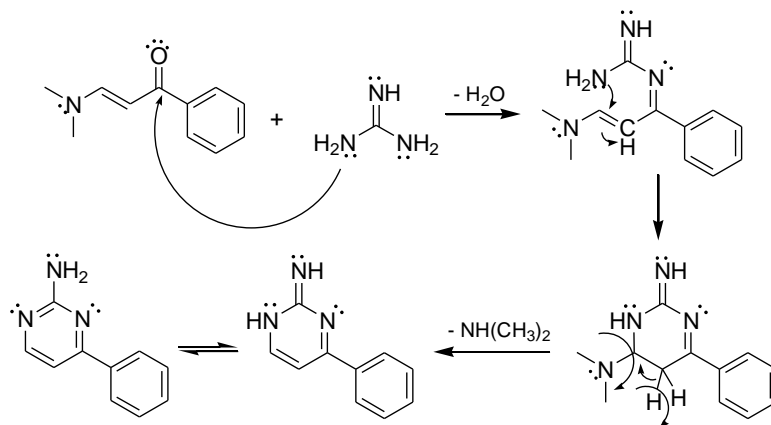
La strategia sintetica utilizzata ha previsto l'iniziale reazione del composto arilmetilchetonico **17** o **19** con dimetilformammide dimetilacetale. In tale *step* sintetico si ha l'attacco nucleofilo del metilene della forma enolica del derivato acetofenonico al carbonio in α alla funzione dimetilamminica, con eliminazione di due molecole di metanolo e formazione di un intermedio acrilfenonico (Schema 8).



Schema 8. Sintesi di 2-ammino-4-fenilpirimidina. Meccanismo di reazione del primo step.

Gli intermedi, non isolati dalle miscele di reazione, sono stati direttamente trattati con guanidina cloridrato, portando all'ottenimento dei corrispondenti derivati 2-ammino-4-fenilpirimidinici **18** e **20**. Questo secondo *step* sintetico passa attraverso la formazione di

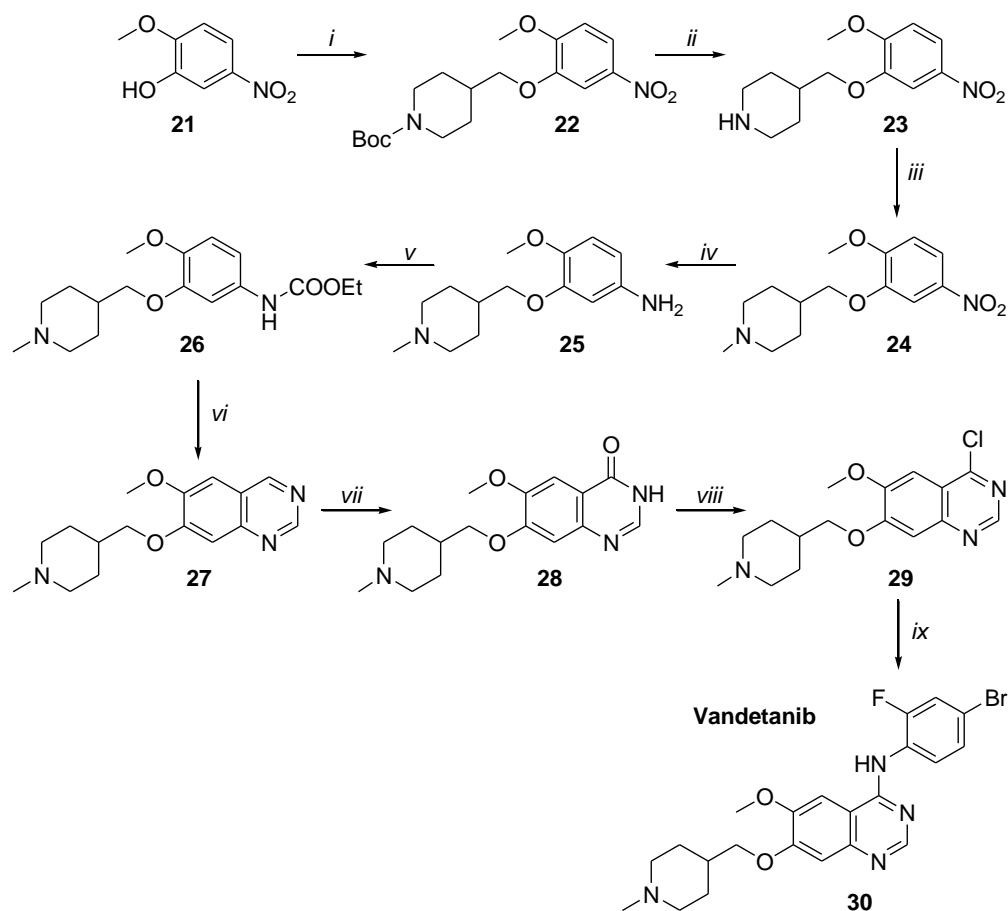
un legame imminico tra il carbonio carbonilico del derivato acrilfenonico ed un gruppo amminico della guanidina, con formazione di una base di Schiff. Quindi si assiste a ciclizzazione intramolecolare con eliminazione di acqua e di una molecola di dimetilammina, e conseguente formazione dell'anello pirimidinico (Schema 9).



Schema 9. Sintesi di 2-ammino-4-fenilpirimidina. Meccanismo di reazione del secondo step.

5.2. SINTESI DI VANDETANIB

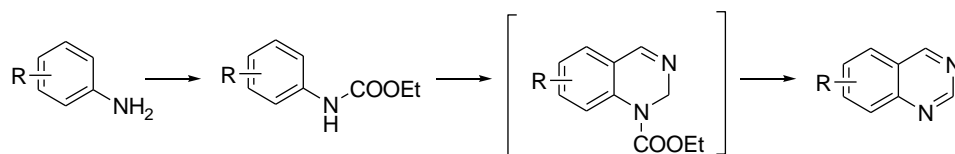
Per la sintesi di Vandetanib è stato utilizzato come prodotto di partenza il 3-idrossi-4-metossinitrobenzene (**21**) che è stato condensato con 1-Boc-4-(tosilossimetil)piperidina in ambiente anidro in presenza di dimetilformammide e potassio carbonato (Schema 10).



Schema 10. Sintesi di Vandetanib. Condizioni di reazione:

- i. DMF anidra, K_2CO_3 anidro, 1-Boc-4-(tosilossimetil)piperidina, riflusso, 8 ore, resa 93%.
- ii. TFA, CH_2Cl_2 , TA, 2 ore, resa 98%.
- iii. HCOOH, HCOH, MW, 90°C, 10 minuti, resa 89%.
- iv. $HCOONH_4$, Pd/C 10%, EtOH ass., riflusso, 2 ore, resa 98%.
- v. EtCOOEt, TEA, THF, TA, 1 ora, resa quantitativa.
- vi. 1) HTMA, TFA, MW, 110 °C, 10 minuti
2) KOH 10%, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/H₂O 1/1, riflusso, 5 ore, resa 90%.
- vii. CAN, AcOH, H₂O, TA, resa 90%.
- viii. DMF, $SOCl_2$, riflusso, 1 ora, resa quantitativa.
- ix. 4-bromo-2-fluoro-anilina, ⁱPrOH, MW, 80 °C, 15 minuti, resa 89%.

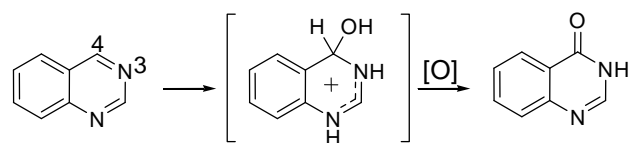
La deprotezione del gruppo amminico del nitroderivato **22** è stata eseguita per trattamento con acido trifluoroacetico, portando all'ottenimento del composto **23**, che è stato successivamente *N*-metilato per trattamento con acido formico e formaldeide. Il nitrogruppo del composto **24** è stato ridotto con ammonio formiato e Pd/C al 10% in etanolo assoluto. Il composto **25** così ottenuto è stato trattato con etile cloroformiato per proteggere la funzione amminica sotto forma di etil carbammato. Il composto **26** è stato trattato con urotropina in acido trifluoroacetico e successivamente con potassio ferricianuro in potassa idroalcolica, portando all'ottenimento della chinazolina **27**, attraverso la formazione di un intermedio *N*-carbamoildiidrochinazolinico, non isolato dalla miscela di reazione¹ (Schema 11).



Schema 11. Metodica per la sintesi di nuclei chinazolinici.

Il derivato chinazolinico **27** è stato quindi selettivamente ossidato a 6-metossi-7-1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazol-4(3*H*)-one (**28**) mediante trattamento con cerio ammonio nitrato in ambiente acido acquoso.

La reazione di ossidazione della chinazolina è peculiare di questo particolare nucleo: la reazione, infatti, passa attraverso la somma acido-catalizzata di una molecola di acqua in posizione 4, a dimostrazione che il doppio legame in 3-4 ha carattere più vinilico che aromatico, giustificando buona parte della chimica di questi composti (Schema 12).



Schema 12. Meccanismo di ossidazione del nucleo chinazolinico.

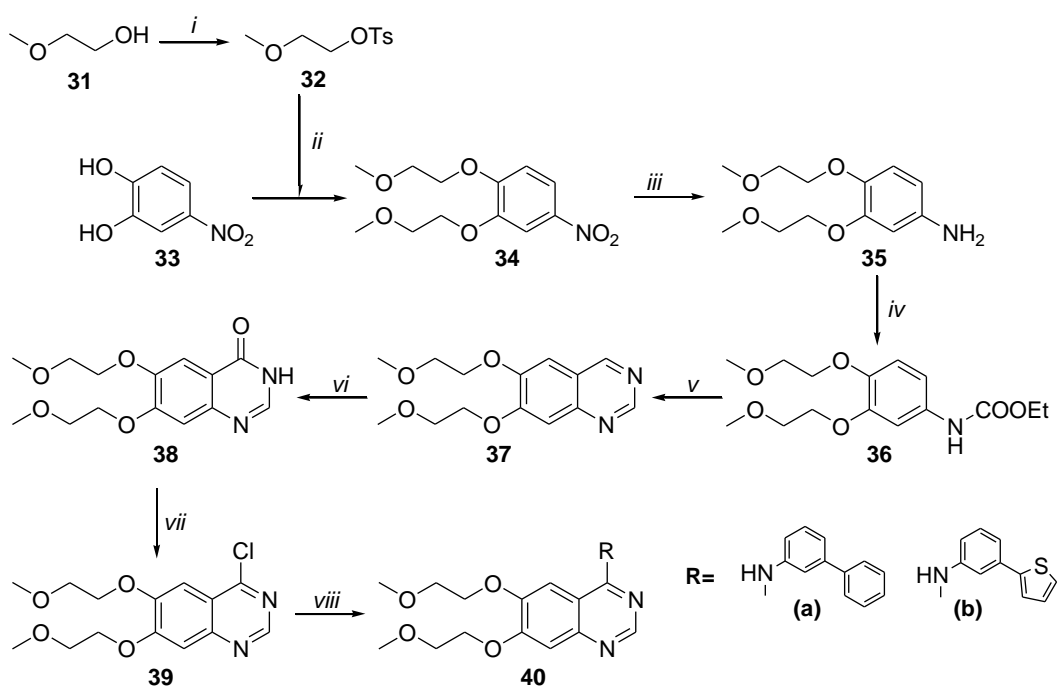
L'isolamento del derivato chinazolinico dalla miscela di reazione ha tuttavia presentato notevoli difficoltà data l'elevata solubilità in acqua del prodotto sia a pH acido (per la presenza della porzione amminica terziaria facilmente protonabile), sia a pH alcalino (a causa della salificazione dell'ossidrilico fenolico in tautomeria con l'anello diidropirimidico). Quindi, mentre i prodotti di ossidazione dei derivati chinazolinici

risultano di solito facilmente isolabili per precipitazione dalla miscela di reazione a pH compreso fra 4 e 7, per il composto **28** è stato necessario utilizzare un *work-up* particolare, visto anche il suo scarso coefficiente di ripartizione fra diversi solventi organici e acqua stessa che ha reso impossibile un'estrazione diretta della molecola dalla miscela di reazione. Il chinazolinone è stato quindi estratto con estrattore *Soxhlet* per 24 ore, utilizzando come solvente acetone, dopo aver neutralizzato e concentrato a secchezza la miscela di reazione e aver adsorbito il residuo solido su sodio solfato anidro. Il composto **28** così ottenuto è stato successivamente trattato con cloruro di tionile ottenendo il clorderivato **29** sul quale è stata poi condensata, per semplice irraggiamento con microonde, la 4-bromo-2-fluoroanilina portando all'ottenimento di Vandetanib (**30**), in forma di dicloridrato.

5.3. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINAMMINICI

5.3.1. SINTESI DI DERIVATI 5,6-DI(2'-METOSSIETOSSI)CHINAZOLINILAMMINICI

Per la sintesi dei derivati 5,6-di(2'-metossietossi)chinazolinilamminici sono stati utilizzati come prodotti di partenza il 2-metossietanolo (**31**) e il 3,4-diidrossinitrobenzene (**33**) (Schema 13).



Schema 13. Sintesi di derivati 5,6-di(2'-metossietossi)chinazolinilamminici. Condizioni di reazione:

- i. TsCl, Py, TA, resa 65%.
- ii. DMF, K_2CO_3 , refluxo 8 ore, resa 60%.
- iii. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, refluxo, 2 ore, resa 93%.
- iv. ClCOEt, TEA, THF, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- v. 1) HTMA, TFA, MW, 110 °C, 10 minuti;
2) KOH 10%, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, refluxo, 5 ore, resa 93%.
- vi. CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 65%.
- vii. $POCl_3$, TEA, refluxo, 2 ore, resa quantitativa.
- viii. RNH_2 , $iPrOH$, MW, 80 °C, 15 minuti, rese da 31 a 93%.

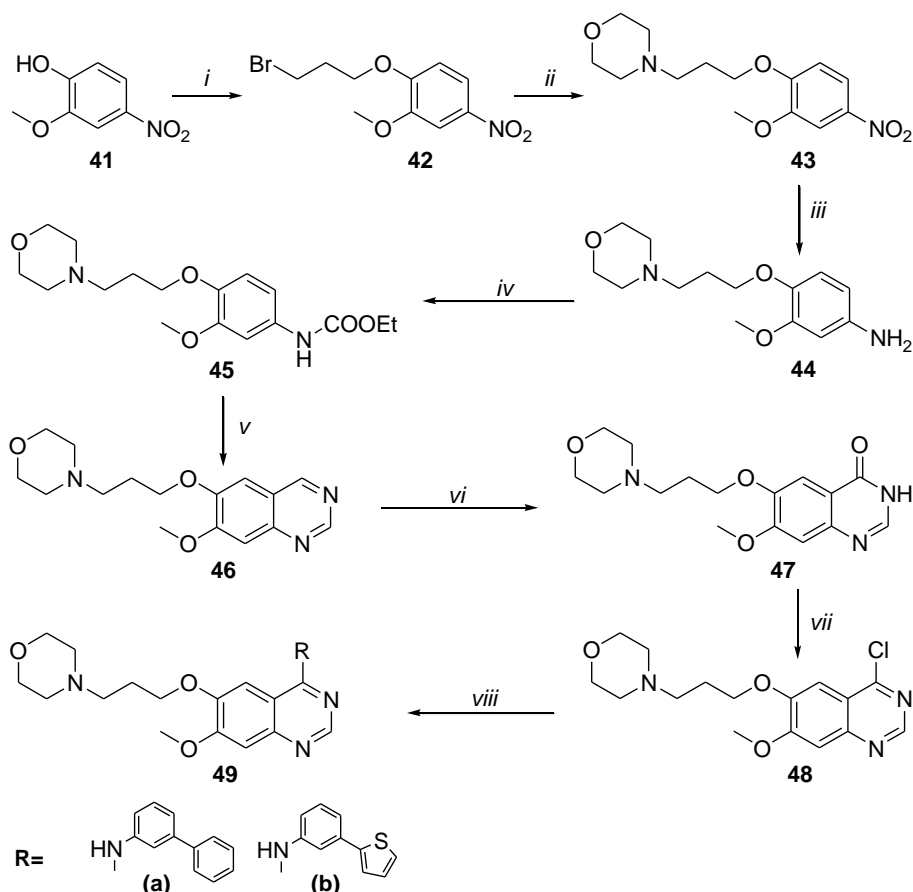
Per poter ottenere un adeguato agente alchilante, il composto **31** è stato fatto reagire con tosil cloruro in presenza di piridina e il derivato **32** così ottenuto è stato condensato con il 3,4-diidrossinitrobenzene in dimetilformammide in presenza di potassio carbonato. Il nitrogruppo del composto **34** è stato ridotto con stagno cloruro in etanolo

e il composto **35** è stato quindi sottoposto alla serie di reazioni già descritte in precedenza, fino al derivato chinazolinico **38** che, per per trattamento con ossicloruro di fosforo in trietilammina ha portato all'ottenimento del derivato clorochinazolinico **39**. Gli ammino biarili **4** e **10** sono stati condensati per semplice irraggiamento con microonde in presenza della clorochinazolina. Con tale metodica, quindi, sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3'-bifenil)ammina (**40a**);
- ✓ [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina (**40b**);

5.3.2. SINTESI DI DERIVATI 7-METOSSI-6-(3'-N-MORFOLINO)PROPOSSICHINAZOLINILAMMINICI

Per la sintesi dei derivati 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolinilamminici è stato utilizzato come prodotto di partenza il 3-metossi-4-idrossinitrobenzene (**41**), il cui gruppo ossidrilico è stato inizialmente eterificato con 1,3-dibromopropano (Schema 14).



Schema 14. Sintesi di derivati 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolinilamminici.

Condizioni di reazione:

- i. DMF, K_2CO_3 , dibromopropano, riflusso, resa 61%.
- ii. $iPrOH$, morfolina, MW, 80 °C, 15 minuti, resa 88%.
- iii. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, riflusso, 2 ore, resa 56%.
- iv. ClCOOEt, TEA, THF, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- v. 1) HTMA, TFA, MW, 110 °C, 10 minuti;
2) KOH 10%, $K_3Fe(CN)_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 5 ore, resa quantitativa.
- vi. HNO_3 20%, riflusso, 6 ore, resa 65%.
- vii. $POCl_3$, TEA, riflusso, 2 ore, resa quantitativa.
- viii. RNH_2 , $iPrOH$, MW, 80 °C, 15 minuti, rese da 3 a 27%.

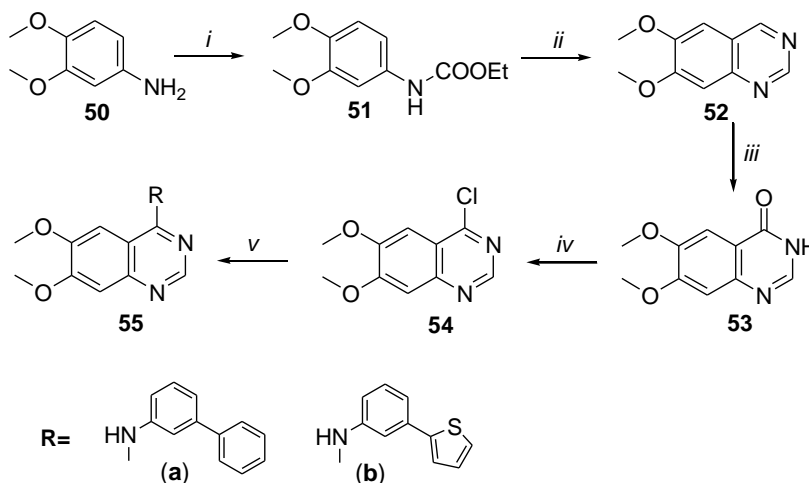
Il composto **42** così ottenuto è stato condensato con morfolina mediante reazione assistita dalle microonde; il nitrogruppo del derivato **43** è stato ridotto con stagno

cloruro in etanolo ed infine sottoposto alla serie di reazioni già descritte in precedenza fino all'ottenimento del chinazolinone **47**. Anche in questo caso, come nella sintesi di Vandetanib, il derivato chinazolinonico è stato isolato mediante estrazione con Soxhlet. Si è inoltre deciso di testare un nuovo protocollo sintetico, solubilizzando la chinazolina **46** in acido nitrico acquoso al 20% e ponendo la miscela di reazione a riflusso. Mediante questa seconda tecnica i tempi di reazione sono aumentati considerevolmente, ma il *work-up* è stato semplificato; infatti, per semplice diluizione della miscela di reazione in tetraidrofurano si è ottenuta la precipitazione del composto **47** in forma di sale nitrato. Il derivato **47** è stato quindi convertito nell'analogo 4-clorochinazolinico **48** mediante trattamento con ossicloruro di fosforo in presenza di trietilammina. Gli ammino biarili **4** e **10** sono stati condensati per semplice irraggiamento con microonde in presenza della clorochinazolina. Con tale metodica, quindi, sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3'-bifenil)ammina (**49a**);
- ✓ [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina (**49b**).

5.3.3. SINTESI DI DERIVATI 6,7-DIMETOSSICHINAZOLINILAMMINICI

A partire dalla 3,4 dimetossianilina (**50**), seguendo la stessa sequenza di reazioni già descritta per gli altri nuclei chinazolinici, è stata ottenuta la 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina (**54**), sulla quale sono stati condensati i sintoni amminobiarilici **4** e **10** per semplice irraggiamento con microonde (Schema 15).



Schema 15. Sintesi di derivati 6,7-dimetossichinazolinilamminici. Condizioni di reazione:

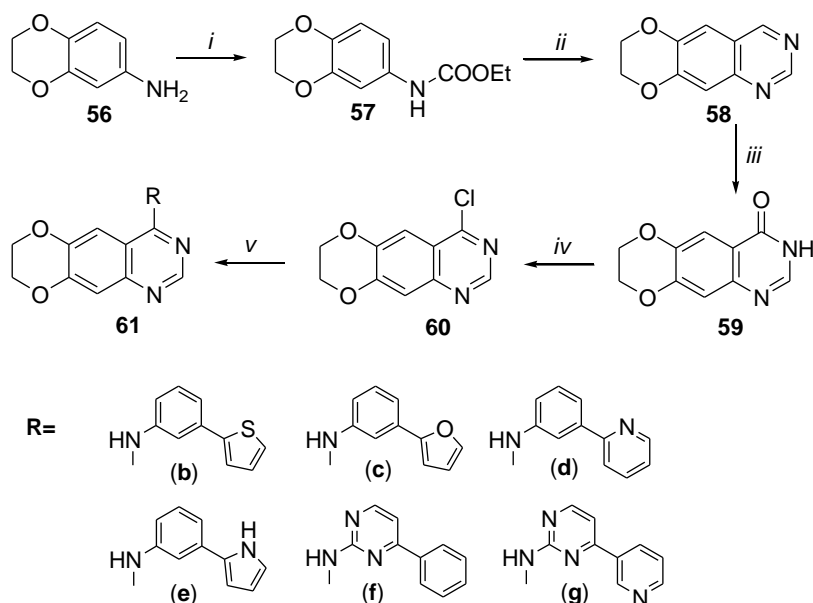
- i. ClCOOEt , TEA, THF, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- ii. 1) HTMA, TFA, MW, 110 °C, 10 minuti;
2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, EtOH/ H_2O 1/1, refluxo, 5 ore, resa quantitativa.
- iii. CAN, AcOH, H_2O , TA, resa quantitativa.
- iv. POCl_3 , TEA, refluxo, 2 ore, resa quantitativa.
- v. RNH_2 , $i\text{PrOH}$, MW, 80°C, 15 minuti, rese da 50% a quantitativa.

Con tale metodica, quindi, sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3'-bifenil)ammina (**55a**);
- ✓ (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-[(3'-(tien-2'-il)fenil]ammina (**55b**).

5.3.4. SINTESI DI DERIVATI DIIDRODIOSINOCHINAZOLINILAMMINICI

A partire dalla 6-ammino-2,3-diidro-1,4-benzodiossina (**56**), seguendo la stessa sequenza di reazioni già descritta per gli altri nuclei chinazolinici, è stata ottenuta la 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolinico (**60**), sulla quale sono stati condensati i sintoni aminobiarilici precedentemente sintetizzati (Schema 16).



Schema 16. Sintesi di derivati diidrodiosinochinazolinilamminici. Condizioni di reazione:

- i. ClCOOEt , TEA, THF, TA, 1 ora, resa quantitativa.
- ii. 1) HTMA, TFA, MW, 110 °C, 10 minuti
2) KOH 10%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, EtOH/ H_2O 1/1, riflusso, 4 ore, resa 72%.
- iii. CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 81%.
- iv. POCl_3 , TEA, riflusso, 2 ore, resa 86%.
- v. RNH_2 , $^i\text{PrOH}$, MW, 80 °C, 15 minuti per **61b-61e**, rese da 52% a 70%.
 RNH_2 , NaH, THF anidro, MW, 80 °C, 15 minuti per **61f-61g**, rese da 5% a 10%.

Gli aminobiarili **10**, **11**, **12** e **16** sono stati condensati per semplice irraggiamento con microonde in presenza della cloroquinazolina **60**. Con tale metodica, quindi, sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina (**61b**);
- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-[3'-(furan-2''-il)fenil]ammina (**61c**);
- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-[3'-(piridin-2''-il)fenil]ammina (**61d**);
- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-[3'-(pirrol-2''-il)fenil]ammina (**61e**).

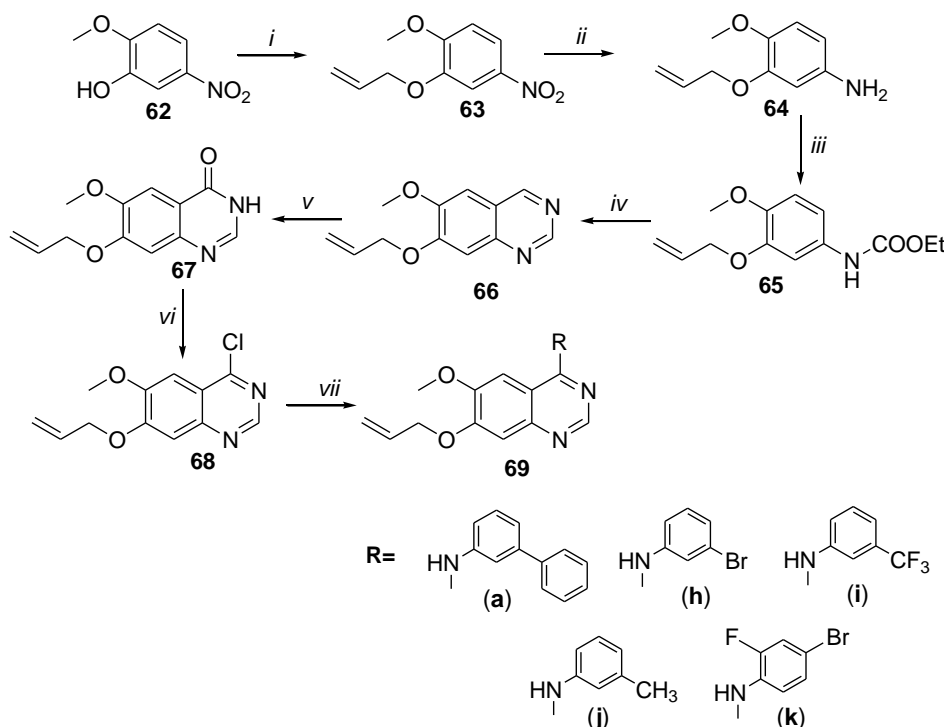
La stessa metodica non è stata invece applicabile alla condensazione degli amminobiarili **18** e **20**. In questi composti, infatti, il gruppo amminico risulta essere un nucleofilo molto più debole, a causa dell'effetto elettronattrattore degli eteroatomi presenti in anello. In questo caso è stato quindi necessario l'utilizzo di una base forte (come il sodio idruro), che favorisce la formazione del corrispondente sale sodico, consentendo la condensazione con il derivato clorochinazolinico mediante eliminazione di sodio cloruro.

Con questa metodica sono stati ottenuti i seguenti composti:

- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-(4'-fenilpirimidin-2''-il)ammina (**61f**);
- ✓ (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-[4'-(piridin-3''-il)pirimidin-2'-il]-ammina (**61g**).

5.3.5. SINTESI DI DERIVATI 6-METOSSI-7-ALLILOSSICHINAZOLIN-4-AMMINICI

Per la sintesi del nucleo 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolinico è stato utilizzato come prodotto di partenza il 2-metossi-5-nitrofenolo (**62**), il cui gruppo ossidrilico è stato inizialmente eterificato con bromuro di allile; il nucleo 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolinico (**68**) è stato ottenuto seguendo lo schema sintetico già descritto in precedenza: in questo caso, tuttavia, l'ossidazione del nucleo chinazolinico è avvenuta trattando il derivato **66** con anidride cromica in ambiente acquoso acido. Il chinazolinone **67** è stato quindi sottoposto a clorurazione e sul nucleo clorochinazolinico sono stati condensati diversi sintoni anilinici per semplice irraggiamento con microonde in 2-propanolo (Schema 17).



Schema 17. Sintesi di derivati 6-metossi-7-allilossichinazolamminici. Condizioni di reazione:

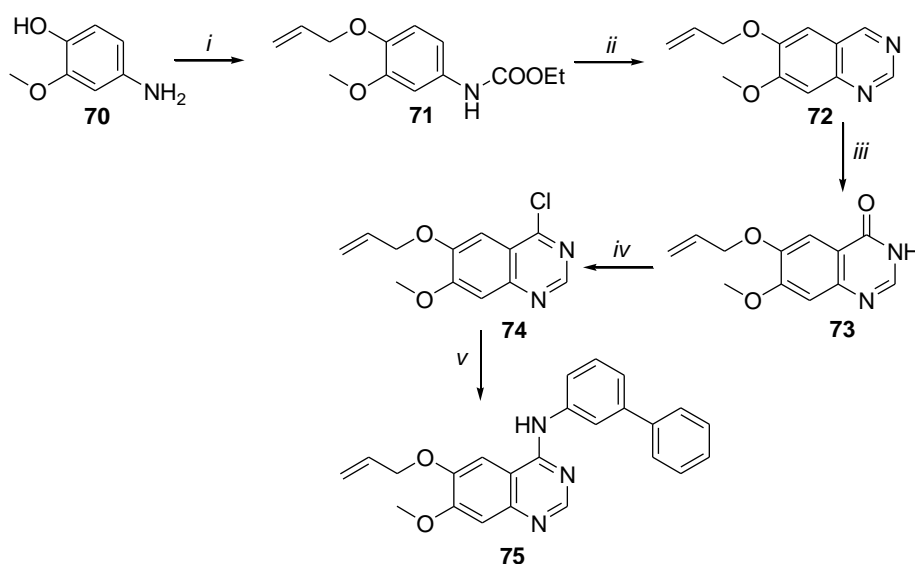
- i. DMF, K_2CO_3 , bromuro di allile, riflusso, resa quantitativa.
- ii. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, riflusso, 3 ore, resa 88%.
- iii. $ClCOOEt$, TEA, THF, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- iv. 1) HMTA, TFA, MW, $110^\circ C$, 10 minuti;
2) KOH 20%, $K_3Fe(CN)_6$, riflusso, 3 ore, resa 40%.
- v. CrO_3 , AcOH, H_2O , TA, resa 43.5%.
- vi. $POCl_3$, TEA, riflusso, 1.5 ore, resa 93%.
- vii. RNH_2 , iPrOH , MW, 15 minuti, rese da 28% a 60%.

Con tale metodica, quindi, sono stati ottenuti i cloridrati dei seguenti composti:

- ✓ (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina (**69a**);
- ✓ (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-bromofenil)ammina (**69h**);
- ✓ (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-trifluorometilfenil)ammina (**69i**);
- ✓ (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-metilfenil)ammina (**69j**);
- ✓ (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(4-bromo-2-fluoro-fenil)ammina (**69k**).

5.3.6. SINTESI DI (6-ALLILOSSI-7-METOSSICHINAZOLIN-4-IL)-(3-BIFENIL)-AMMINA CLORIDRATO

Per la sintesi della 4-cloro-6-allilossi-7-metossichinazolina (**74**) è stato utilizzato come prodotto di partenza il 3-metossi-4-idrossinitrobenzene (**70**), che è stato sottoposto alla serie di reazioni previste dalla strategia generale fino all'ottenimento del composto **73**. La reazione di clorurazione secondo la metodica impiegata in precedenza, tuttavia, non ha portato alla formazione del corrispondente 4-cloroderivato. Il composto **74** è stato comunque ottenuto, seppur con bassa resa, mediante trattamento con trifenilfosfina in tetracloruro di carbonio e diclorometano. Sul derivato **74** è stato poi condensato solo il 3-amminobifenile (**4**), per irraggiamento in microonde in 2-propanolo (Schema 18).



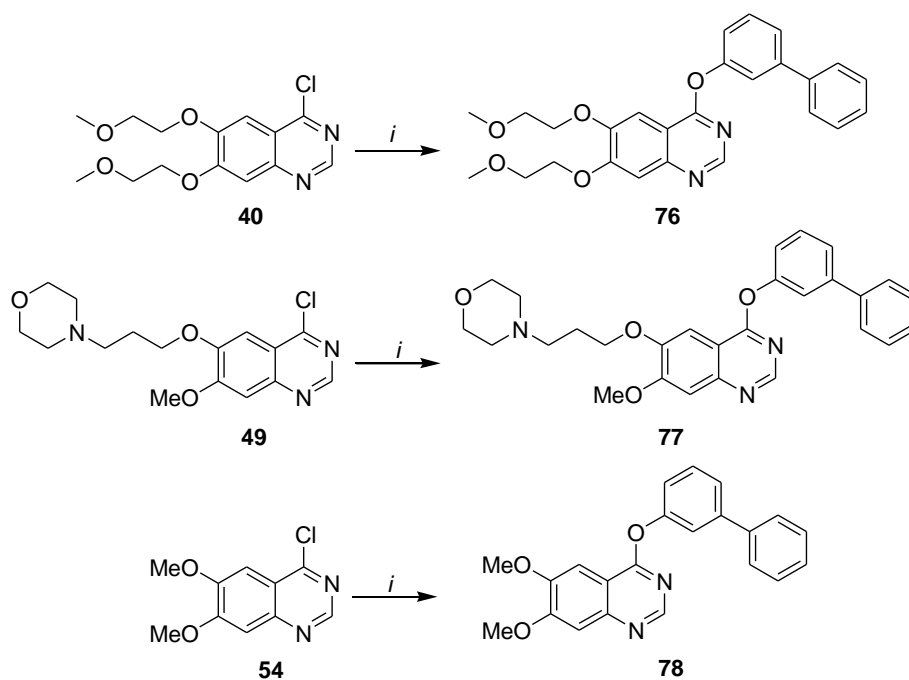
Schema 18. Sintesi di (6-allilossi-7-metossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina cloridrato. Condizioni di reazione:

- i. DMF, K_2CO_3 , bromuro di allile, riflusso, 1 ora, resa quantitativa.
- ii. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH, riflusso, 3 ore, resa 82%.
- iii. CICOEt, TEA, THF, TA, 30 minuti, resa quantitativa.
- iv. 1)HMTA, TFA, MW, 110° C, 10 minuti;
2)KOH 20%, $K_3Fe(CN)_6$, riflusso, 2.5 ore, resa 12%.
- v. CAN, AcOH, H_2O , TA, resa 69 %.
- vi. CCl_4 , CH_2Cl_2 , PhP_3 , riflusso, 1.5 ore, cromatografia su colonna, resa 24%.
- vii. 3-amminobifenile, $iPrOH$, MW, 15 minuti, tracce.

Va notato che il composto desiderato **75** è stato ottenuto in quantità non sufficiente da consentirne la valutazione biologica. Nelle varie tappe del processo sintetico, infatti, sono state riscontrate notevoli difficoltà che hanno causato una progressiva e marcata riduzione della resa globale di sintesi.

5.4. SINTESI DI DERIVATI BIFENILOSSICHINAZOLINICI

I derivati bifenilossichinazolinici sono stati ottenuti per condensazione del 3-idrossibifenile (**5**) con i diversi intermedi clorochinazolinici (**40**, **49** e **54**) per riscaldamento in dimetilformammide in presenza di potassio carbonato (Schema 19).



Schema 19. Sintesi di derivati bifenilossichinazolinici. Condizioni di reazione:
i. 3-idrossibifenile, DMF, K_2CO_3 , riflusso, 2-3 ore, rese da 3% a 5%.

Mediante questa strategia sintetica sono quindi stati ottenuti i seguenti composti:

- ✓ [(6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere (**76**);
- ✓ [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)etere (**77**);
- ✓ (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)etere (**78**).

Tutti i composti finali sono stati caratterizzati mediante spettroscopia NMR del protone (Figure da 23 a 44) e spettrometria di massa ad alta risoluzione.

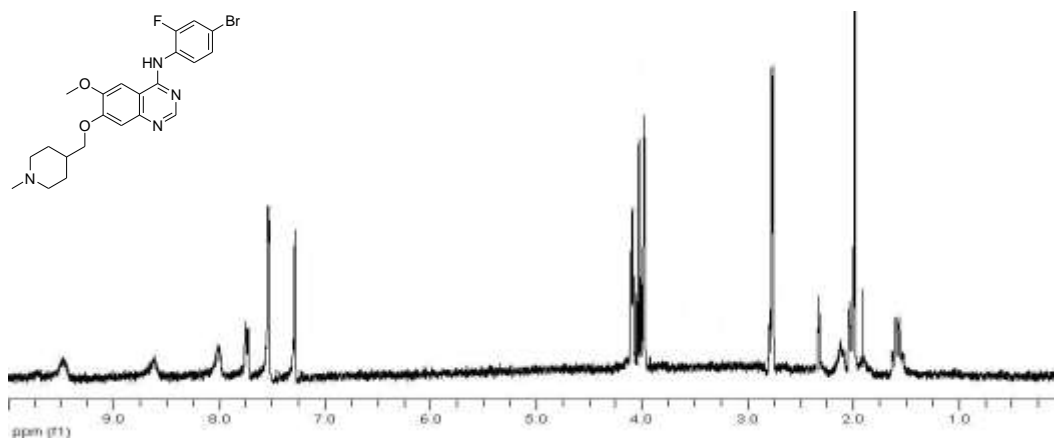


Figura 23. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di {6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolin-4-il}-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato (**Vandetanib**).

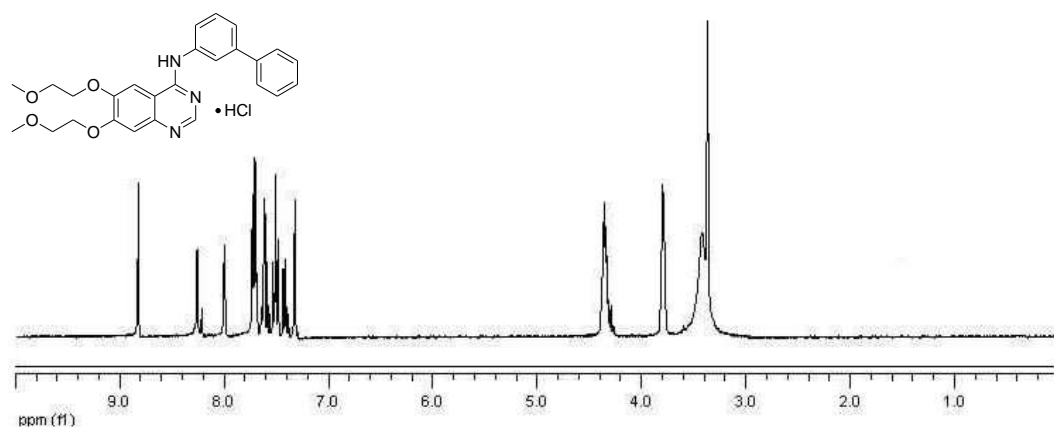


Figura 24. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina (**41a**).

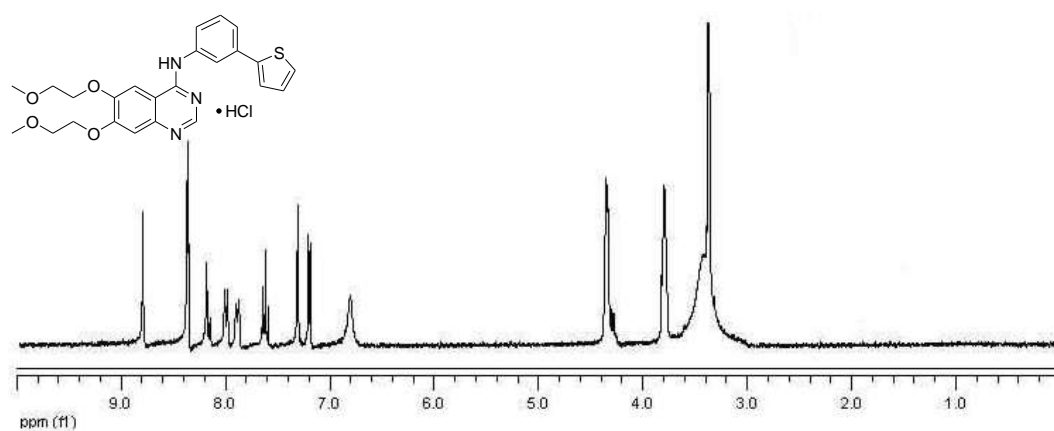


Figura 25. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3-tien-2'-il)fenil)ammina (**41b**).

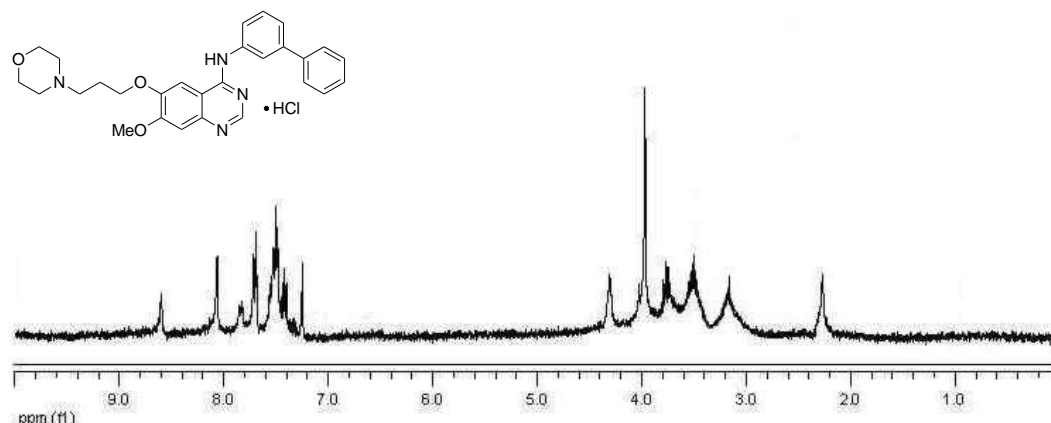


Figura 26. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)prossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina (**50a**).

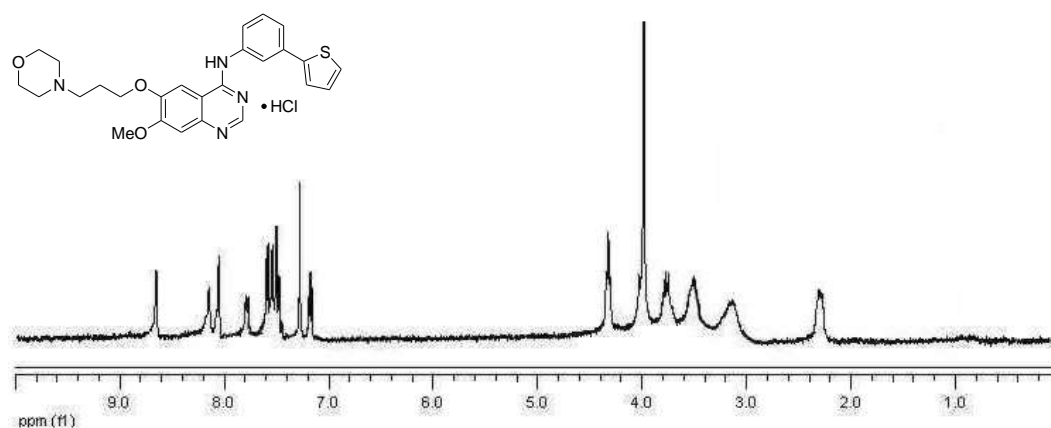


Figura 27. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)prossichinazolin-4-il]-(3-(tien-2'-il)fenil)ammina (**50b**).

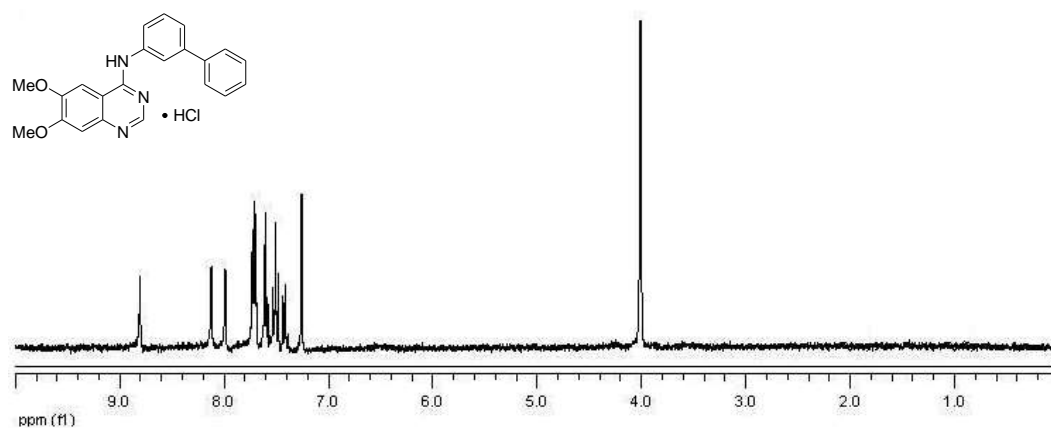


Figura 28. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina (**55a**).

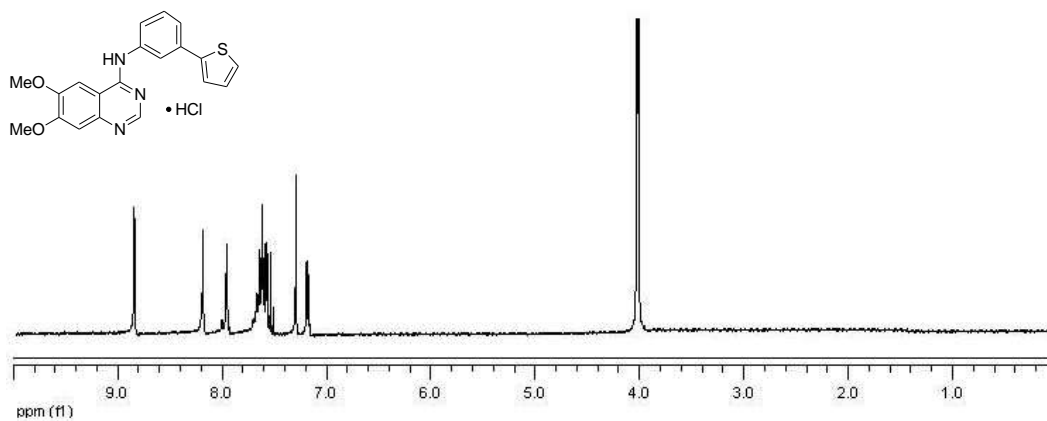


Figura 29. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-[(3-(tien-2'-il)fenil]ammina (**55b**).

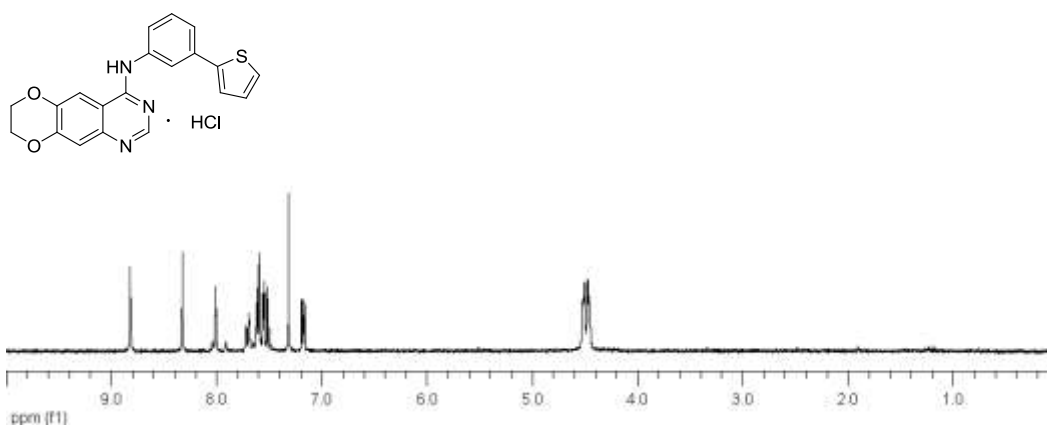


Figura 30. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina cloridrato (**61b**).

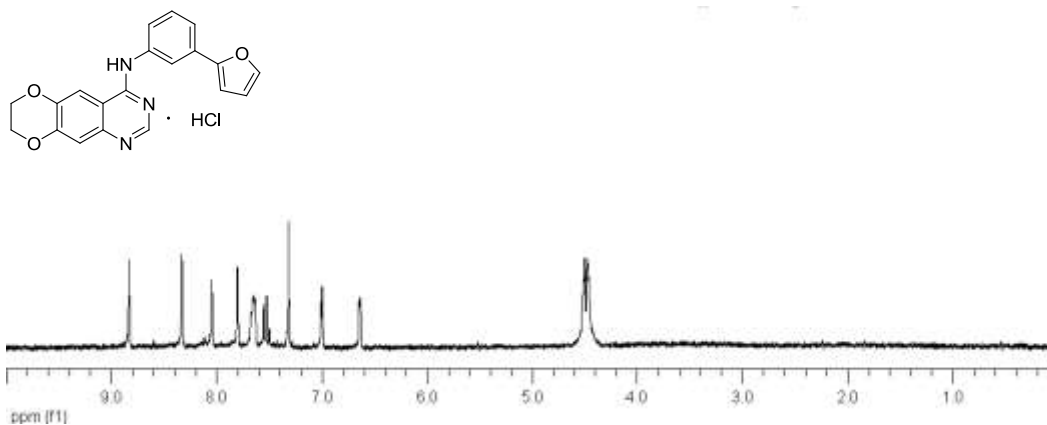


Figura 31. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(furan-2''-il)fenil]ammina cloridrato (**61c**).

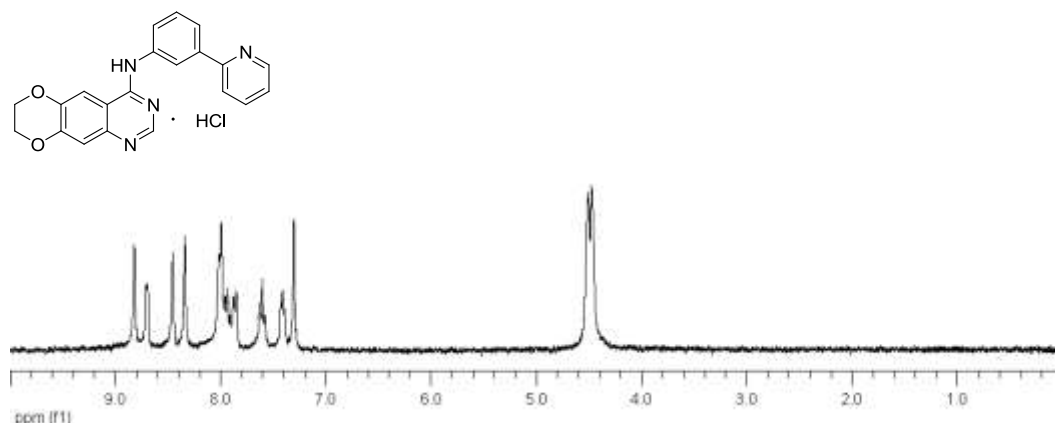


Figura 32. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(piridin-2''-il)fenil]ammina cloridrato (**61d**).

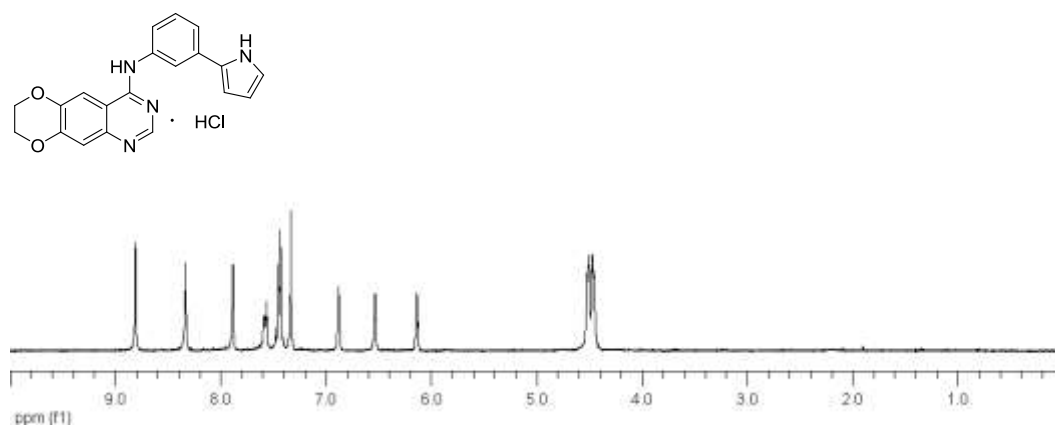


Figura 33. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-[3'-(pirrol-2''-il)fenil]ammina cloridrato (**61e**).

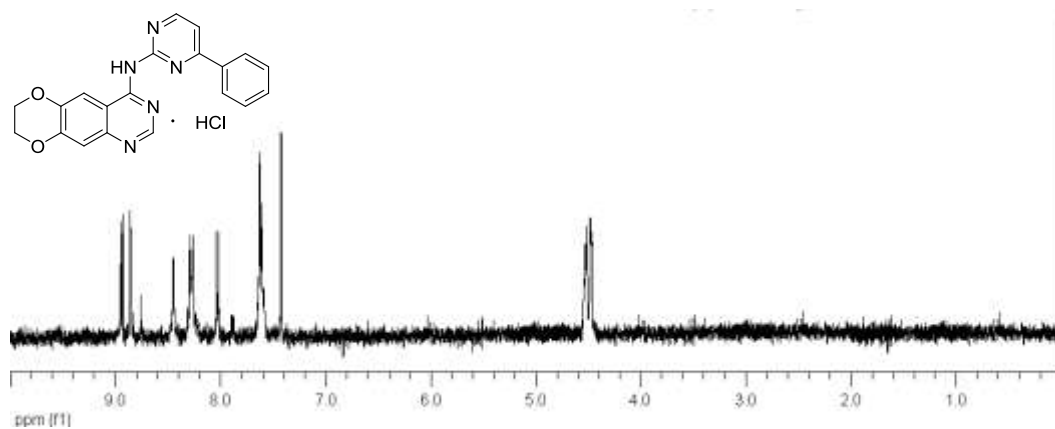


Figura 34. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-(4'-fenilpirimidin-2'-il)ammina (**61f**).

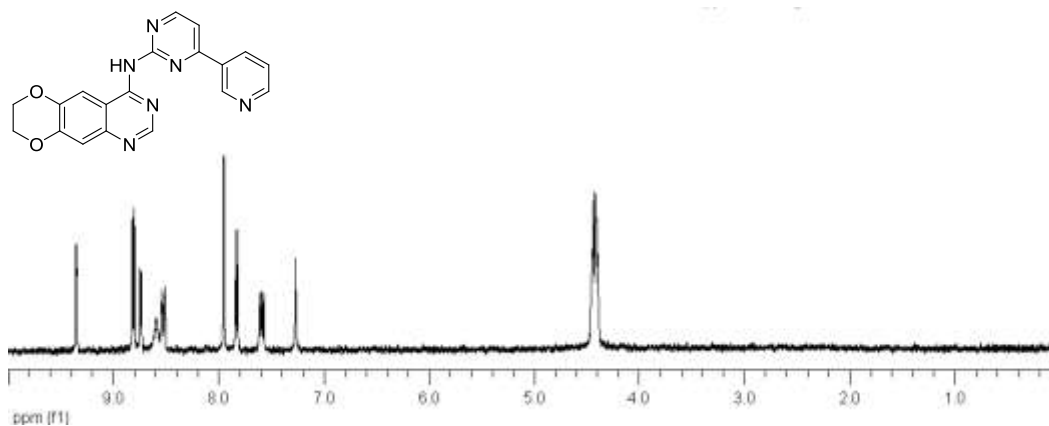


Figura 35. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]-chinazolin-4-il)-(4'-(piridin-3''-il)pirimidin-2'-il)ammina (**61g**).

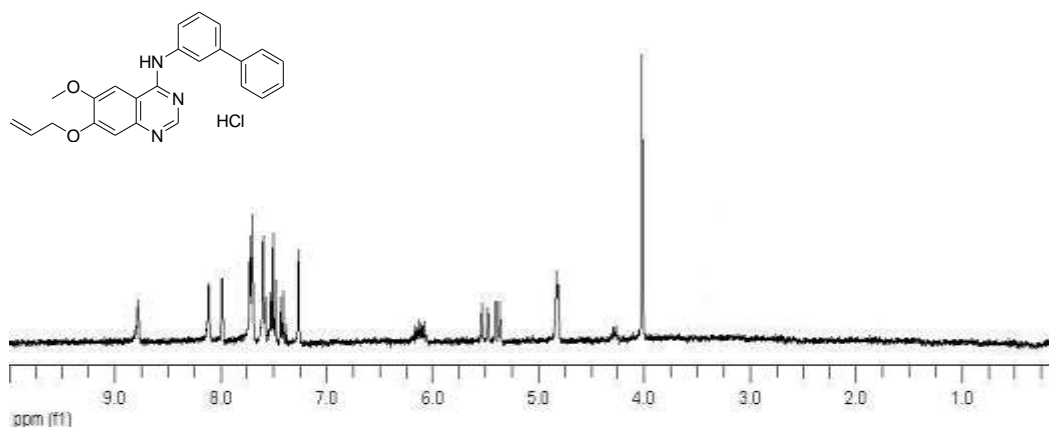


Figura 36. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6-metossi-7-alliossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina (**69a**).

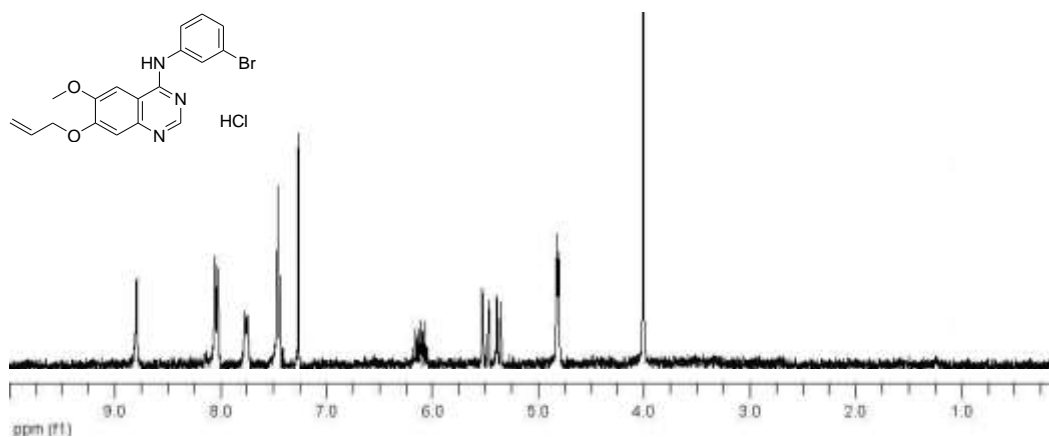


Figura 37. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6-metossi-7-alliossichinazolin-4-il)-(3-bromofenil)ammina (**69h**).

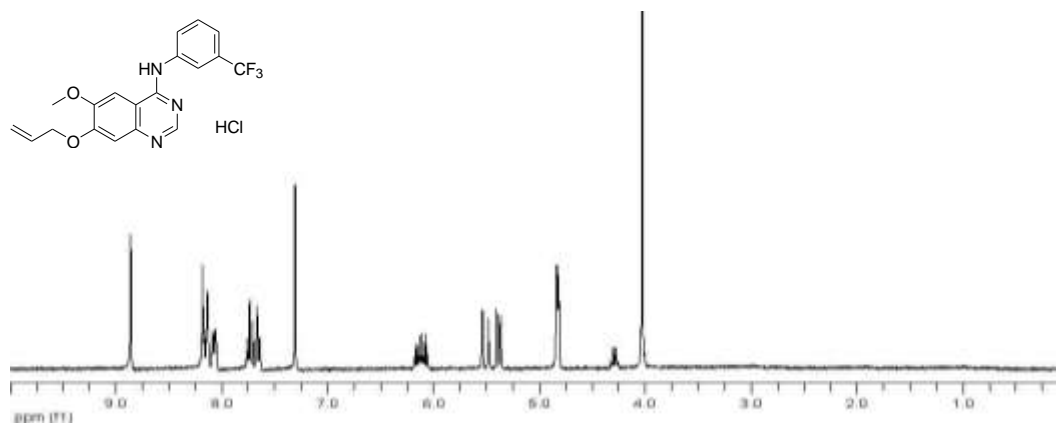


Figura 38. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-trifluorometilfenil)ammina (69i).

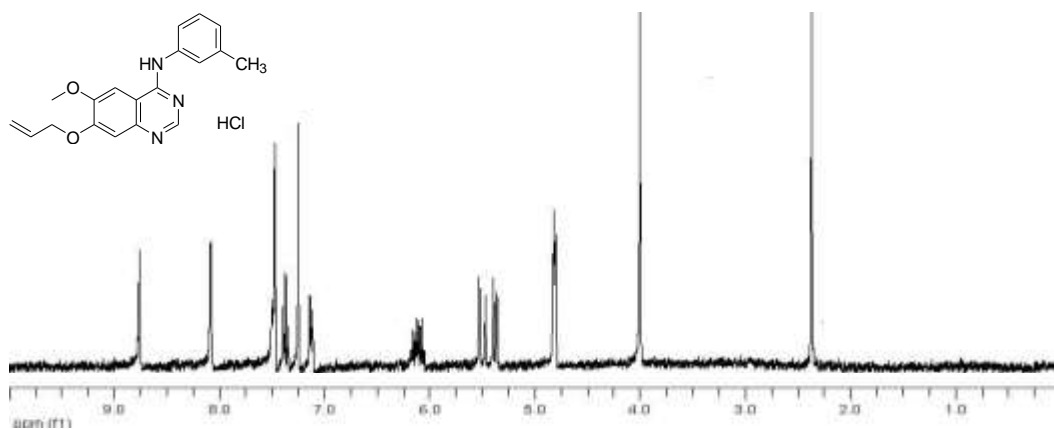


Figura 39. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3-metilfenil)ammina (69j).

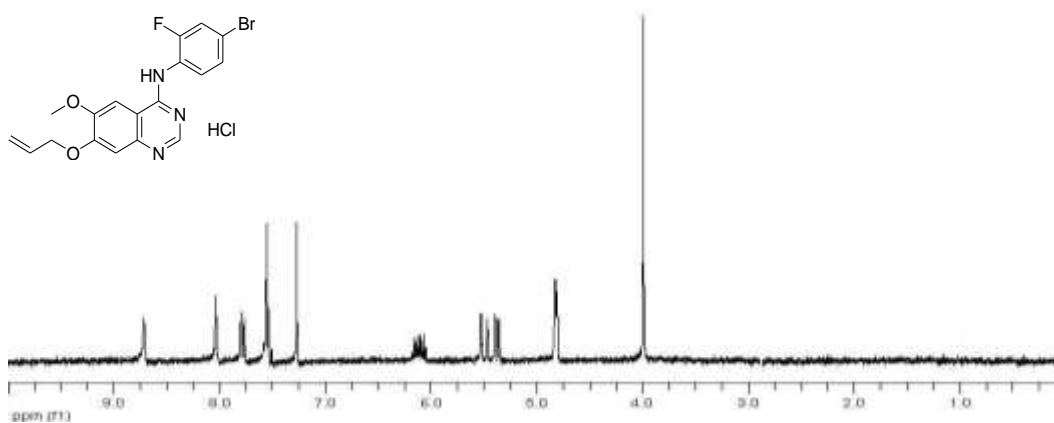


Figura 40. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(4-bromo-2-fluoro-fenil)ammina (69k).

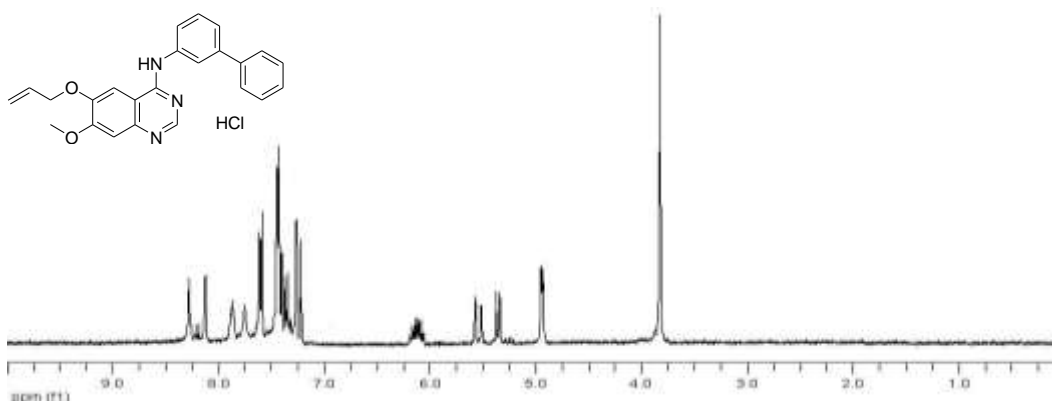


Figura 41. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di (6-allyloxy-7-metossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)-ammina cloridrato (**75**).

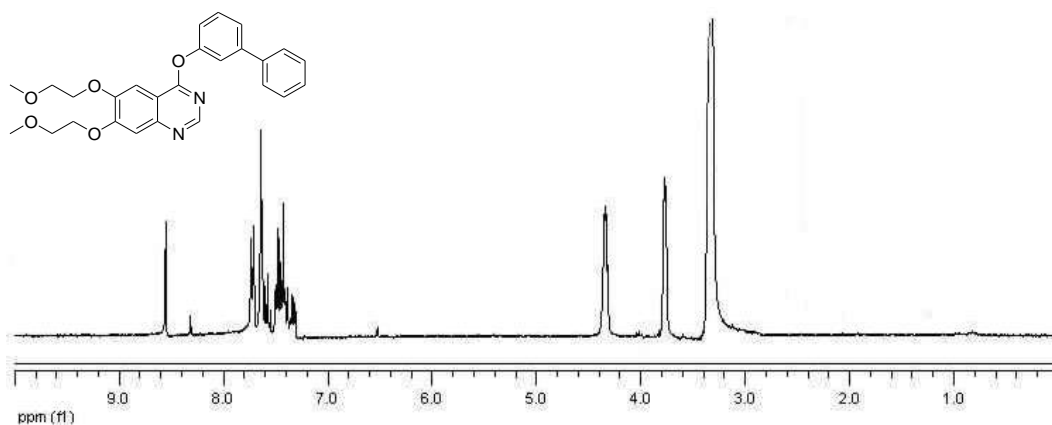


Figura 42. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [(6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere (**76**).

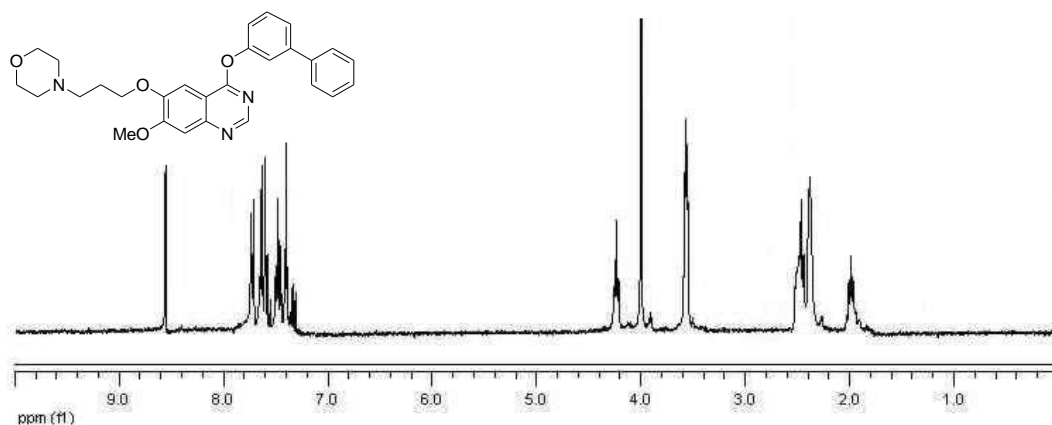


Figura 43. Spettro $^1\text{H-NMR}$ e formula di struttura di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propoxichinazolin-4-il]-(3-bifenil)etere (**77**).

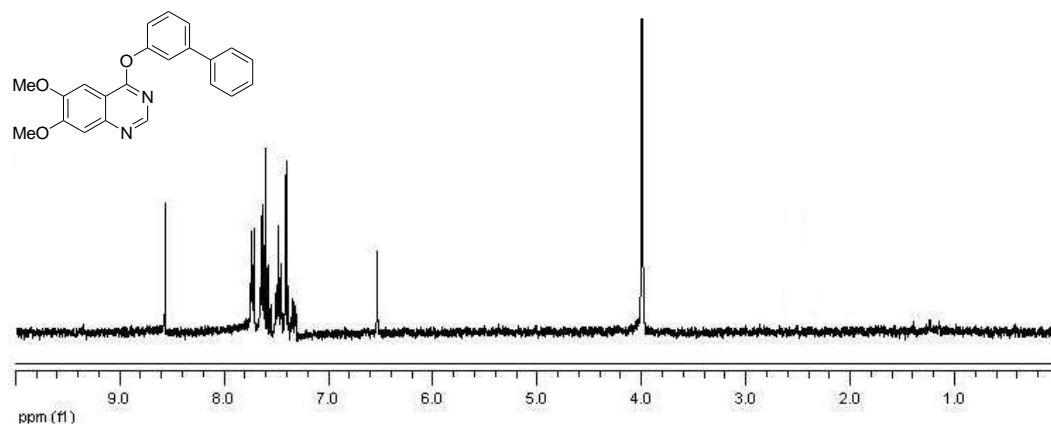


Figura 44. Spettro ¹H-NMR e formula di struttura di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)etere (78).

5.5. VALUTAZIONE BIOLOGICA

5.5.1. VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA

Per cercare di definire le relazioni struttura-attività tutti i composti sintetizzati sono stati sottoposti inizialmente ad uno *screening* preliminare sulla linea cellulare A431 derivata da un carcinoma vulvare squamoso, e caratterizzata da una sovra-espressione di EGFR. Nelle tabelle 2, 3, e 4 sono presenti tutti i composti sintetizzati e sui quali è stata valutata come saggio preliminare l'attività citotossica.

Derivati chinazolinici con nuclei di Erlotinib, Gefitinib e PD153035

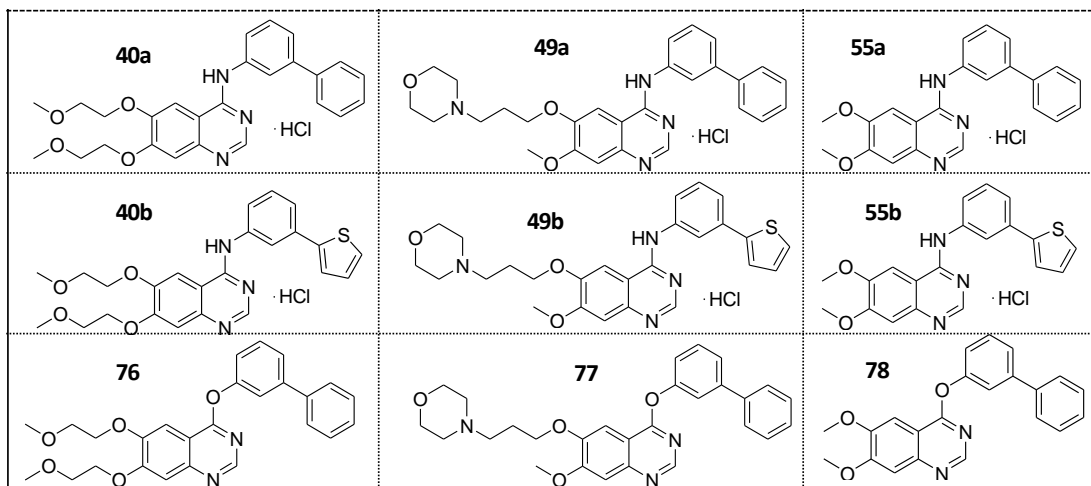


Tabella 2. Strutture dei derivati sintetizzati con i nuclei chinazolinici di Erlotinib, Gefitinib e PD153035.

Derivati 6,7-etilendiossichinazolinici

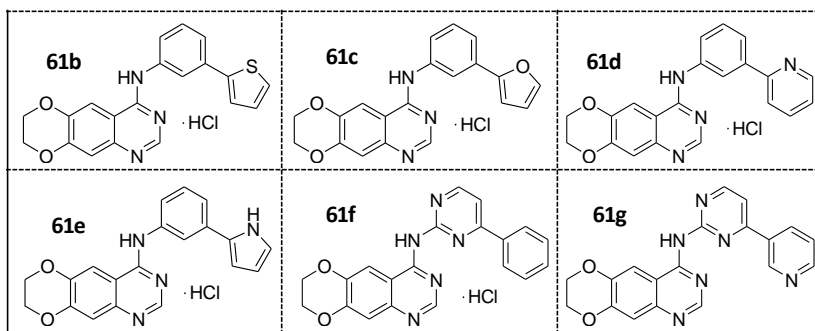


Tabella 3. Strutture dei derivati 6,7-etilendiossichinazolinici sintetizzati.

Derivati 7-allilossichinazolinici

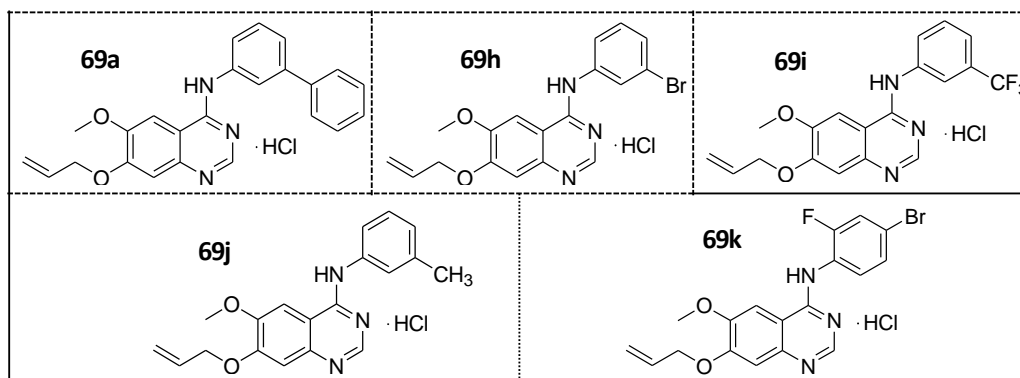


Tabella 4. Strutture dei derivati 7-allilossichinazolinici sintetizzati.

Come composti di riferimento sono stati utilizzati PD153035 (uno tra i più potenti inibitori *in vitro* di EGFR²) e Vandetanib (inibitore duale di EGFR e VEGFR, con attività anti-angiogenica⁵⁷) (Figura 45).

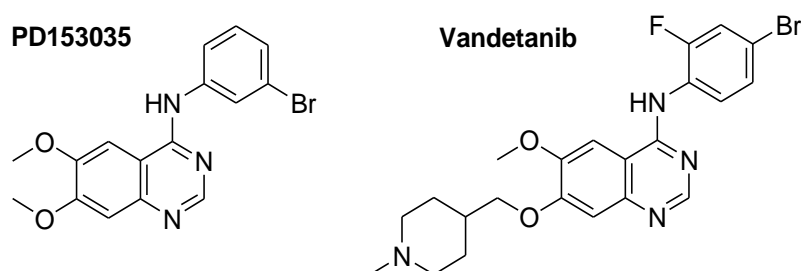


Figura 45. Strutture dei composti utilizzati come riferimento nei saggi condotti.

a. Effetti sulla proliferazione cellulare: cellule A431

Per la valutazione dell'effetto anti-proliferativo dei composti sintetizzati è stata utilizzata la linea cellulare umana A431. Dopo trattamento per 72 h con i composti oggetto di studio a concentrazioni comprese tra 0.01 e 10 μM , la proliferazione è stata determinata con il saggio dell'MTT. In figura 46 sono riportati i grafici delle curve dose-risposta dei soli composti che hanno evidenziato valori di IC_{50} inferiori a 10 μM , mentre in tabella 5 è presente l'elenco completo dei composti testati con i relativi valori di IC_{50} .

Confrontando i valori di IC_{50} dei derivati chinazolinici con quelli relativi a PD153035, Vandetanib e ai tre composti (**1**, **2** e **3**) precedentemente studiati, si evidenzia quanto segue:

- I derivati **40a**, **49a**, **51a** pur mantenendo la stessa porzione anilinic dei composti **1**, **2** e **3**, presentavano valori di IC_{50} superiori a 10 μM . L'introduzione

- delle catene laterali di PD153035, Erlotinib e Gefitinib non aveva portato quindi ad un miglioramento dell'attività anti-proliferativa;
- per mantenere le caratteristiche di lipofilia e di ingombro sterico l'amminobifenile in posizione 4 è stato sostituito con un amminofeniltiofene (composti **40c**, **49c** e **51c**) sui nuclei chinazolinici di PD153035, Erlotinib e Gefitinib: tuttavia nemmeno questo tipo di modifica strutturale aveva portato a valori di IC₅₀ inferiori a 10 µM;
 - la sostituzione del ponte anilिनico con il ponte etero (composti **64**, **65** e **66**) non esercitava alcun effetto sulla crescita cellulare, confermando il modello farmacoforico accettato secondo il quale una modifica in posizione 4 all'anello chinazolinico porta solitamente a perdita di attività;
 - nei composti della serie **61**, che mantenevano l'anello diossanico in posizione 6-7, analogamente al derivato **2**, l'introduzione del sostituito fenilfuranico (**61c**) aveva portato ad un valore di IC₅₀ di 10 volte inferiore rispetto a PD153035 e dello stesso ordine di grandezza dei composti **1** e **3**. Tuttavia l'attività antiproliferativa esercitata era comunque inferiore al composto **2**. I derivati **61f** e **61g** (rispettivamente con sostituito fenilpirimidinico e piridinilpirimidinico in posizione 4) presentavano invece un valore di IC₅₀ paragonabile a quello calcolato per Vandetanib. Gli altri composti della serie **61** (**61b**, **61d** e **61e**) avevano un valore di IC₅₀ superiore a 10 µM.

La sintesi della serie **69**, progettata inizialmente per cercare di ottenere un effetto antiproliferativo irreversibile attraverso l'introduzione di un gruppo allilico in posizione 6 o 7, aveva portato all'ottenimento dei soli derivati con la catena allilica in 7. Su questo nucleo chinazolinico sono stati condensati alcuni derivati anilिनici classici, presenti su inibitori noti, e l'amminobifenile.

- nel composto **69a**, l'introduzione della catena allilica in 7 aveva portato alla perdita dell'attività citotossica, se confrontato con il derivato **2**;
- il composto **69i**, con lo stesso sostituito anilिनico di PD153035, mostrava un'attività paragonabile a questo composto di riferimento, ad indicare che l'introduzione del gruppo allilico in 7 sembra non portare ad un sostanziale miglioramento dell'attività antiproliferativa;

- i derivati chinazolinici **69j** e **69k** mostravano invece valori di IC_{50} paragonabili al composto di riferimento Vandetanib;
- per il composto **69l** che presentava la stessa porzione anilinic di Vandetanib, non era stato calcolato un valore di IC_{50} inferiore a $10 \mu M$.

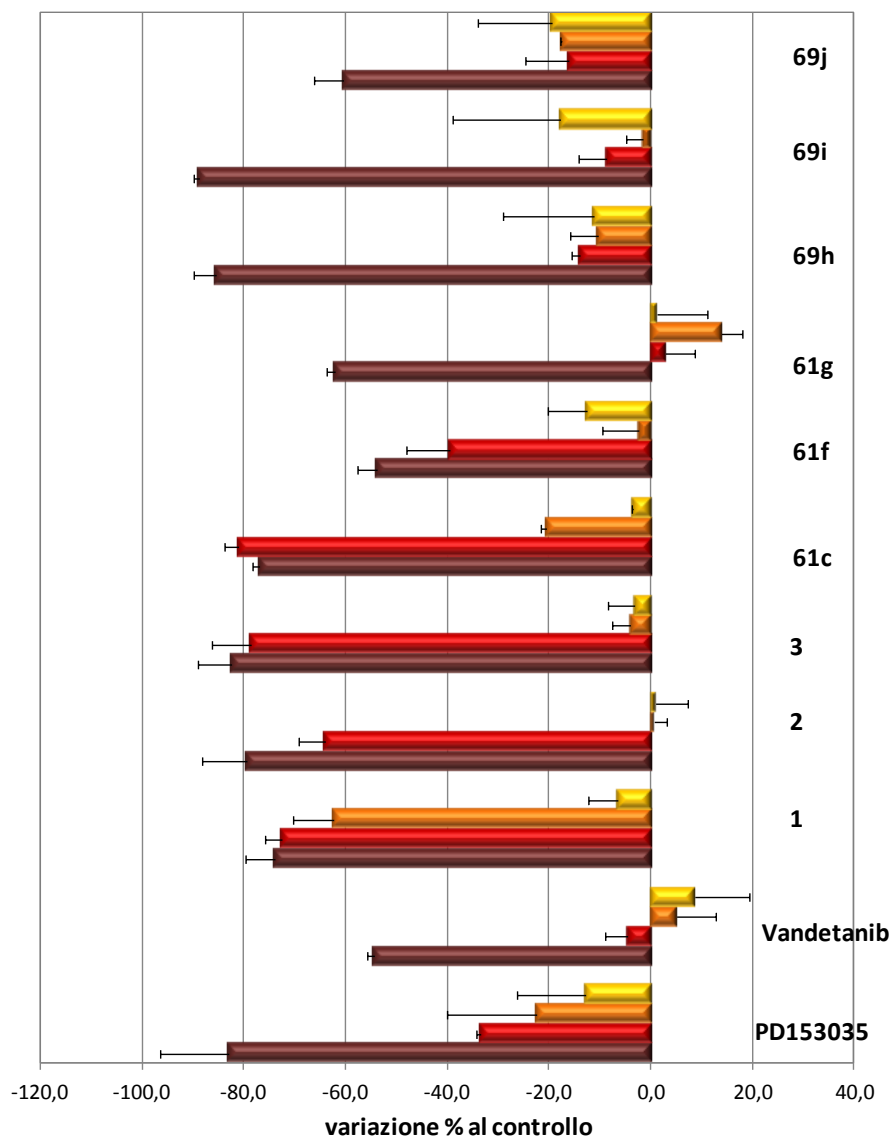


Figura 46. Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431. La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 h di incubazione con i composti in esame:

■ = 10 μM ; ■ = 1 μM ; ■ = 0.1 μM ; ■ = 0.01 μM ;

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

COMPOSTI	IC ₅₀ (μM) A431	COMPOSTI	IC ₅₀ (μM) A431
PD153035	4.40 ± 1.30	78	>10
Vandetanib	9.92 ± 0.33	61b	>10
1	0.81 ± 0.06	61c	0.52 ± 0.01
2	0.08 ± 0.01	61d	>10
3	0.66 ± 0.08	61e	>10
40a	>10	61f	7.93 ± 0.59
40b	>10	61g	8.31 ± 0.01
49a	>10	69a	>10
49b	>10	69h	4.49 ± 0.62
55a	>10	69i	5.95 ± 0.01
55b	>10	69j	8.45 ± 0.55
76	>10	69k	>10
77	>10		

Tabella 5. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 con i derivati chinazolinici.

Sulla base dei risultati ottenuti, la sperimentazione successiva è stata limitata ai derivati dotati di maggiore attività antiproliferativa, per i quali era stato possibile calcolare la IC₅₀.

b. Valutazione della percentuale di cellule AnnV⁺, PI⁺

Per determinare il modo in cui i composti studiati inducono morte cellulare, le cellule A431 sono state trattate per 24, 48 e 72 h con i composti in esame utilizzati alla concentrazione 1 μM (Figura 47) e sono stati utilizzati due fluorocromi: Annessina V-FITC e propidio ioduro (PI). L'annessina si lega alla fosfatidilserina (PS), un fosfolipide che normalmente si trova nel lato interno della membrana cellulare ma che, durante l'apoptosi, viene esposta verso l'esterno e permette all'anticorpo anti-annessina V di legarsi ad essa. Tuttavia l'annessina può legarsi alla PS anche durante la necrosi penetrando tra all'interno della cellula attraverso la membrana non più integra. Il PI si intercala stechiometricamente nel DNA e, nel caso in cui la membrana cellulare non sia integra, fluoresce nel rosso. Le cellule che risulteranno negative sia all'annessina che al PI saranno cellule vive poiché la membrana integra non permette ai fluorocromi di

entrare nelle cellule e legarsi ai rispettivi bersagli; le cellule positive all'annessina e negative allo ioduro di propidio saranno cellule in apoptosi poiché presentano l'esposizione verso l'esterno della cellula del fosfolipide; le cellule positive all'annessina e positive al propidio ioduro saranno invece cellule necrotiche.

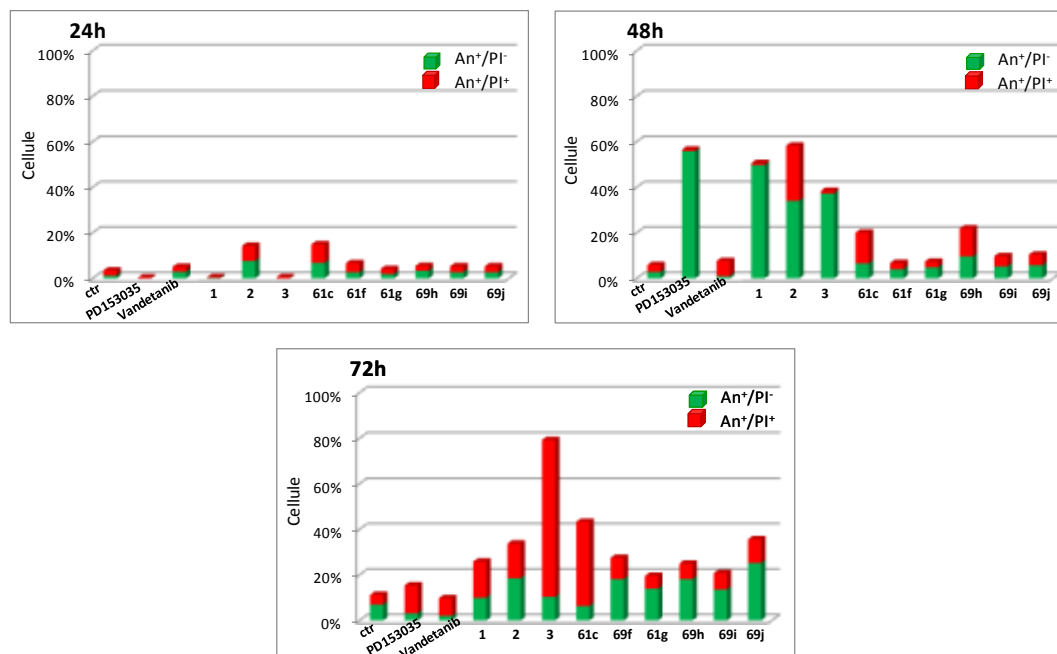


Figura 47. Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulle cellule A431. Dopo trattamento con i composti alla concentrazione di $1\mu\text{M}$ le cellule sono state incubate con Annessina V e Propidio Ioduro e analizzate al citofluorimetro. I risultati sono riportati come media di 3 esperimenti.

Dopo 24 h di non si osservava nessuna variazione significativa tra cellule non trattate e cellule trattate con i composti. A 48 h di incubazione invece, rispetto al controllo, PD153035, i composti **1**, **2** e **3**, mostravano un aumento delle cellule annessina positive e PI negative e quindi in apoptosi. Lo stesso effetto si osservava nei composti **61f**, **61g**, **69h**, **69i** e **69j** dopo 72 h di trattamento; inoltre, i derivati che a 48 h inducevano apoptosi, a 72 h mostravano un aumento significativo di cellule Annessina e PI positive, probabilmente per un fenomeno di necrosi secondaria. Il composto **61c** sembra avere un comportamento diverso da tutti gli altri: non si osservava mai un aumento delle cellule annessina V positive-PI negative; a 72 h induceva però un aumento del numero di cellule annessina V-PI positive e quindi di cellule in necrosi. È tuttavia possibile che le cellule positive solo all'annessina V si trovino in intervallo intermedio tra le 48 h e le 72 h, ipotesi che per il momento è stata verificata. Il composto di riferimento Vandetanib non dimostrava alcun effetto significativo in tutti i trattamenti, probabilmente a causa della concentrazione utilizzata in questi saggi.

c. Reversibilità degli effetti antiproliferativi

E' stato successivamente valutato se gli effetti antiproliferativi indotti dai derivati 4-amminochinazolinici fossero reversibili. A tal fine, ad un periodo di trattamento di 4 h con i composti utilizzati in concentrazione pari a 10 μ M, è seguito un periodo di recupero di 68 h, nel quale le cellule A431 sono state mantenute in solo terreno (Figura 48).

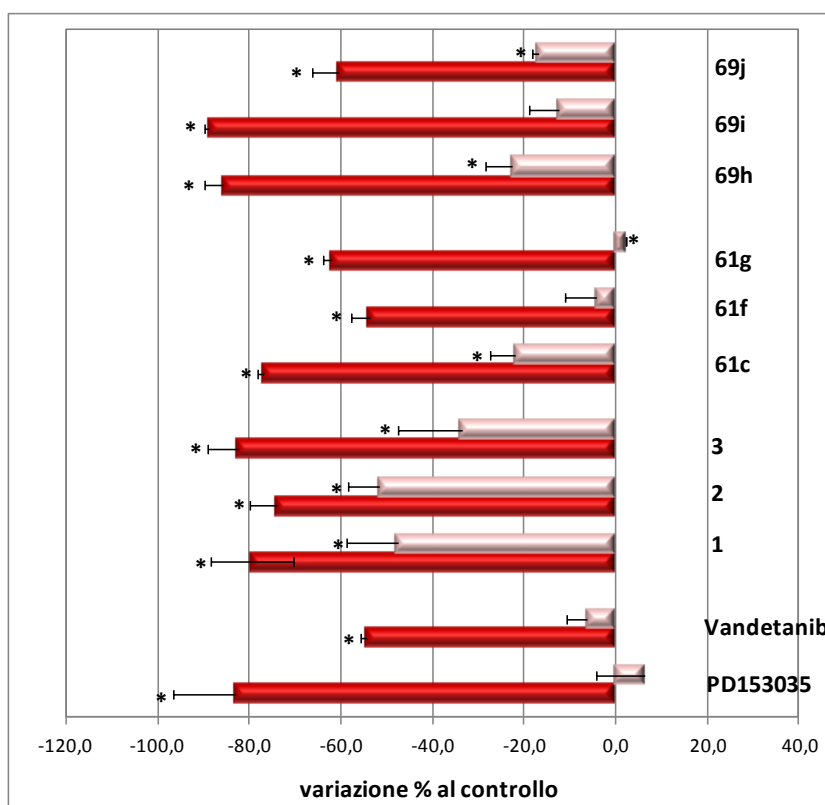


Figura 48. Reversibilità dell'effetto antiproliferativo dei derivati 4-amminochinazolinici sulle A431. Dopo 4 h di trattamento con i derivati 4-amminochinazolinici (10 μ M), il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno fresco. Dopo incubazione per 68 h, la proliferazione cellulare è stata determinata con il saggio dell'MTT. Parallelamente, è stato anche effettuato un trattamento continuo per 72 h con i composti.

Barre chiare: 4 h di trattamento + 68 h di recupero; **barre scure:** 72 h di trattamento. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard. * = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

Comparando i risultati con quelli ottenuti in seguito ad un trattamento continuo per 72 h, si osservava che oltre ai composti **1**, **2** e **3** già studiati solo il derivato **61c**, dopo il periodo di recupero, manteneva una buona attività antiproliferativa.

Per i composti **61f** e **61g** invece la proliferazione cellulare ritornava a valori paragonabili a quelli rilevati nelle colture di controllo non trattate.

Gli effetti antiproliferativi dei derivati con catena allilica in posizione 7 non avevano dimostrato un effetto irreversibile significativo rispetto alle colture di controllo non trattate. Questi composti non sembrano avere, almeno dai risultati ottenuti in questo saggio, le caratteristiche strutturali che permettono l'irreversibilità degli effetti antiproliferativi e per questo motivo il loro studio è stato momentaneamente abbandonato.

d. Effetti sulla proliferazione cellulare: cellule NIH3T3

Per verificare se l'attività antiproliferativa fosse dovuta esclusivamente all'inibizione di EGFR, è stata determinata la proliferazione cellulare utilizzando la linea cellulare NIH3T3, fibroblasti murini di origine embrionale non esprimenti EGFR. In figura 49 sono riportati i risultati dei saggi di vitalità cellulare effettuati utilizzando i composti chimici in esame a concentrazioni variabili tra 0.01 e 10 μ M. Da questi esperimenti sono stati ricavati i valori di IC_{50} , elencati in tabella 6. Analogamente a PD153035, per nessuno dei nuovi composti testati l'attività antiproliferativa dei composti era inferiore a quella evidenziata per le cellule A431. Solo i composti **1**, **2** e **3** avevano presentato nel lavoro precedente valori di IC_{50} paragonabili a quelli calcolati sulle cellule sovra-esprimenti EGFR.

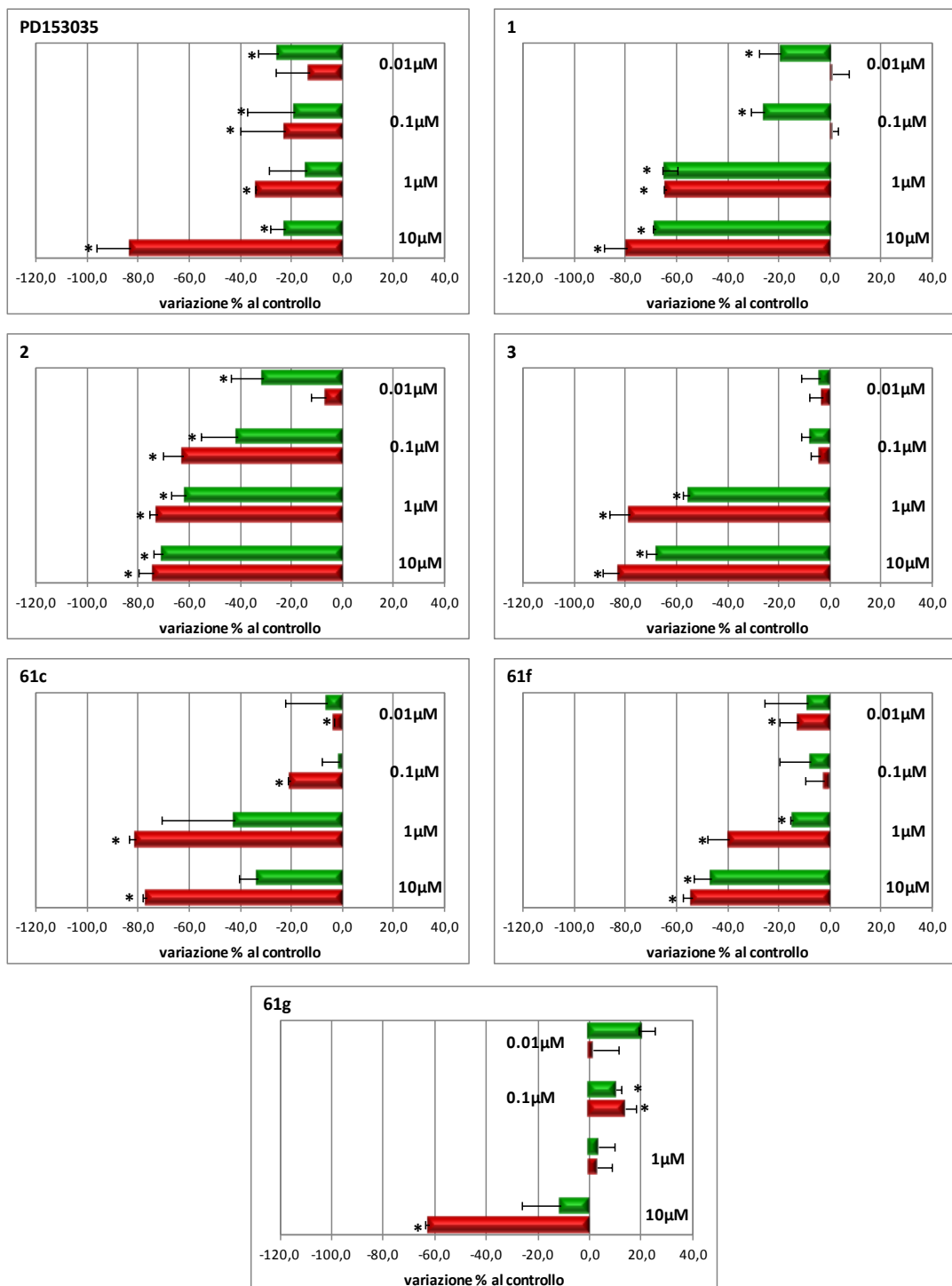


Figura 49. Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione di cellule A431 (*barre rosse*) e NIH3T3 (*barre verdi*). La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 h di incubazione con i composti in esame (0.01-10 μM). I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate considerate come 0), sono riportati come media ± deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

	IC50 μ M A431	IC50 μ M NIH3T3
PD153035	4.42 \pm 1.29	>10
Vandetanib	9.23 \pm 0.33	n.d.
1	0.81 \pm 0.06	0.61 \pm 0.02
2	0.08 \pm 0.01	0.60 \pm 0.20
3	0.66 \pm 0.08	0.92 \pm 0.06
61c	0.53 \pm 0.01	>10
61f	7.93 \pm 0.59	>10
61g	8.31 \pm 0.01	>10

Tabella 6. Valori di IC_{50} determinati in seguito a trattamento per 72 h delle cellule A431 e NIH3T3 con i derivati 4-amminochinazolinici.

Per la maggior parte dei derivati, compreso PD153035, anche se era stata evidenziata una diminuzione dell'attività antiproliferativa in cellule NIH3T3, non esprimenti EGFR, veniva comunque mantenuta una certa attività citotossica, suggerendo quindi una possibile interazione con altri recettori tirosinchinasici. In particolare, i composti **1**, **2** e **3** non sembravano esercitare un'azione preferenziale su EGFR, in quanto i valori di IC_{50} erano paragonabili a quelli calcolati in A431.

e. Effetti sulla proliferazione cellulare indotta da EGF esogeno

Per valutare se i derivati 4-amminochinazolinici fossero in grado di contrastare l'aumento della crescita cellulare indotto da EGF esogeno, sono stati utilizzati due protocolli di trattamento. Nel primo (Figura 50A), le cellule A431 sono state trattate per 24 h con i composti e, dopo rimozione del mezzo di coltura e lavaggio, sono state incubate per 72 h in presenza di EGF utilizzato in concentrazione pari a 5 ng/mL. Nel secondo caso (Figura 50B), i composti e l'EGF sono stati aggiunti nello stesso momento nel terreno di coltura e le cellule sono state incubate per 72 h. Sulla base dei risultati ottenuti negli esperimenti precedenti, i composti sono stati utilizzati in concentrazioni che non avevano modificato la vitalità cellulare nei saggi con MTT, per evitare falsi positivi dovuti ad un effetto citotossico diretto e non ascrivibile ad una azione su EGF. In entrambi i protocolli sperimentali, tutti i composti erano in grado di contrastare in modo significativo l'effetto proliferogeno indotto da EGF, ad eccezione di Vandetanib efficace

solo nel secondo protocollo di trattamento e del composto **3** già studiato che non esercitava alcun effetto.

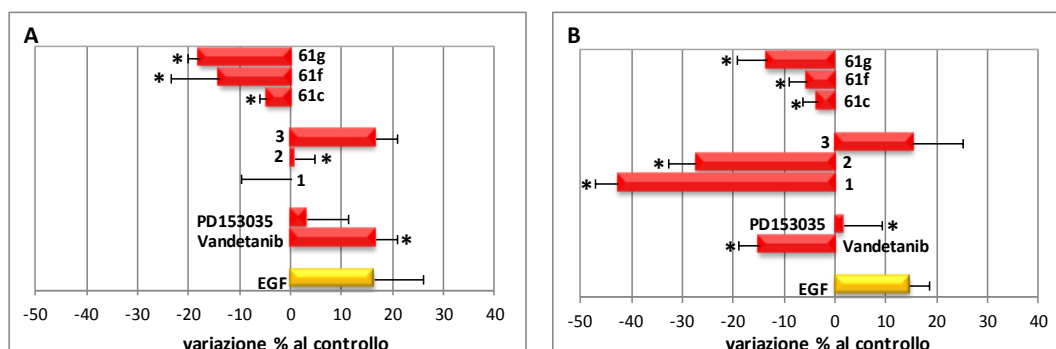


Figura 50. Effetti sulla stimolazione della crescita cellulare indotta da EGF esogeno. **(A)** Dopo 24 h di trattamento con i composti a concentrazione non citotossica, il mezzo è stato rimosso e sostituito con terreno contenente 5 ng/mL EGF. Successivamente le colture sono state incubate per 72 h. **(B)** Le cellule A431 sono state trattate per 72 h con 5 ng/mL EGF e concentrazioni non citotossiche dei composti. Alla fine del periodo di incubazione, la proliferazione cellulare è stata determinata tramite il saggio dell'MTT. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con EGF, t test di Student.

5.5.5. EFFETTI SULL'ATTIVITÀ TIROSINCHINASICA

a. Saggio di immunoprecipitazione e Western Blott

Per verificare se i derivati 4-amminochinazolinici fossero in grado di inibire la fosforilazione di EGFR, è stato condotto un saggio di immuno-precipitazione seguito da Western Blott. Le cellule A431 sono state trattate con i composti in esame per 2 h alla concentrazione di 1 μ M, seguite da una stimolazione con EGF 100 ng/mL per 5 minuti. Dal lisato cellulare è stato immunoprecipitato EGFR. La separazione delle proteine è avvenuta su gel di poliaccrilammide e poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa sulla quale sono poi stati identificati EGFR totale (sia fosforilato che non fosforilato per verificare la quantità di caricamento), EGFR fosforilato, e la proteina adattatrice Shc che da letteratura è noto⁵⁸ rimanere legata ad EGFR dopo la sua fosforilazione. In figura 51 sono riportate le immagine ottenute:

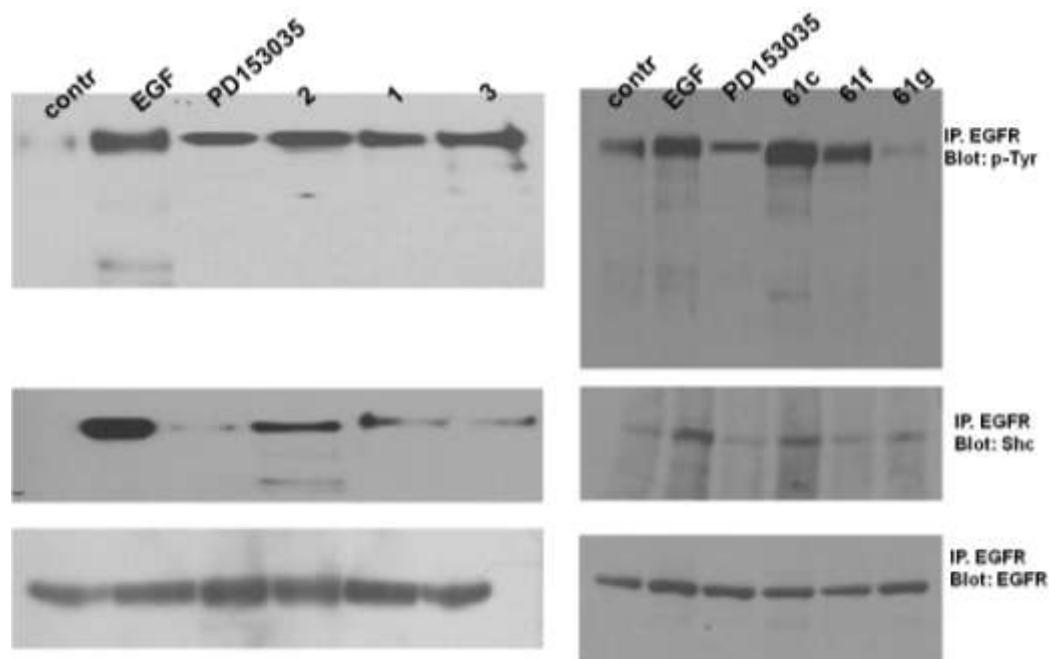


Figura 51. Immagine ottenuta dopo immunoprecipitazione di EGFR da lisato cellulare (A431) e analisi Western Blott.

I risultati ottenuti dimostravano una significativa riduzione della banda di EGFR-fosforilato solo per il composto **61g**: per tutti gli altri derivati 4-amminochinazolinici si evidenziava un segnale di fosforilazione paragonabile a quello del controllo stimolato con EGF. Le bande del segnale di Shc invece risultavano di minore intensità rispetto al controllo positivo in quasi tutti i composti testati ad eccezione di **2** e **61c**.

b. Saggio di inibizione della fosforilazione di un substrato

I risultati ottenuti dal saggio di proliferazione cellulare sulla linea NIH3T3 e dal saggio di fosforilazione di EGFR facevano presupporre che gli effetti citotossici potessero essere ascrivibili all'inibizione di altri recettori tirosinchinasici. Per valutare la bontà di questa ipotesi è stato condotto un saggio di fosforilazione di tipo biochimico sui recettori EGFR, VEGF-2 e FGFR-1, questi ultimi di rilevanza fondamentale nel processo di angiogenesi tumorale.

In tabella 7 sono riportati i dati ottenuti che sembrano dare una prima indicazione che la citotossicità di alcuni derivati possa essere ascrivibile anche al coinvolgimento dell'inibizione di VEGFR-2 e FGFR-1.

	1	2	3	61c	61f	61g	PD153035	Vandetanib
EGFR-wt	++	-	++	+	+	+	+	+
VEGFR-2	+	-	+	+	+	-	+	+
FGFR-1	++	+	++	+	-	-	-	++

Tabella 7. Inibizione della fosforilazione di un substrato da parte di EGFR, VEGFR-2 e FGFR-1: (-) $\leq 20\%$ @ $0.1\mu\text{M}$; (+) $20\div 50\%$ @ $0.1\mu\text{M}$; (++) $\geq 50\%$ @ $0.1\mu\text{M}$.

5.5.6. VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIANGIOGENICA

a. Effetti sulla proliferazione cellulare: HUVEC

In Figura 52 sono contenute le curve dose-risposta ottenute in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con diverse concentrazioni delle sostanze (da 0.01 a 10 μM). I valori di IC_{50} relativi sono riportati in tabella 8. Dal confronto dei valori di IC_{50} si può evidenziare che:

- l'introduzione dei sostituenti eterobiarilici in posizione 4 ha portato solo nel caso del derivato **61c** ad una diminuzione del valore di IC_{50} rispetto ai composti di riferimento PD153035, **1** e **3**;
- i nuovi composti testati mantengono tutti valori di citotossicità paragonabili a quelli ottenuti sulla linea cellulare A431, ad eccezione del composto **61g** che presentava poco o nessun effetto sulla crescita cellulare;
- il composto di riferimento **2** continuava ad avere le modifiche strutturali che miglioravano in misura maggiore l'attività citotossica;

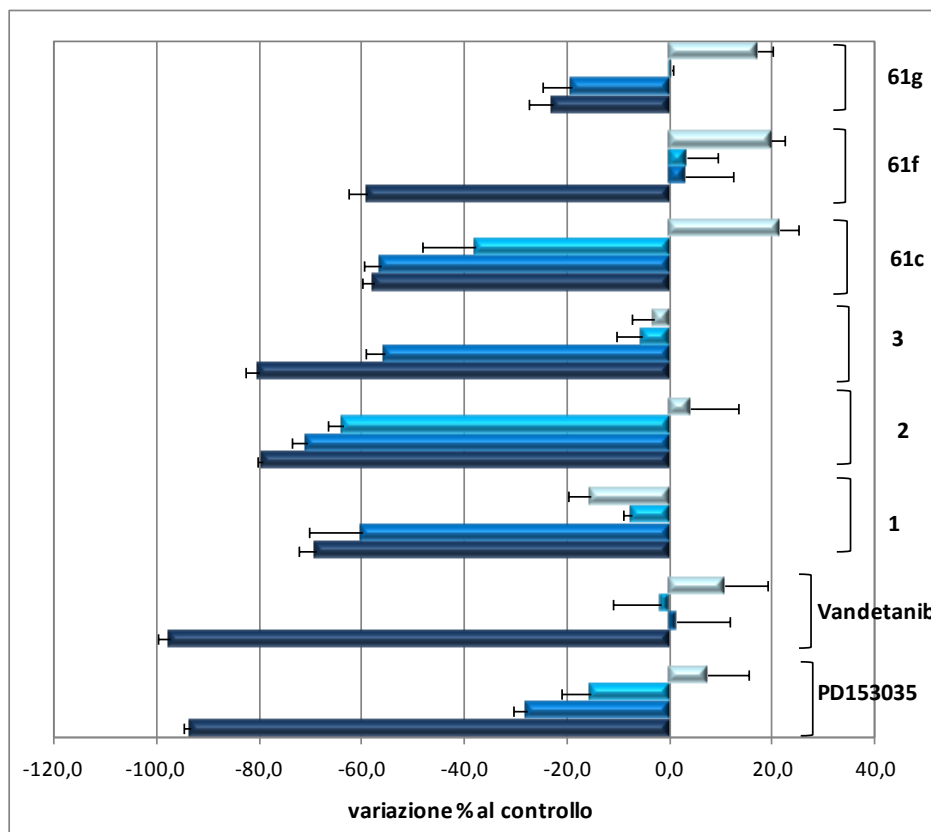


Figura 52. Effetti dei derivati 4-amminochinazolinici sulla proliferazione delle HUVEC. La proliferazione cellulare è stata determinata con MTT dopo 72 h di incubazione con i composti in esame:

■ = 10 μM ; ■ = 0.1 μM ; ■ = 1 μM ; ■ = 0.01 μM

I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

	A431 IC ₅₀ μM	HUVEC IC ₅₀ μM
PD153035	4.42 \pm 1.29	4.06 \pm 0.19
Vandetanib	9.23 \pm 0.33	5.64 \pm 0.42
1	0.81 \pm 0.06	0.75 \pm 0.01
2	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
3	0.66 \pm 0.08	0.91 \pm 0.06
61c	0.52 \pm 0.01	0.60 \pm 0.36
61f	7.93 \pm 0.59	8.73 \pm 0.55
61g	8.31 \pm 0.01	>10

Tabella 8. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72 h delle HUVEC con i derivati 4-amminochinazolinici.

b. Reversibilità degli effetti antiproliferativi

Per verificare la reversibilità dell'effetto antiproliferativo è stato utilizzato il protocollo di trattamento descritto nella sperimentazione con cellule A431, nel quale dopo un'incubazione di 4 h con i composti utilizzati in concentrazione pari a 10 μM , è seguito un periodo di recupero di 68 h (Figura 53). Comparando i risultati con quelli ottenuti in seguito ad un trattamento continuo per 72 h, si osservava che l'effetto antiproliferativo del composto **61c** veniva mantenuto anche dopo il periodo di recupero, come per i composti di riferimento **1**, **2** e **3**, per i quali i dati erano già conosciuti dal lavoro precedente. Diversamente, per PD153035 e Vandetanib e per i derivati **61f** e **61g** la proliferazione cellulare ritornava a valori paragonabili a quelli rilevati nelle colture di controllo non trattate.

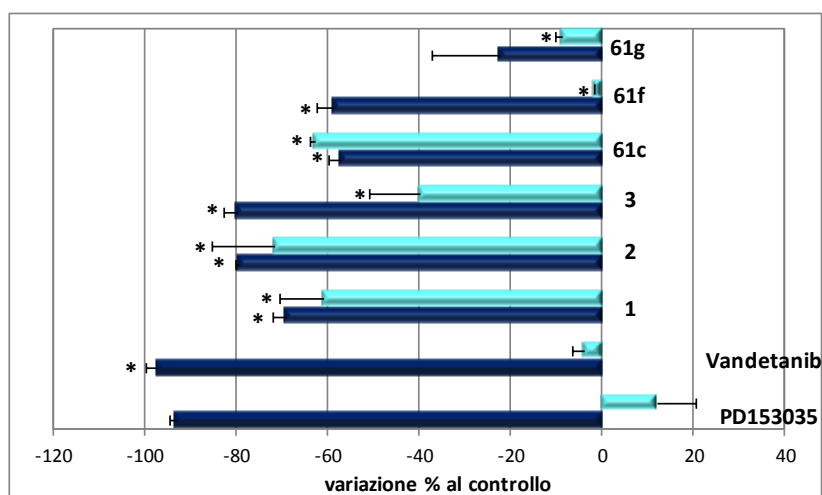


Figura 53. Reversibilità dell'effetto antiproliferativo dei derivati 4-amminochinazolinici sulle HUVEC. Dopo 4 h di trattamento con i composti in esame (10 μM), il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno fresco. Dopo incubazione per 68 h, la proliferazione cellulare è stata determinata con il saggio dell'MTT. Parallelamente, è stato anche effettuato un trattamento continuo per 72 h con i composti. **Barre chiare:** 4 h di trattamento + 68 h di recupero; **barre scure:** 72 h di trattamento. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

c. Effetti sulla migrazione cellulare

Per verificare la capacità dei composti di inibire la migrazione delle cellule endoteliali, è stato utilizzata una variante della camera di Boyden, in cui le cellule vengono seminate sulla parte superiore di un *insert*, costituito da una membrana in policarbonato con pori del diametro di 5 μm . L'*insert* veniva inserito in un pozzetto riempito con terreno di

coltura contenente fattori chemotattici, che stimolano il passaggio delle cellule attraverso la membrana. L'esperimento è stato eseguito seminando le cellule sul comparto superiore del filtro in presenza o in assenza dei derivati 4-amminochinazolinici. I composti sono stati utilizzati a concentrazione non citotossica, pari a 1 μM , come dimostrato dai risultati del saggio dell'MTT effettuato in seguito ad esposizione per 4 h (dati non mostrati). I filtri sono stati quindi inseriti in pozzetti a contatto con terreno completo di fattori aggiunto all'interno dei singoli pozzetti. Dopo un periodo di incubazione di 4 h, le colture sono state fissate e le cellule che avevano attraversato il setto poroso, quindi adese alla faccia inferiore, sono state contate attraverso l'impiego di un microscopio a fluorescenza, dopo trattamento con un montante acquoso contenente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo), sostanza caratterizzata da una intensa fluorescenza blu e che si intercala nel DNA. La migrazione è stata espressa come percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate con i composti (Figura 54).

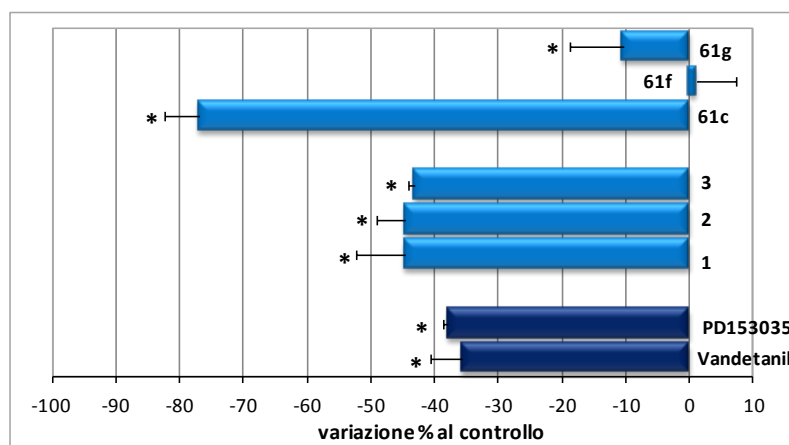


Figura 54. Effetti sulla migrazione cellulare. HUVEC migrate attraverso un setto poroso avente pori dal diametro di 5 μm dopo 4 h di incubazione con terreno addizionato con i composti in esame alla concentrazione 1 μM . I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate), t test di Student.

I dati ottenuti dimostrano come, oltre ai composti già studiati e ai composti di riferimento, sia il composto **61c** che il composto **61g** siano in grado di inibire la migrazione delle cellule endoteliali attraverso il setto poroso e, il derivato **61c** anche in percentuale maggiore rispetto a tutti gli altri. Il derivato **61f** non dimostrava invece nessuna variazione significativa rispetto alle cellule di controllo non trattate.

d. Morfogenesi su Matrigel

Per valutare *in vitro* l'effetto dei derivati 4-amminochinazolinici sulla morfogenesi, le HUVEC sono state seminate su Matrigel, un estratto di un sarcoma murino ricco di componenti della membrana basale e ampiamente utilizzato per determinare *in vitro* l'azione pro- o antiangiogenica di sostanze di origine sia naturale che sintetica. Le cellule endoteliali non trattate si organizzano in modo tale da formare all'interno del gel strutture a maglie chiuse. Le colture sono state trattate per 18 h con i composti utilizzati a concentrazione non citotossica pari a 0.1 μM , come dimostrato dai risultati del saggio dell'MTT effettuato in seguito ad esposizione per 18 h (dati non mostrati). Per il saggio di morfogenesi, le colture sono state fissate e per ciascuna di esse sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio a contrasto di fase collegato ad una fotocamera digitale. Su tali immagini, grazie ad un sistema computerizzato di analisi di immagine, sono stati misurati parametri dimensionali, quali, l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali e la lunghezza totale della rete cellulare per campo, e parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e i punti di ramificazione per campo. Da un punto di vista quantitativo (Figura 55), PD153035 diminuiva in modo significativo l'area percentuale coperta dalle cellule endoteliali, il numero di maglie chiuse e l'area da esse occupata rapportata all'area totale, Vandetanib induceva invece una diminuzione solo dell'area percentuale. Tutti i composti diminuivano significativamente il numero di maglie e l'area percentuale ricoperta da esse. Il numero di ramificazioni veniva diminuito da tutti e tre i nuovi composti testati, analogamente al composto **2** che si dimostrava l'unico derivato in grado di modificare significativamente in negativo tutti i parametri considerati. La lunghezza delle maglie era diminuita, oltre che dal composto **2** anche dai composti **3**, **61c** e **61g**.

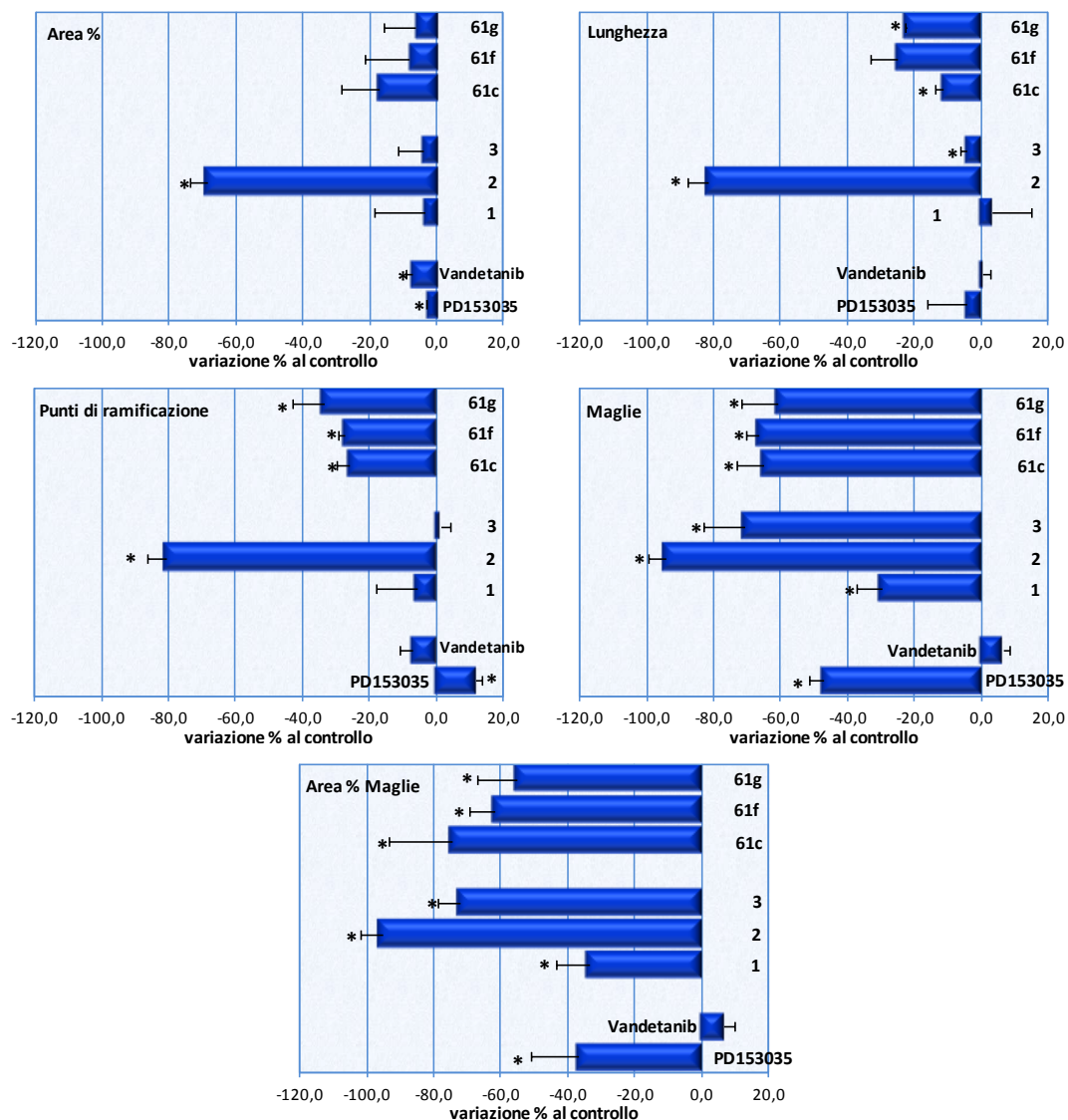


Figura 55. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

e. Effetti sulla morfogenesi indotta da citochine esogene

➤ FGF-2

La sperimentazione è stata effettuata utilizzando i composti in concentrazione pari a 0.1 μM . Come mostrato in Figura 56, a tale dosaggio solo i composti **2** e **61c** riuscivano a contrastare l'effetto proliferogeno di FGF-2, mentre tutti gli altri derivati risultavano totalmente o parzialmente inefficaci. Il trattamento delle colture con 50 ng/mL FGF-2 induceva un aumento di tutti i parametri rispetto a quanto osservato nelle colture di controllo non trattate (Figura 57).

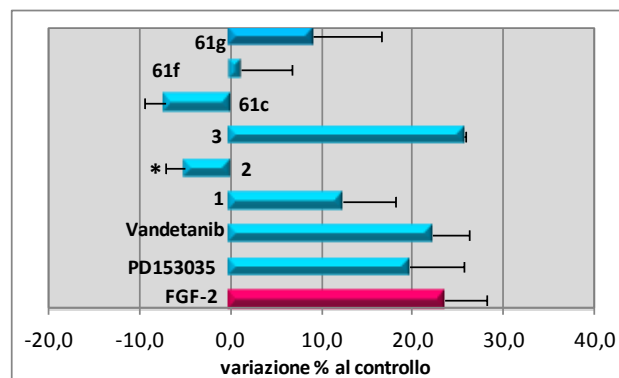


Figura 56. Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT. La proliferazione cellulare è stata determinata dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 50 ng/mL di FGF-2 e i derivati 4-amminochinazolinici in concentrazione 0.1 μ M. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture trattate con FGF-2), t test di Student.

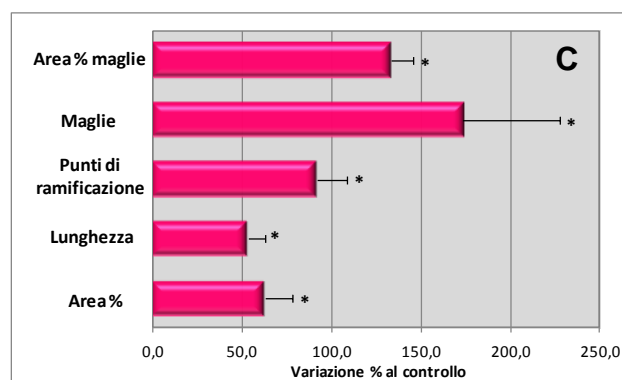
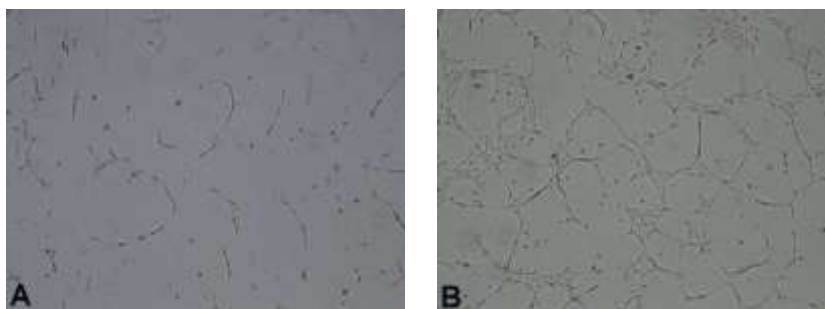


Figura 57. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate (B) per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

I composti di riferimento PD153035 e **3** contrastavano l'effetto della citochina sulla lunghezza totale della rete cellulare, sul numero di maglie chiuse e sulla loro area percentuale. I composti **1**, **2** e **61c** diminuivano tutti i parametri considerati, mentre il composto **61f** diminuiva il numero di maglie chiuse e l'area percentuale da esse ricoperta. Il derivato **61g** analogamente a Vandetanib erano completamente inefficaci.

Nessuno dei nuovi derivati ha diminuito i parametri considerati in modo paragonabile al composto **2** (Figura 58).

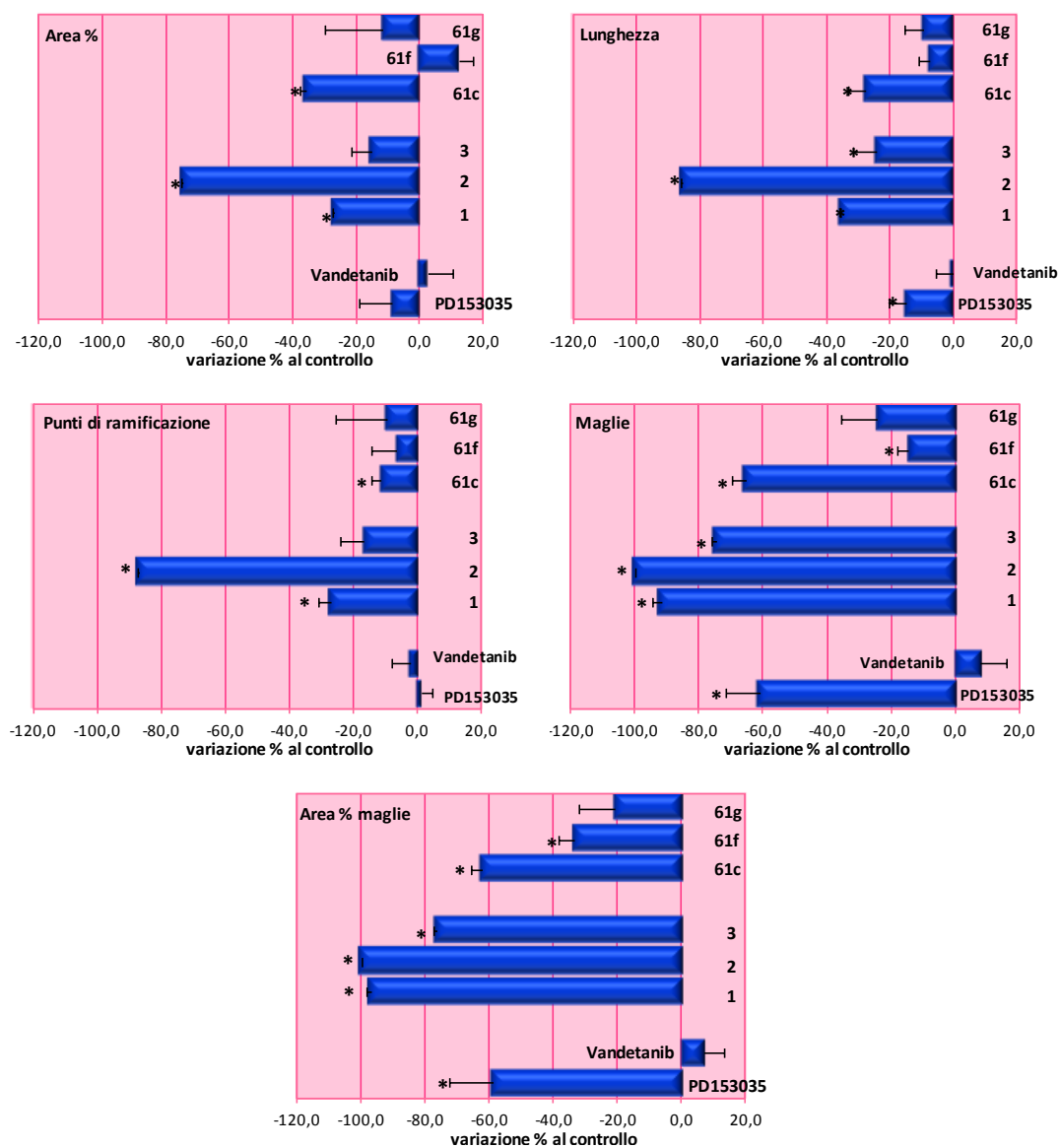


Figura 58. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0.1 μM e 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con FGF-2, t test di Student.

➤ VEGF

La sperimentazione è stata effettuata utilizzando i composti in concentrazione pari a 0.1 μM . A tale concentrazione, solo il composto **2** contrastava l'effetto della citochina, mentre gli altri erano inefficienti (Figura 59).

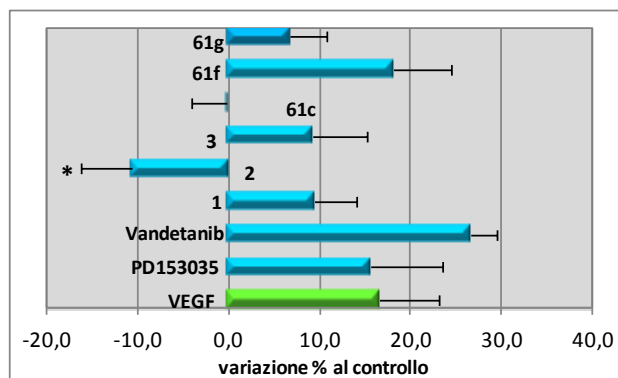


Figura 59. Determinazione della vitalità cellulare utilizzando il saggio dell'MTT. La proliferazione cellulare è stata determinata dopo 18 h di incubazione utilizzando contemporaneamente 20 ng/mL di VEGF e i derivati 4-amminochinazolinici in concentrazione 0.1 μ M. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo (colture trattate con VEGF), t test di Student.

Il trattamento delle colture con 20 ng/mL VEGF induceva un aumento di tutti i parametri rispetto a quanto osservato nelle colture di controllo non trattate (Figura 60).

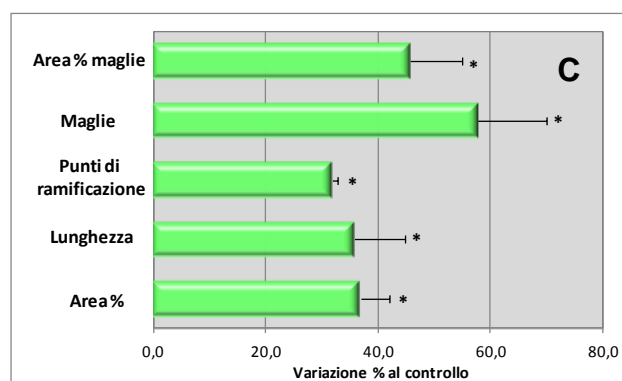
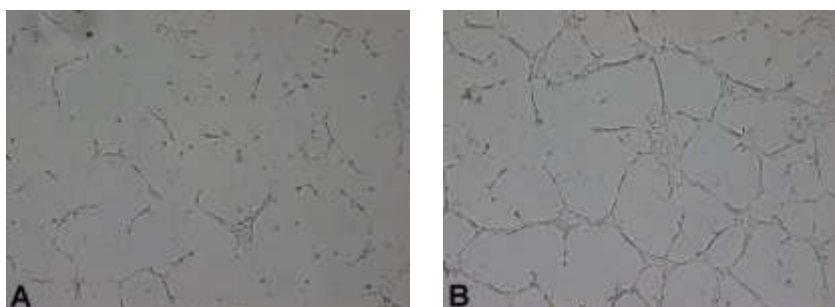


Figura 60. HUVEC coltivate su Matrigel non trattate (A) e trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF (B). (C) Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 20 ng/mL di VEGF. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student.

Il composto **61f** diminuiva solo il numero di maglie, Vandetanib si dimostrava inefficace, il composto **61g** diminuiva tutti i parametri tranne la percentuale di area ricoperta dalle maglie. Solo il composto **61c** diminuisce in modo significativo tutti i parametri sia

topologici che dimensionali considerati come PD153035 e i derivati chinazolinici **1**, **2** e **3** precedentemente studiati (Figura 61).

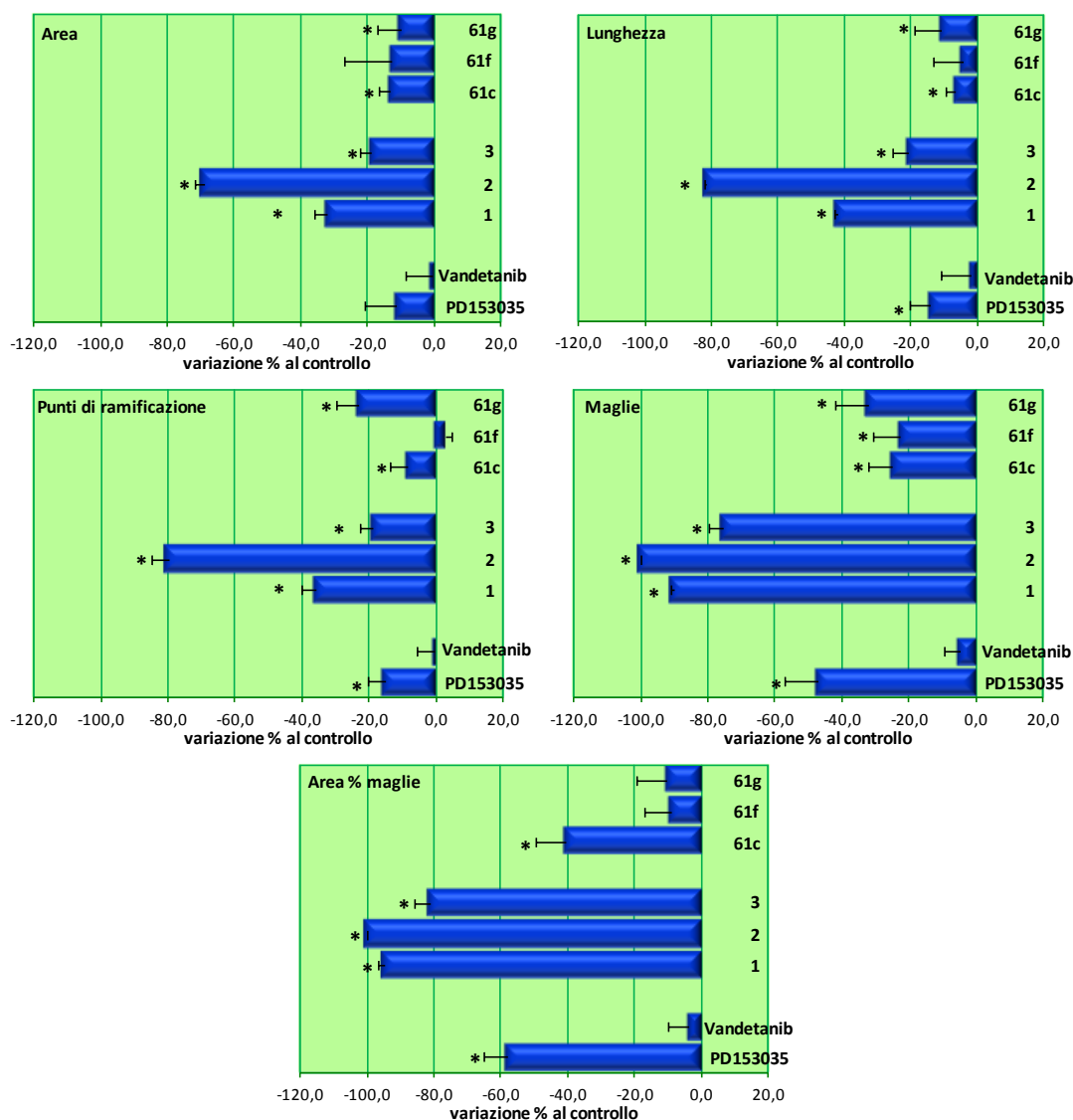


Figura 61. Morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione 0.1 μ M e 20 ng/mL di VEGF. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs colture trattate con VEGF, t test di Student.

5.5.7. VALUTAZIONE IN VIVO DEI COMPOSTI

La valutazione dei composti, visti i risultati ottenuti *in vitro*, è continuata anche *in vivo*. Infatti, molti fattori e variabili del processo angiogenico sono difficili da valutare appieno *in vitro*. In letteratura, inoltre, sono presenti numerosi lavori in cui è stato dimostrato come composti in grado di interferire con una o più fasi del processo angiogenico *in*

vitro, non abbiano la stessa attività anche *in vivo*. E' quindi indispensabile affiancare i risultati ottenuti dai modelli *in vitro* a quelli derivanti da saggi *in vivo*.

Dopo 7 giorni dall'impianto i *plug* sono stati rimossi ed è stata quantificata la concentrazione di emoglobina presente in ciascuno di essi (Figura 62). Tutti i derivati 4-amminochinazolinici, con l'eccezione di PD153035 e del composto **61g**, riuscivano a diminuire in modo significativo il contenuto della proteina rispetto a quanto determinato nei campioni contenenti solo FGF-2. In particolare i composti **61c** e **61f** *in vivo* diminuivano in misura maggiore la concentrazione di emoglobina nel *plug* se confrontata con i composti **1**, **2** e **3** precedentemente studiati che diminuivano ma non annullavano l'effetto pro-angiogenico di FGF-2.

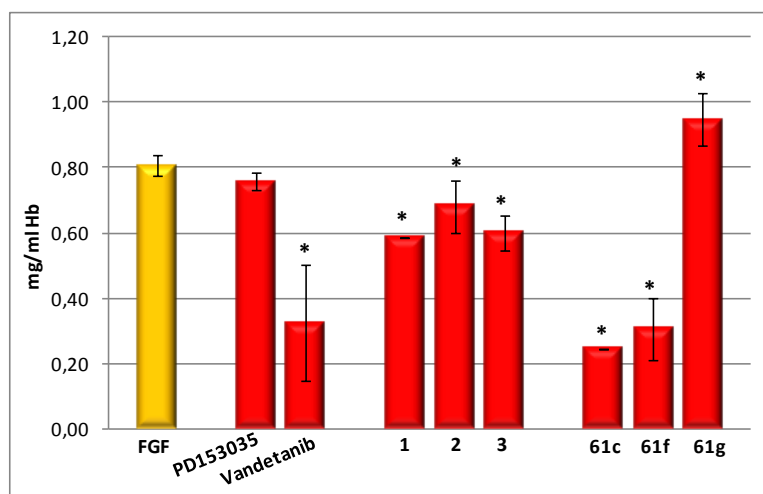


Figura 62. Determinazione della concentrazione di emoglobina presente nei *plug* di Matrigel contenenti 200 ng/mL di FGF-2 e in presenza o meno dei derivati in analisi in concentrazione di 1 μ M. I *plug* sono stati rimossi a 7 giorni dall'impianto ed è stata determinata la concentrazione di emoglobina attraverso un saggio colorimetrico con l'impiego del kit Drabkin's Reagent. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media \pm deviazione standard.

* = $p < 0.05$ vs FGF-2; t test di Student.

5.5.5. VALUTAZIONE ATTIVITÀ MULTI-INIBITORIA

Per rendere più completo il profilo di citotossicità dei composti fino ad ora studiati si è reso necessario ampliare anche il pannello di linee tumorali sulle quali valutare l'attività antiproliferativa dei derivati 4-amminochinazolinici. In mancanza di linee cellulari, commercialmente disponibili, che sovra-esprimano in modo particolare un'unica tirosinchinasi, sono state scelte linee che derivano da tumori umani originari di tessuti diversi: MCF-7 (cellule di tumore mammario), HT-29 (cellule di tumore di colon), HeLa

(cellule di tumore della cervice uterina) e le cellule HepG2 (cellule di epatocarcinoma): è noto infatti che le tirosinchinasi sono generalmente sovra-esprese nella maggior parte dei tumori solidi umani. In tabella 9 sono riportati i risultati ottenuti con il saggio di vitalità cellulare dell'MTT a 72 h di trattamento (per completezza sono riportati anche i dati già mostrati in precedenza su A431, NIH3T3 e HUVEC).

	IC ₅₀ μ M						
	A431	NIH3T3	HUVEC	MCF-7	HT-29	HeLa	HepG2
PD153035	4.42 \pm 1.29	>10	4.06 \pm 0.19	8.214 \pm 0.71	>10	>10	4.98 \pm 1.14
Vandetanib	9.23 \pm 0.33	n.d.	5.64 \pm 0.42	6.09 \pm 0.25	6.81 \pm 0.58	6.12 \pm 0.33	3.73 \pm 0.91
1	0.81 \pm 0.06	0.61 \pm 0.02	0.75 \pm 0.01	0.77 \pm 0.02	0.95 \pm 0.06	0.77 \pm 0.02	>10
2	0.08 \pm 0.01	0.60 \pm 0.20	0.08 \pm 0.01	0.74 \pm 0.06	0.68 \pm 0.36	0.62 \pm 0.01	2.10 \pm 0.39
3	0.66 \pm 0.08	0.92 \pm 0.06	0.91 \pm 0.06	0.70 \pm 0.11	0.71 \pm 0.01	5.49 \pm 0.62	>10
61c	0.53 \pm 0.01	>10	0.60 \pm 0.36	0.09 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.74 \pm 0.06	0.80 \pm 0.11
61f	7.93 \pm 0.59	>10	8.73 \pm 0.55	7.10 \pm 0.12	0.87 \pm 0.14	0.91 \pm 0.08	>10
61g	8.31 \pm 0.01	>10	>10	>10	6.78 \pm 0.99	8.23 \pm 0.75	>10

Tabella 9. Valori di IC₅₀ determinati in seguito a trattamento per 72h delle cellule A431, NIH3T3, HUVEC, MCF-7, HT-29 e HeLa con i derivati 4-amminochinazolinici.

Tutti i composti erano in grado di diminuire la vitalità cellulare delle cellule HT-29 e HeLa ad eccezione del composto di riferimento PD153035. In particolare il composto **61c**, sulle cellule HT-29, si dimostrava il più efficace con un valore di IC₅₀ inferiore di un ordine di grandezza rispetto a tutti gli altri. Sulla linea MCF-7 invece, **61g** era l'unico derivato chinazolinico non efficace nell'indurre una diminuzione della proliferazione cellulare. Anche in questo caso il composto **61c** presentava il grado di citotossicità più elevato di quasi dieci volte rispetto a tutti gli altri derivati. Infine sulla linea cellulare HepG2 erano attivi solo i composti di riferimento PD153035 e Vandetanib, e i derivati **2** e **61c**: ma solo quest'ultimo manteneva un'IC₅₀ inferiore a 1 μ M.

In linea generale il composto **61c** si rivelava essere l'unico derivato chinazolinico in grado di inibire tutte le linee tumorali considerate e in misura maggiore rispetto agli altri composti.

I risultati ottenuti dimostravano la capacità dei composti di inibire la proliferazione di più linee cellulari; poichè è noto che una gran parte dei tumori è caratterizzata da deregolazioni e/o sovra-espressioni di una o più tirosinchinasi^{59,7, 6, 60} e per indagare più a fondo il meccanismo d'azione dei composti fino ad ora studiati, è stato ampliato anche il pannello di tirosinchinasi isolate (recettoriali e non), coinvolte nella patologia tumorale, per determinare se *in vitro* i derivati chinazolinici fossero in grado di inibire la fosforilazione chinasi-catalizzata (Tabella 10).

	wt ^{EGFR}	T790M ^{EGFR}	VEGFR-2	FGFR-1	PDGFR	src	Abl
1	++	-	+	++	+	++	+
2	-	-	-	+	++	-	++
3	++	-	+	++	-	-	++
61c	+	-	+	+	-	n.d	-
61f	+	-	+	-	-	n.d	-
61g	+	-	-	-	-	n.d	-
PD153035	+	-	+	-	-	++	++
Vandetanib	+	-	-	++	++	++	++

Tabella 10. Inibizione delle chinasi isolate e attive da parte dei composti alla concentrazione 0.1 μ M. Inibizione: - $\leq 20\%$ @ 0.1 μ M; + 20÷50% @ 0.1 μ M; ++ $\geq 50\%$ @ 0.1 μ M. (n.d.= non ancora determinata).

Tutti i composti risultavano in effetti in grado di inibire, seppure in misura diversa, l'attività catalitica di più enzimi. Nessuno dei derivati chinazolinici era però in grado di diminuire l'azione enzimatica di T790M^{EGFR}, la mutazione più frequente presente in vari tumori polmonari e che permette la resistenza a Gefitinib e Erlotinib. Dai risultati ottenuti si può quindi ipotizzare che l'attività citotossica di tali molecole sia dovuta da un'inibizione multipla di più tirosinchinasi.

6. CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati sintetizzati vari composti a struttura chinazolinica seguendo una strategia sintetica innovativa messa a punto in precedenza in questo gruppo di ricerca.¹

A partire dalla struttura del composto **2**, sono state sintetizzate quattro serie di derivati chinazolinici con le seguenti caratteristiche strutturali:

Classe 1: è stata mantenuta la porzione amminobifenilica, mentre nelle posizioni 6 e in 7 del nucleo chinazolinico sono state condensate le catene laterali di due farmaci (Erlotinib e Gefitinib) e di PD153035;

Classe 2: è stato mantenuto il nucleo diossanico e sono state fatte modifiche solo a livello del sostituente in posizione 4, condensando diversi sostituenti amminoeterobiarilici;

Classe 3: in posizione 6 e 7 sono state condensate delle funzioni alliliche allo scopo di ottenere potenziali inibitori irreversibili;

Classe 4: il ponte amminico è stato sostituito con un ponte eterico.

Dai risultati ottenuti dai saggi di citotossicità su cellule A431, sovra-espressanti EGFR, è emerso che la funzionalizzazione in posizione 6 e 7 con le catene laterali caratteristiche di Erlotinib, Gefitinib e PD153035 non porta ad un aumento dell'attività antiproliferativa rispetto al composto **2**. Anche l'introduzione del ponte eterico ha portato allo stesso risultato, confermando che l'elemento fondamentale per avere elevata attività citotossica è il nucleo 6,7-etilendiossi-4-amminochinazolinico. L'introduzione di una funzione allilica in posizione 6 o 7 non ha portato ad un aumento dell'attività antiproliferativa rispetto al derivato **2**. Tuttavia, la sostituzione dell'amminobifenile con aniline commercialmente disponibili, come la bromo anilina, ha portato a valori di IC₅₀ paragonabili a quelli di PD153035.

I risultati ottenuti hanno inoltre dimostrato come i sostituenti in posizione 4 possano modulare l'attività antiproliferativa. L'introduzione di sostituenti eterobiarilici ha portato ad un'attività antiproliferativa paragonabile a quella dei composti **1** e **3** quando il sostituente era una 3-(furan-2'-il)anilina, e paragonabile a Vandetanib quando il sostituente era una fenilpiridina o una pirimidinilpiridina.

Tra i nuovi derivati tuttavia, solo il derivato **61c** è risultato possedere un effetto antiproliferativo parzialmente reversibile (analogamente ai derivati **1**, **2** e **3**), mantenendo la sua attività inibitoria anche in seguito a rimozione del composto dal mezzo di coltura.

Sulla linea cellulare NIH3T3 (non esprimente EGFR) nessuno dei nuovi composti testati ha mostrato un valore di IC_{50} inferiore a 10 μ M.

Tra i nuovi composti, tre (**61c**, **61f** e **61g**) si sono dimostrati in grado di contrastare l'effetto proliferativo indotto da EGF esogeno. Questo effetto è stato evidenziato non solo quando il composto è stato aggiunto alle colture contemporaneamente alla citochina, ma anche quando le cellule venivano esposte a EGF in seguito ad un pre-trattamento con il composto.

Solo il derivato **61g** ha però dimostrato di essere in grado di inibire l'autofosforilazione di EGFR in misura tale da poter ascrivere l'attività citotossica solo all'inibizione di questo recettore; gli altri composti diminuivano tuttavia, almeno in parte, la fosforilazione della proteina Shc, proteina adattatrice di EGFR, ma che può essere attivata anche da altre chinasi attraverso l'interazione con un dominio diverso⁶¹ e che, unitamente ad altri dati, ha fatto ipotizzare l'inibizione di altri bersagli molecolari.

Per approfondire il meccanismo d'azione di questi composti è stato quindi preso in considerazione un tipo di saggio diverso, che ha permesso di valutare la capacità dei derivati chinazolinici di inibire l'attività catalitica di varie tirosinchinasi: sono stati presi in considerazione, oltre ad EGFR, anche due recettori coinvolti nel processo di angiogenesi, quali VEGFR-2 e FGFR-1, sovra-espressi anch'essi dalle cellule tumorali. Quasi tutti i composti sembrano inibire effettivamente, seppure in misura diversa, l'attività enzimatica di uno o più recettori e questo potrebbe potenziare l'attività antitumorale di tali derivati grazie ad un'inibizione dell'angiogenesi. I recettori tirosinchinasici per VEGF e FGF sono infatti espressi dalle cellule endoteliali che sono attivate nel processo di angiogenesi.⁶² I risultati ottenuti sulle HUVEC indicano che, soprattutto i composti **61c** e **61f**, analogamente ai derivati chinazolinici **1**, **2** e **3**, influenzano varie fasi del processo che porta alla formazione di nuovi vasi. Ad alte concentrazioni, infatti, esercitano, nei confronti delle cellule endoteliali, un effetto antiproliferativo, mentre, a concentrazioni non citotossiche, inibiscono la migrazione cellulare e la formazione di strutture tubolari. E' noto che nel microambiente tumorale sono presenti grandi quantità di fattori di crescita pro-angiogenici, prodotti dalle cellule tumorali stesse, che in tal modo, tramite

un meccanismo autocrino-paracrino, sostengono sia la loro proliferazione sia la formazione di una rete microvascolare necessaria per la loro sopravvivenza e successivamente per la loro migrazione. È quindi auspicabile che un agente antitumorale sia in grado di contrastare anche gli effetti di stimolazione indotti da queste citochine. Negli esperimenti effettuati con VEGF esogeno tutti i composti, ad eccezione di Vandetanib e di **61g**, sono risultati più efficaci di PD153035 nell'inibire l'aumento della morfogenesi indotto dalla citochina. Dei nuovi composti solo **61c**, oltre ai derivati **1**, **2** e **3**, è risultato in grado di annullare l'aumento nella formazione di strutture tubulari su Matrigel indotto da FGF-2 esogeno in misura maggiore rispetto a PD153035.

È importante sottolineare che gli effetti d'inibizione sulla morfogenesi e sulla migrazione cellulare, osservati sia in presenza che in assenza di VEGF e FGF-2, sono stati ottenuti utilizzando concentrazioni non citotossiche dei composti. Questo fatto potrebbe assumere particolare importanza in prospettiva di un possibile utilizzo dei derivati 4-aminochinazolinici in ambito terapeutico. Infatti, il blocco dell'angiogenesi raggiungibile a dosaggi non citotossici potrebbe garantire attività antitumorale priva degli effetti collaterali collegati a un'azione indiscriminata anche sulle cellule normali.

Infine sebbene *in vitro* la valutazione dei derivati abbia dimostrato che il composto **2** potesse essere il composto più promettente in termini di attività, *in vivo* i derivati **61c** e **61f** si dimostrano i più efficaci nel diminuire il contenuto di emoglobina nel plug di Matrigel vascularizzato, diminuendo in modo significativo e in misura maggiore l'effetto pro-angiogenico di FGF-2: questo risultato può essere dovuto ad una diversa farmacocinetica dei nuovi composti.

Nell'ultima parte del lavoro, sono stati ampliati sia il pannello di linee cellulari tumorali umane che il pannello di tirosinchinasi, prendendo in considerazione sia RTK che NRTK. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i composti inibiscono la proliferazione di più linee cellulari, caratterizzate da un diverso grado di sovra-espressione di diverse TK. Il risultato è stato comprovato anche da saggi di inibizione su chinasi isolate: infatti, tutti i derivati (ad eccezione del composto **61g** che è risultato attivo solo contro EGFR, confermando l'analisi Western Blott) sono in grado di inibire almeno due TK.

Questi dati, insieme ai risultati ottenuti nei saggi di angiogenesi, sembrano confermare l'ipotesi che la citotossicità di questi composti sia ascrivibile ad un'azione inibitoria di più tirosinchinasi e che questi derivati possano essere definiti multi-*target*.

Data la capacità di alcuni derivati chinazolinici di inibire Src e Abl, in futuro sarà interessante testare l'attività dei composti su linee leucemiche.

7. PARTE SPERIMENTALE

7.1. MATERIALI

I prodotti ed i reagenti impiegati (*Acros* ed *Aldrich*) sono stati utilizzati come tali, senza purificazioni.

La purezza dei solventi organici (*Carlo Erba* e *Lab Scan*) è di grado analitico.

I solventi deuterati utilizzati per NMR (*Isotec*) presentano grado di purezza isotopica minimo 99.5%.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su lastre al gel di silice 60 F₂₅₄ (0.2 mm, *Merck*), eluendo come indicato volta per volta.

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (0.063-0.100 mm, *Merck*), eluendo con i solventi di volta in volta indicati.

Le cellule A431 ed NIH3T3 sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. I domini intracellulari attivati di FGFR-1, VEGFR-2 e PDGFR- β e le chinasi Abl e Src sono stati acquistati da Sigma. I domini intracellulari attivati di ^{wt}EGFR e ^{T790M}EGFR sono stati acquistati da *Invitrogen*.

7.2. STRUMENTAZIONE

I punti di fusione sono stati determinati in capillare aperto, utilizzando un apparecchio per punto di fusione Gallenkamp MFB-595-010M.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati eseguiti con spettrometro Bruker 300-AMX, utilizzando TMS come standard interno ($\delta = 0$) ed i solventi deuterati di volta in volta indicati; i valori di assorbimento sono espressi in δ e le costanti in Hz.

Gli spettri di massa sono stati realizzati su spettrometro Applied Biosystem Mariner System 5220 per iniezione diretta del campione.

Per le reazioni assistite da microonde è stato utilizzato un reattore di tipo monomodale (CEM Discover) con sistema di controllo della potenza e della temperatura automatici.

Per la lettura dei valori di assorbanza dei cristalli di formazano è stato utilizzato uno spettrofotometro UV Microplate autoreader EL 13 a 570 nm a singola lunghezza d'onda.

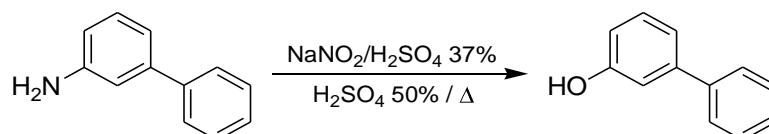
Per l'analisi della percentuale di cellule Annessina V⁺, PI⁺ stato utilizzato un citofluorimetro FACSCalibur (*Becton Dickinson*). I dati ottenuti sono stati elaborati con il software *BD Cell Quest™*.

Per l'acquisizione delle immagini relative all'inibizione dell'attività chinasica è stato utilizzato il sistema VersaDoc (*Biorad*) con il software *Quantity One (Biorad)*.

7.3. METODI DI SINTESI

7.3.1. SINTESI DI SINTONI AMMINO E IDROSSIBIARILICI

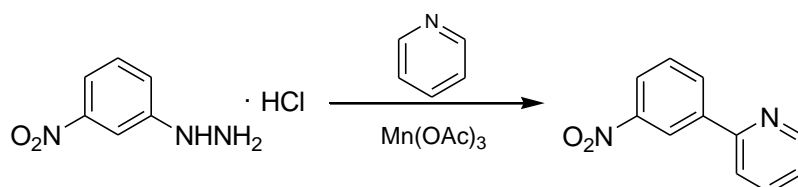
Sintesi di 3-idrossibifenile



Una sospensione di 3-amminobifenile (0.5 g, 3.1 mmoli) in H₂SO₄ 37% (3 mL) e ghiaccio (7.1 g) è stata portata a -10 °C e aggiunta lentamente di una soluzione di NaNO₂ (0.2 g, 3.8 mmoli) in H₂O (1 mL), ad una velocità tale da mantenere la temperatura al di sotto di -5 °C. La miscela di reazione è stata quindi mantenuta in agitazione a -5°C per 30 minuti e quindi lentamente aggiunta ad una soluzione di H₂SO₄ 50% (6 mL) preventivamente riscaldata a 100 °C. La miscela ottenuta è stata mantenuta all'ebollizione per 15 minuti (TLC: CE/EtOAc, 5/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita con H₂O (50 mL), estratta a fondo con CHCl₃ (3 x 20 mL), anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CE/EtOAc 8:2), ottenendo il **3-idrossibifenile** (0.2 g, resa 48%), con p.f. 73 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.51 (s, 1 H, OH); 7.61-7.55 (m, 2 H, 2'-H e 6'-H); 7.44 (t, J=7.1, 2 H, 3'-H e 5'-H); 7.34 (tt, J=7.1, J=1.7, 1 H, 4'-H); 7.25 (t, J=8.0, 1 H, 5-H); 7.05 (dt, J=8.0, J=2.0, 1 H, 4-H o 6-H); 7.00 (t, J=2.0, 1 H, 2-H); 6.76 (dt, J=8.0, J=2.0, 1 H, 4-H o 6-H).

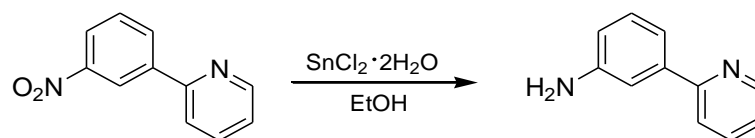
Sintesi di 3-(piridin-2'-il)nitrobenzene



Ad una soluzione di 3-nitrofenilidrazina cloridrato (1.2 g, 6.3 mmoli) in piridina (100 mL), è stato aggiunto $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.0 g, 18.9 mmoli). La miscela è stata quindi posta a riflusso per 4 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1).

Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido ottenuto purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl_3), portando all'ottenimento del 3-(piridin-2'-il)nitrobenzene (3.2 g, resa 25%), con p.f. 64 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3-d): 8.87 (t, $J=1.6$, 1 H, 2'-H); 8.74 (dt, $J=4.7$, $J=1.1$, 1 H, 6-H); 8.38 (dt, $J=7.7$, $J=1.6$, 1 H, 4'-H o 6'-H); 8.27 (dt, $J=7.7$, $J=1.6$, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.87-7.80 (m, 2 H, 4-H e 3-H); 7.66 (t, $J=7.7$, 1 H, 5'-H); 7.36-7.31 (m, 1 H, 5-H).

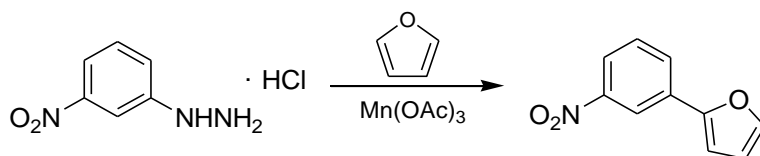
Sintesi di 3-(piridin-2'-il)anilina

Ad una soluzione di 3-(piridin-2'-il)nitrobenzene (0.2 g, 0.9 mmoli) in EtOH (7 mL) è stato aggiunto $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.7 g, 4.4 mmoli) e la miscela ottenuta posta a riflusso per 2 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza, il residuo ripreso con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (100 mL) ed estratto con EtOAc (3 x 40 mL). La fase organica risultante è stata anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e concentrata a secchezza, portando all'ottenimento della **3-(piridin-2'-il)anilina** (0.1 g, resa 80%), di consistenza oleosa.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 8.61 (dd, $J=4.8$, $J=1.7$, 1 H, 6'-H); 7.86-7.77 (m, 2 H, 3'-H e 4'-H); 7.33 (t, $J=2.1$, 1 H, 2-H); 7.32-7.28 (m, 1 H, 5'-H); 7.17 (dt, $J=7.6$, $J=2.1$, 1 H, 4-H); 7.11 (t, $J=7.6$, 1 H, 5-H); 6.62 (dt, $J=7.6$, $J=2.1$, 1 H, 6-H); 5.18 (s all, 2 H, NH_2).

Sintesi di 3-(furan-2'-il)nitrobenzene

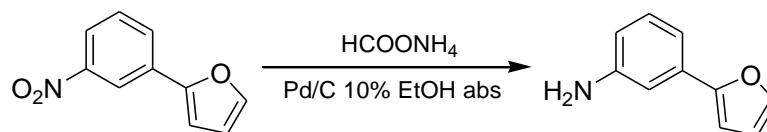


Metodo A

Ad una soluzione di 3-nitrofenilidrazina cloridrato (1.2 g, 6.3 mmoli) in furano (90 mL), è stato aggiunto $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.0 g, 18.9 mmoli). La miscela è stata quindi posta a riflusso per 2 ore (TLC: CE/EtOAc, 8/2).

Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: *n*-esano), ottenendo il **3-(furan-2'-il)nitrobenzene** (1.2 g, resa quantitativa), con p.f. 74 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.45 (t, *J*=1.9, 1 H, 2'-H); 8.18–8.10 (m, 2 H, 4'-H e 6'-H); 7.87 (dd, *J*=1.8, *J*=0.8, 1 H, 5-H), 7.73 (t, *J*=8.1, 1 H, 5'-H), 7.27 (dd, *J*=3.5, *J*=0.8, 1 H, 3-H): 6.68 (dd, *J*=3.5, *J*=1.8, 1 H, 4-H).

Sintesi di 3-(furan-2'-il)anilina**Metodo A**

Ad una soluzione di 3-(furan-2'-il)nitrobenzene (0.2 g, 1.0 mmoli) in EtOH assoluto (50 mL) è stato aggiunto ammonio formiato (0.3 g, 4.5 mmoli) e Pd/C 10% (50 mg). La miscela è stata quindi posta a riflusso sotto agitazione (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1).

Poiché non è stata rilevata la formazione di alcun prodotto di reazione, tale metodo è stato abbandonato.

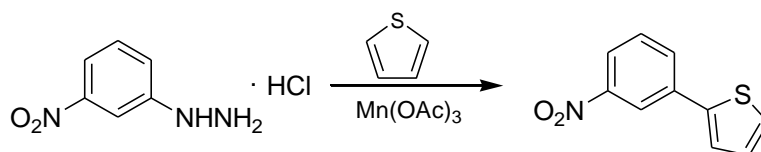
Metodo B

Ad una soluzione di 3-(furan-2'-il)nitrobenzene (0.2 g, 1.0 mmoli) in EtOH (8 mL) è stato aggiunto SnCl₂·2H₂O (0.8 g, 5.0 mmoli) e la miscela posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1).

Dopo raffreddamento tale miscela è stata concentrata a secchezza, il residuo ottenuto ripreso con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (100 mL) ed estratto con EtOAc (3 x 40 mL) La fase organica risultante è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza, portando all'ottenimento della **3-(furan-2'-il)anilina** (0.1 g, resa 61%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.68 (dd, J=1.7, J=0.7, 1 H, 5'-H); 7.04 (t, J=7.8, 1 H, 5-H); 6.90 (t, J=1.7, 1 H, 2-H), 6.86-6.82 (m, 1 H, 4-H o 6-H); 6.73 (dd, J=3.3, J=0.7, 1 H, 3'-H); 6.54 (dd, J=3.3, J=1.7, 1 H, 4'-H); 6.50-6.46 (m, 1 H, 4-H o 6-H); 5.16 (s all, 2 H, NH₂)

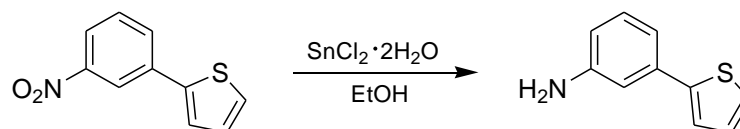
Sintesi di 3-(tien-2'-il)nitrobenzene



Ad una soluzione di 3-nitrofenilidrazina cloridrato (1.2 g, 6.3 mmoli) in tiofene (90 mL), è stato aggiunto $\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.0 g, 18.9 mmoli). La miscela è stata quindi posta a riflusso per 2 ore (TLC: CE/EtOAc, 8/2).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: *n*-esano), ottenendo il **3-(tien-2'-il)nitrobenzene** (0.7 g, resa 56%), con p.f. 80 °C.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 8.41 (t, $J=1.7$, 1 H, 2'-H); 8.17-8.10 (m, 2 H, 4'-H e 6'-H); 7.77 (dd, $J=3.7$, $J=1.1$, 1 H, 5-H); 7.75-7.68 (m, 2 H, 3-H e 5'-H); 7.21 (dd, $J=4.9$, $J=3.7$, 1 H, 4-H).

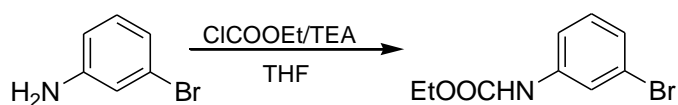
Sintesi di 3-(tien-2'-il)anilina

Ad una soluzione di 3-(tien-2'-il)nitrobenzene (0.2 g, 1.0 mmoli) in EtOH (8 mL) è stato aggiunto SnCl₂·2H₂O (0.8 g, 5.0 mmoli) e la miscela ottenuta posta a riflusso per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza, il residuo ottenuto ripreso con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (100 mL) ed estratto con EtOAc (3 x 40 mL). La fase organica risultante è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza, portando all'ottenimento della **3-(tien-2'-il)anilina** (0.1 g, resa 57%), con p.f. 43 °C.

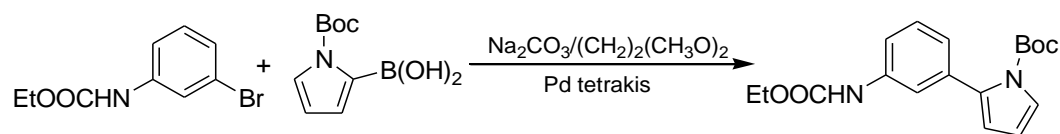
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.47 (dd, J=5.2, J=1.1, 1 H, 5'-H); 7.33 (dd, J=3.6, J=1.1, 1 H, 3'-H); 7.09 (dd, J=5.2, J=3.6, 1 H, 4'-H); 7.04 (t, J=7.6, 1 H, 5-H); 6.83 (t, J=2.0, 1 H, 2-H); 6.80 (dt, J=7.6, J=2.0, 1 H, 4-H o 6-H); 6.50 (dd, J=7.6, J=2.0, 1 H, 4-H o 6-H); 5.20 (s all, 2 H, NH₂).

Sintesi di etile 3-bromofenilcarbammato



Ad una soluzione di 3-bromoanilina (0.9 g, 5.0 mmoli) in THF (54 mL) e TEA (2.8 mL, 20.0 mmoli) è stato aggiunto, goccia a goccia, etile cloroformiato (1.9 mL, 20.0 mmoli). La miscela è stata quindi posta a riflusso, sotto agitazione, per un'ora (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione ed il filtrato concentrato a secchezza. Il residuo è stato quindi ripreso con H₂O (200 mL), ed estratto con EtOAc (3 x 70 mL). La fase organica ottenuta è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza, portando all'ottenimento dell'**etile 3-bromofenilcarbammato** (0.7 g, resa 84%), di consistenza oleosa.

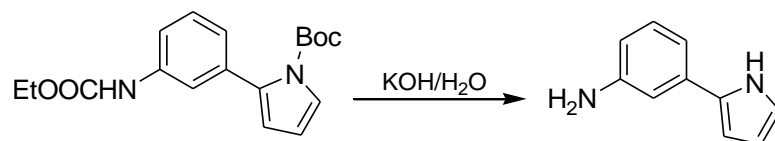
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.82 (s all, 1 H, NH); 7.74 (t, J=1.3, 1 H, 2-H); 7.41 (dt, J=8.1, J=1.3, 1 H, 4-H o 6-H); 7.23 (t, J=8.1, 1 H, 5-H); 7.16 (dt, J=8.1, J=1.3, 1 H, 4-H o 6-H), 4.13 (q, J=7.0, 2 H, COOCH₂CH₃) 1.24 (t, J=7.0, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di etile [3-(1'-terbutilossicarbonilpirrol-2'-il)fenil]carbammato

Ad una miscela di etile 3-bromofenilcarbammato (0.2 g, 0.8 mmoli) e acido *N*-Boc-2-pirrolilboronico (0.2 g, 1.0 mmoli) in etilenglicole dimetiletere (15 mL) sono stati aggiunti, nell'ordine, una soluzione di Na₂CO₃ (0.4 g, 3.6 mmoli) in H₂O (1 mL), e palladio tetrakis(trifenilfosfina) (50 mg). La miscela è stata quindi posta a riflusso, sotto agitazione, per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in H₂O (100 mL) ed estratta a fondo con CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza. Il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CHCl₃), ottenendo l'etile [3-(1'-terbutilossicarbonilpirrol-2'-il)fenil]carbammato (0.2 g, resa 64%) con p.f. 126 °C.

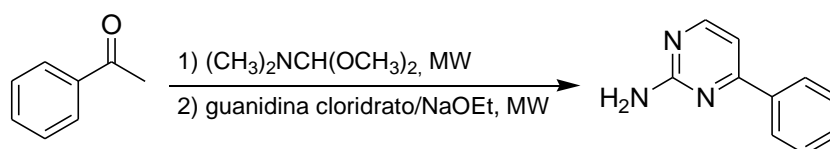
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.66 (s all, 1 H, NH); 7.44-7.40 (m, 2 H, 2-H e 4-H o 6-H); 7.33 (dd, J=3.6, J=1.7, 1 H, 3'-H o 5'-H); 7.26 (t, J=7.6, 1 H, 5-H); 6.93 (d, J=7.6, 1 H, 4-H o 6-H); 6.27 (dd, J=3.6, J=3.2, 1 H, 4'-H); 6.21 (dd, J=3.2, J=1.7, 1 H, 3'-H o 5'-H); 4.12 (q, J=7.3, 2 H, COOCH₂CH₃); 1.29 (s, 9 H, C(CH₃)₃); 1.24 (t, J=7.3, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di 3-(pirrol-2'-il)anilina



Una soluzione di etile [3-(1'-terbutilossicarbonilpirrol-2'-il)fenil]carbammato (0.1 g, 0.3 mmoli) in KOH 5% (100 mL) è stata posta a riflusso, sotto agitazione, per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata versata in H₂O (100 mL) ed estratta con EtOAc (3 x 50 mL), la fase organica risultante anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza, ottenendo la **3-(pirrol-2'-il)anilina** (0.1 g, resa quantitativa), con p.f. 89 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.08 (s all, 1 H, 1'-H); 6.98 (t, J=7.7, 1 H, 5-H); 6.82-6.74 (m, 3 H, 2-H e 4-H o 6-H e 3'-H o 5'-H); 6.38 (dt, J=7.7, J=1.5, 1 H, 4-H o 6-H); 6.33-6.29 (m, 1 H, 3'-H o 5'-H); 6.06 (dd, J=5.0, J=2.6, 1 H, 4'-H); 4.98 (s all, 2 H, NH₂).

Sintesi di 2-ammino-4-fenilpirimidina

Una soluzione di acetofenone (0.5 mL, 4.2 mmoli) in *N,N*-dimetilformammide dimetilacetale (0.7 mL, 5.8 mmoli) è stata irradiata con microonde a 250 W, raggiungendo la temperatura di 200 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 4 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1).

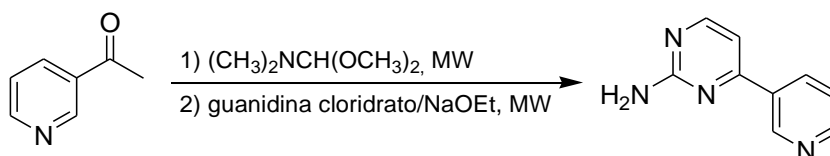
Parallelamente, ad una soluzione di guanidina cloridrato (0.5 g, 4.8 mmoli) in EtOH assoluto (3.6 mL) è stato aggiunto NaOEt 21% in EtOH (0.3 mL, 4.2 mmoli), e la miscela è stata posta in agitazione a temperatura ambiente per un'ora.

Le due miscele sono state quindi riunite e irradiate con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 170 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: EtOAc/MeOH 7/3).

Dopo raffreddamento, il precipitato formatosi è stato raccolto mediante filtrazione, portando all'ottenimento della **2-ammino-4-fenilpirimidina** (0.3 g, resa 41%), con p.f. 158 °C.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 8.31 (d, $J=5.2$, 1 H, 6-H); 8.10-8.03 (m, 2 H, 2'-H e 6'-H); 7.53-7.47 (m, 3 H, 3'-H e 4'-H e 5'-H); 7.13 (d, $J=5.2$, 1 H, 5-H); 6.67 (s all, 2 H, NH_2).

Sintesi di 2-ammino-4-(piridin-3'-il)pirimidina



Una soluzione di 3-acetilpiridina (0.4 mL, 4.1 mmoli) in *N,N*-dimetilformammide dimetilacetale (0.8 mL, 5.7 mmoli) è stata irradiata con microonde a 250 W, raggiungendo la temperatura di 200 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 4 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1).

Parallelamente, ad una soluzione di guanidina cloridrato (0.5 g, 4.8 mmoli) in EtOH assoluto (3.6 mL) è stato aggiunto NaOEt 21% in EtOH (0.3 mL, 4.8 mmoli), e la miscela è stata posta in agitazione a temperatura ambiente per un'ora.

Le due miscele sono state quindi riunite ed irradiate con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 150°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: EtOAc/MeOH, 7/3).

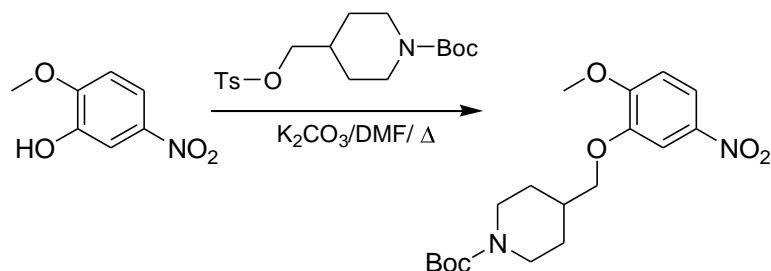
La miscela di reazione è stata quindi ripresa con H_2O (120 mL) ed estratta con EtOAc (4 x 30 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e concentrata a secchezza.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante cristallizzazione da EtOH, portando all'ottenimento della **2-ammino-4-(piridin-3'-il)pirimidina** (0.5 g, resa 75%), con p.f. 190 °C.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.23 (d, $J=1.4$, 1 H, 2'-H); 8.68 (dd, $J=4.5$, $J=1.4$, 1 H, 6'-H); 8.39 (dt, $J=8.2$, $J=1.4$, 1 H, 4'-H); 8.36 (d, $J=5.2$, 1 H, 6-H); 7.53 (dd, $J=8.2$, $J=4.5$, 1 H, 5'-H); 7.21 (d, $J=5.2$, 1 H, 5-H); 6.79 (s all, 2 H, NH_2)

7.3.2. SINTESI DI 4-METOSSI-3-IL-[(1'-METILPIPERIDIN-4'-IL)METOSSI]NITROBENZENE

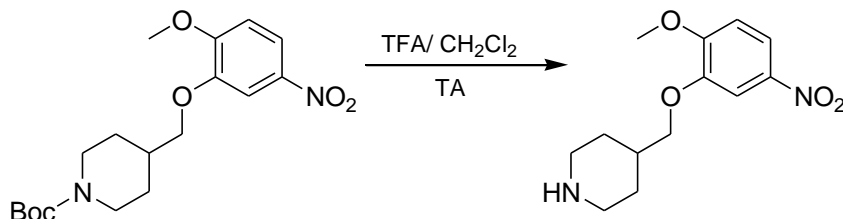
Sintesi di 4-metossi-3-[(1'-Boc-piperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene



Ad una soluzione di 3-idrossi-4-metossinitrobenzene (3.4 g, 20.0 mmol) in DMF anidra (40 mL) sono stati aggiunti 1-Boc-4-(tosilossimetil)piperidina (8.1 g, 22.0 mmol) e K_2CO_3 anidro (4.1 g, 30.0 mmol). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 8 ore (TLC: $CHCl_3/MeOH/HCOOH$, 9/1/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita in una soluzione acquosa datura di NH_4Cl (500 mL) ed estratta con CH_2Cl_2 (3 x 200 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza, ottenendo il **4-metossi-3-[(1'-Boc-piperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene** (6.8 g, resa 93%), con p.f. 119°C.

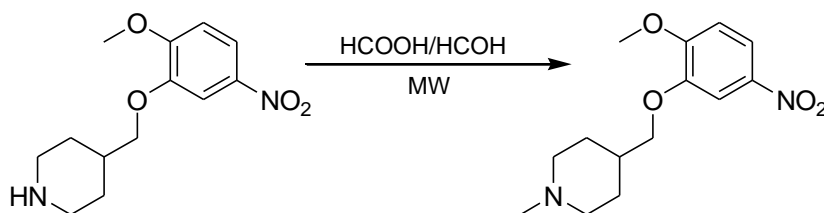
^1H-NMR ($CDCl_3-d$): 7.91 (dd, $J=8.9$, $J=2.6$, 1H, 6-H); 7.72 (d, $J=2.6$, 1H, 2-H); 6.90 (d, $J=8.9$, 1H, 5-H); 4.26-4.10 (m, 2H); 3.96 (s, 3H, OCH_3); 3.91 (d, $J=5.2$, 2H); 2.76 (2H, t, $J=12.5$); 2.15-1.99 (m, 1H); 1.87 (d, $J=12.5$, 2H); 1.47 (s, 9H, Boc); 1.28 (qd, $J=12.5$, $J=5.2$, 2H);

Sintesi di 4-metossi-3-[(1'-piperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene



Ad una soluzione di 4-metossi-3-[(1'-Boc-piperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene (6.6 g, 18.0 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) è stato aggiunto TFA (30.0 mL). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 8/2) e poi concentrata a secchezza. Il residuo solido ottenuto è stato ripreso con acqua (100 mL), neutralizzato con NaHCO₃ ed estratto con CH₂Cl₂ (3 x 200 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza e il residuo solido ottenuto è stato cristallizzato da ⁱPrOH, ottenendo il **4-metossi-3-[(1'-piperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene** (4.7 g, resa 98%), con p.f. 135°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.90 (dd, J=8.7, J=2.5, 1H, 6-H); 7.72 (d, J=2.5, 1H, 2-H); 6.90 (d, J=8.7, 1H, 5-H); 3.95 (s, 3H, OCH₃); 3.90 (d, J=6.5, 2H); 3.20-3.12 (m, 2H); 2.74-2.63 (m, 2H); 2.11-1.99 (m, 1H); 1.91-1.85 (m, 2H); 1.39-1.25 (m, 2H);

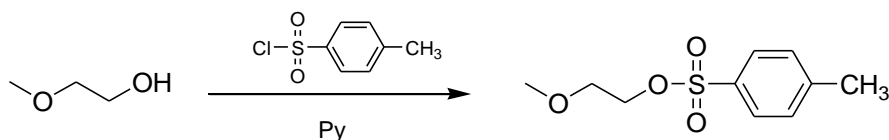
Sintesi di 4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene

Una soluzione di 4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene (4.5 g, 17.0 mmol) in acido formico (15.0 mL) e formaldeide acquosa al 37% (9.0 mL) è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 90 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH, 85/15). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita con acqua (150 mL), neutralizzata con NaHCO₃ ed estratta con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza ottenendo il **4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]nitrobenzene** (4.2 g, resa 89%), con p.f. 93°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.91 (dd, J=8.9, J=2.7, 1H, 6-H); 7.72 (d, J=2.7, 1H, 2-H); 6.90 (d, J=8.9, 1H, 5-H); 3.97-3.89 (m, 5H); 3.03 (d, J=11.8, 2H); 2.39 (s, 3H, NCH₃); 2.15 (t, J=11.8, 2H); 1.99-1.88 (m, 3H); 1.58 (qd, J=11.8, J=2.9, 2H).

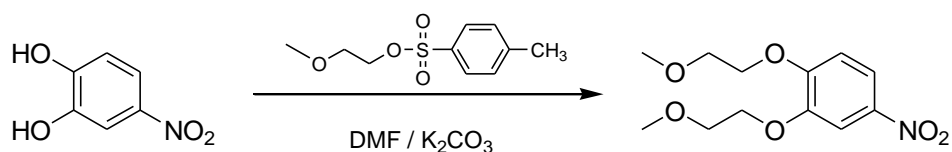
7.3.3. SINTESI DI 3,4-DI(2'-METOSSIETOSSI)NITROBENZENE

Sintesi di *O*-(2'-metossietil) tosilato



Una soluzione di 2-metossietanolo (9.4 mL, 120.0 mmoli) in piridina (10 mL) è stata aggiunta di tosil cloruro (19.0 g, 100.0 mmoli) e lasciata in agitazione a temperatura ambiente per un'ora e trenta minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 98/2). Al termine della reazione, la miscela è stata versata in HCl 1M (100 mL) ed estratta con EtOAc (3 x 200 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo l'*O*-(2'-metossietil) tosilato (15.0 g, resa 65%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.78 (d, J=8.2, 2 H, 2-H e 6-H); 7.32 (d, J=8.2, 2 H, 3-H e 5-H); 4.13 (t, J=4.6, 2 H, OCH₂CH₂OCH₃); 3.55 (t, J=4.6, 2 H, OCH₂CH₂OCH₃); 3.28 (s, 3 H, OCH₃); 2.42 (s, 3 H, CH₃).

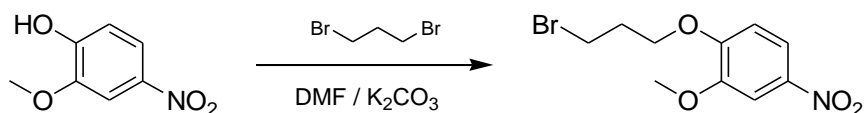
Sintesi di 3,4-di(2'-metossietossi)nitrobenzene

Ad una soluzione di 3,4-diidrossinitrobenzene (3.0 g, 19.3 mmoli) in DMF (39 mL) sono stati aggiunti K₂CO₃ (8.0 g, 58.0 mmoli) e *O*-(2'-metossietil) tosilato (9.8 g, 42.5 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso per 5 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita in H₂O (500 mL) e il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, portando all'ottenimento del **3,4-di(2'-metossietossi)nitrobenzene** (3.1 g, resa 60%), con p.f. 54 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.89 (dd, J=8.8, J=2.5, 1 H, 6-H); 7.78 (d, J=2.5, 1 H, 2-H); 6.94 (d, J=8.8, 1 H, 5-H); 4.29-4.19 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂OCH₃); 3.87-3.77 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂OCH₃); 3.46 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

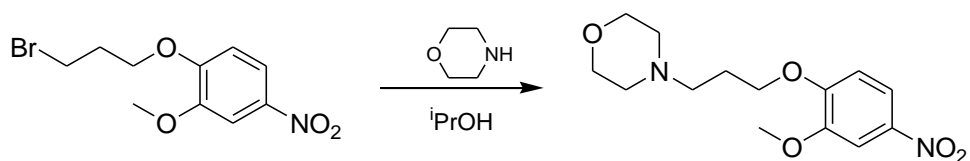
7.3.4. SINTESI DI 3-METOSSI-4-(3'-N-MORFOLINO)PROPOSSINITROBENZENE

Sintesi di 3-metossi-4-(3'-bromopropossi)nitrobenzene



Ad una soluzione di 4-idrossi-3-metossinitrobenzene (1.6 g, 10.0 mmoli) in DMF (12 mL) sono stati aggiunti K₂CO₃ (2.7 g, 20.0 mmoli) e 1,3-dibromopropano (2.0 mL, 20.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita in H₂O (250 mL) ed estratta con CHCl₃ (3 x 80 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza. Il residuo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente CHCl₃) ottenendo il **3-metossi-4-(3'-bromopropossi)nitrobenzene** (1.2 g, resa 61%), con p.f. 128 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.90 (dd, J=8.9, J=2.6, 1 H, 6-H); 7.74 (d, J=2.6, 1 H, 2-H); 6.96 (d, J=8.9, 1 H, 6-H); 4.29 (t, J=5.2, 2 H, BrCH₂CH₂CH₂O); 4.02-3.94 (m, 2 H, BrCH₂CH₂CH₂O); 3.92 (s, 3 H, OCH₃); 2.49 (m, 2 H, BrCH₂CH₂CH₂O).

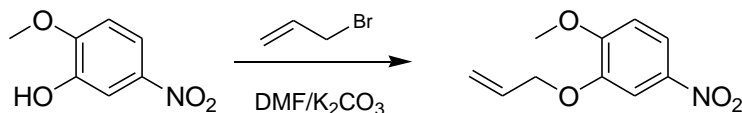
Sintesi di 3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossinitrobenzene

Ad una soluzione di 3-metossi-4-(3'-bromopropossi)nitrobenzene (2.0 g, 7.2 mmoli) in ⁱPrOH (20 mL) è stata aggiunta morfolina (1.2 mL, 14.4 mmoli). La soluzione ottenuta è stata irradiata con microonde a 100 W, raggiungendo la temperatura di 80°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH, 95/5). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita in H₂O (150 mL) ed estratta con CHCl₃ (3 x 200 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo il **3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossinitrobenzene** (4.9 g, resa 98%), con p.f. 106 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.89 (dd, J=9.0, J=2.0, 1 H, 6-H); 7.73 (d, J=2.6, 1 H, 2-H); 7.18 (d, J=9.0, 1 H, 5-H); 4.15 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.88 (s, 3 H, OCH₃); 3.59-3.54 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.41 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 2.38-2.33 (m, 4 H, CH₂NCH₂); 1.92 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

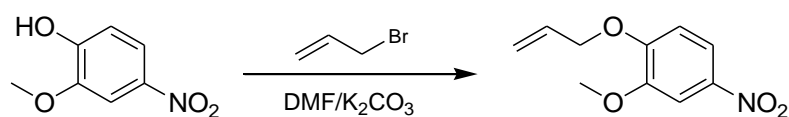
7.3.5. SINTESI DI DERIVATI ALLILOSSIMETOSSINITROBENZENICI

Sintesi di 3-allilossi-4-metossinitrobenzene



Ad una soluzione di 3-idrossi-4-metossinitrobenzene (3.4 g, 20.0 mmoli) in DMF (20 mL) sono stati aggiunti K₂CO₃ (6.1 g, 44.0 mmoli) e allile bromuro (1.9 mL, 22.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 16 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita con H₂O (200 mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, ottenendo il **3-allilossi-4-metossinitrobenzene** (4.2 g, resa quantitativa), con p.f. 85°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.92 (dd, J=9.2, J=2.6, 1 H, 6-H); 7.76 (d, J=2.6, 1 H, 2-H); 7.20 (d, J=9.2, 1 H, 5-H); 6.12-5.99 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.46-5.27 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.72-4.69 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.92 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 3-metossi-4-allilossinitrobenzene

Ad una soluzione di 4-idrossi-3-metossinitrobenzene (3.4 g, 20.0 mmoli) in DMF (20 mL) sono stati aggiunti K₂CO₃ (6.1 g, 44.0 mmoli) e allile bromuro (1.9 mL, 22.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita con H₂O (200 mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, ottenendo il **3-metossi-4-allilossinitrobenzene** (4.2 g, resa quantitativa), con p.f. 88°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.89 (dd, J=8.9, J=2,7, 1 H, 6-H); 7.76 (d, J=2.7, 1 H, 2-H); 6.91 (d, J=8.9, 1 H, 5-H); 6.14-6.01 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.48-5.34 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.73-4.70 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.96 (s, 3 H, OCH₃).

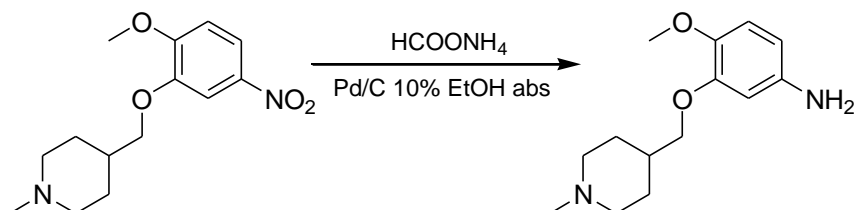
7.3.6. SINTESI DEI PRECURSORI ANILINICI DI NUCLEI CHINAZOLINICI

Metodica generale A

Una sospensione di nitroderivato (19.3 mmoli) e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (96.5 mmoli) in EtOH assoluto (200 mL) è stata posta a riflusso per 6 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido ripreso con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (250 mL). La soluzione è stata estratta con EtOAc (3 x 100 mL), la fase organica anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e concentrata a secchezza, ottenendo il derivato anilिनico desiderato.

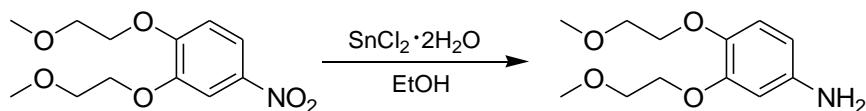
Metodica generale B

Ad una soluzione di nitroderivato (16.7 mmoli) in EtOH assoluto (150 mL), sono stati aggiunti nell'ordine Pd/C 10% (50 mg) e ammonio formiato (66.8 mmoli). La miscela è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8/2). Dopo raffreddamento, il catalizzatore è stato allontanato per filtrazione ed il filtrato concentrato a secchezza, ottenendo il derivato anilिनico desiderato.

Sintesi di 4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]anilina

Con la metodica generale B, a partire da 4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]-nitrobenzene è stata ottenuta la di **4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]anilina** (resa 98%), con p.f. 42 °C.

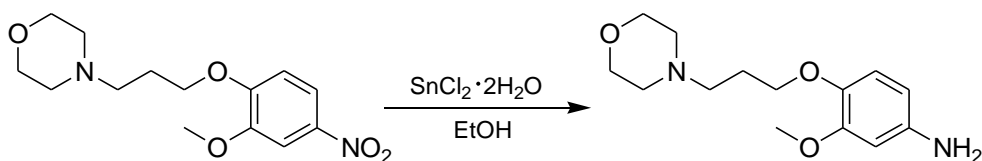
¹H-NMR (CDCl₃-d): 6.71 (d, J=8.2, 1 H, 5-H); 6.30-6.24 (m, 2-H e 6-H); 5.30 (s all, 2 H, NH₂); 3.92-3.83 (m, 2 H); 3.76 (s, 3 H, OCH₃); 3.61-3.51 (m, 2 H); 2.75 (s, 3 H, NCH₃); 2.70-2.55 (m, 2 H); 2.18-2.01 (m, 3 H); 1.97-1.80 (m, 2 H).

Sintesi di 3,4-di(2'-metossietossi)anilina

Con la metodica generale A, a partire da 3,4-di(2'-metossietossi)è stata ottenuta la **3,4-di(2'-metossietossi)anilina** (2.3 g, resa 93%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-d₆): 6.64 (d, J=8.3, 1 H, 5-H); 6.24 (d, J=2.3, 1 H, 2-H); 6.00 (dd, J=8.3, J=2.3, 1 H, 6-H); 4.68 (s, 2 H, NH₂); 3.99-3.95 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂OCH₃); 3.65-3.60 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂OCH₃); 3.30 (s, 3 H, OCH₃); 3.28 (s, 3 H, OCH₃).

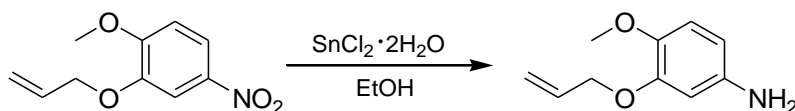
Sintesi di 3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossianilina



Con la metodica generale A, a partire da 3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossinitrobenzene è stata ottenuta la **3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossianilina** (0.8 g, resa 56%), con p.f. 75 °C.

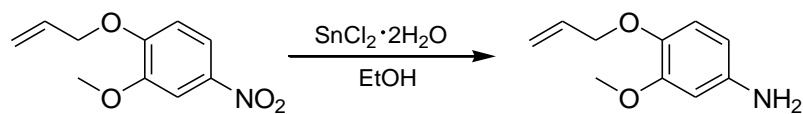
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 6.62 (d, J=8.5, 1 H, 5-H); 6.24 (d, J=2.5, 1 H, 2-H); 6.03 (dd, J=8.5, J=2.5, 1 H, 6-H); 3.80 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.66 (s, 3 H, OCH₃); 3.58-3.53 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.42-2.31 (m, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O e CH₂NCH₂); 1.76 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

Sintesi di 3-allilossi-4-metossianilina



Con la metodica generale A, a partire da 3-allilossi-4-metossinitrobenzene è stata ottenuta la **3-allilossi-4-metossianilina** (3.1 g, resa 88%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 6.80-6.76 (m, 1 H, 6-H); 6.68-6.57 (m, 2 H, 2-H e 5-H); 6.13-5.99 (m, 1 H CH₂=CHCH₂); 5.44-5.25 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.59-4.56 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.83 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 3-metossi-4-allilossianilina

Con la metodica generale A, a partire da 3-metossi-4-nitroallilossianilina è stata ottenuta la **3-metossi-4-allilossianilina** (3.0 g, resa 82%), di consistenza oleosa.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 - d) 6.79 (d, $J=8.4$, 1 H, 2-H); 6.63-6.57 (m, 2 H, 5-H, 6-H); 6.12-5.99 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$); 5.42-5.24 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$); 4.57-4.54 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$); 3.86 (s, 3 H, OCH_3).

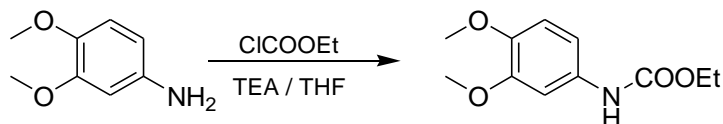
7.3.7. SINTESI DI ETIL CARBAMMATI DI DERIVATI ANILINICI

Metodica generale

Ad una soluzione di derivato anilिनico (13.0 mmoli) in THF anidro (150 mL) e TEA (26.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (26.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 99/1).

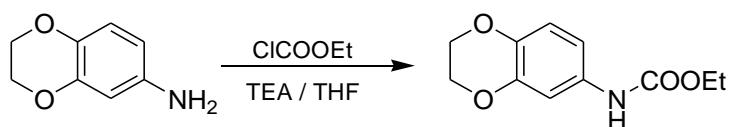
Il cloridrato di TEA formatosi è stato allontanato per filtrazione ed il filtrato concentrato a secchezza, ottenendo l'etil carbammato desiderato.

Sintesi di etile (3,4-dimetossifenil)carbammato



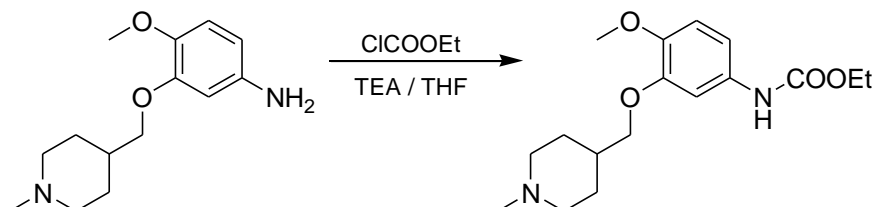
Con la metodica generale, a partire dalla 3,4-dimetossianilina è stato ottenuto l'**etile (3,4-dimetossifenil)carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 45 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.38 (s all, 1 H, NH); 7.15 (s, 1 H, 2-H); 6.92 (d, J=8.6, 5-H o 6-H); 6.84 (d, J=8.6, 5-H o 6-H); 4.09 (q, J=7.0, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.69 (s, 6 H, 2 x OCH₃); 1.22 (t, J=7.0, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di etile (2,3-diidro-1,4-benzodiossin-6-il)carbammato

Con la metodica generale, a partire dalla 6-ammino-2,3-diidro-1,4-benzodiossina è stato ottenuto l'etile (2,3-diidro-1,4-benzodiossin-6-il)carbammato (resa quantitativa), con p.f. 117 °C.

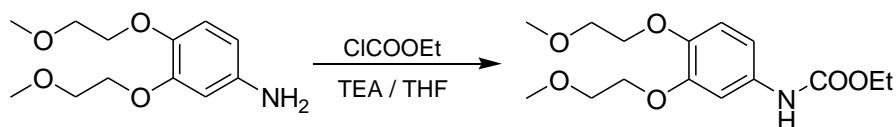
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.38 (s all, 1 H, NH); 7.03 (d, J=2.1, 1 H, 5-H); 6.85 (dd, J=8.7, J=2.1, 1 H, 7-H); 6.74 (d, J=8.7, 1 H, 8-H); 4.22-4.14 (m, 4 H, OCH₂CH₂O); 4.08 (q, J=7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 1.21 (t, J=7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di etile {4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]fenil}carbammato

Con la metodica generale, a partire dalla 4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]anilina è stato ottenuto l'etile {4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]fenil}carbammato (resa quantitativa), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 7.16 (d, J=2.4, 1 H, 2-H); 6.78 (d, J=8.7, 1 H, 5 -H); 6.72 (dd, J=8.7, J=2.4 1 H, 6-H); 4.19 (q, J= 7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.86-3.77 (m, 5 H); 2.91 (d, J=11.4, 2 H); 2.30 (s, 3H, NCH₃); 2.05-1.94 (m, 2 H); 1.93-1.83 (m, 3 H); 1.41 (qd, J=11.4, J=2.6, 2H); 1.28 (t, J=7.1, 3 H, CO₂CH₂CH₃).

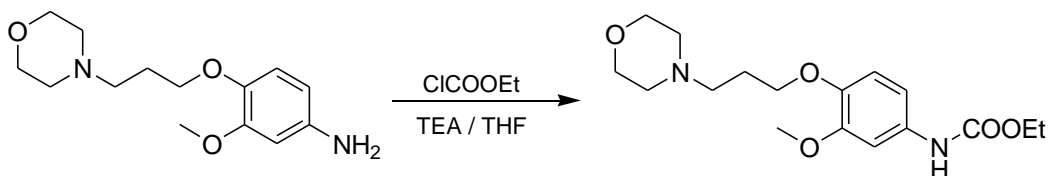
Sintesi di etile [3,4-di(2'-metossietossi)fenil]carbammato



Con la metodica generale, a partire dalla 3,4-di(2'-metossietossi)anilina è stato ottenuto l'etile **[3,4-di(2'-metossietossi)fenil]carbammato** (resa quantitativa), di consistenza oleosa.

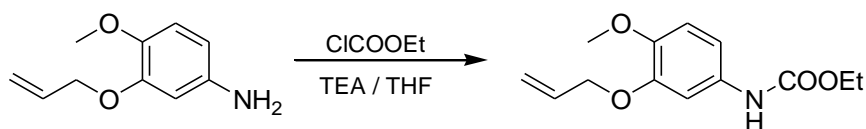
¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.17 (s, 1 H, 2-H); 6.80 (d, J=8.6, 1 H, 5-H o 6-H); 6.70 (d, J=8.6, 1 H, 5-H o 6-H); 6.40 (s all, 1 H, NH); 4.26-4.09 (m, 6 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O e COOCH₂CH₃); 3.77-3.71 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.43 (s, 6 H, 2 x OCH₃); 1.29 (t, J=7.1, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di etile [3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossifenil]carbammato



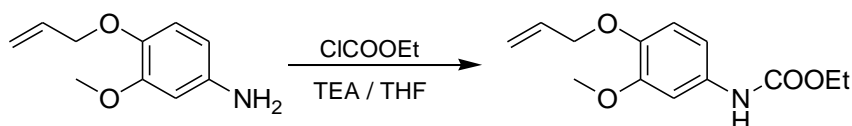
Con la metodica generale, a partire dalla 3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossianilina è stato ottenuto l'etile **[3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossifenil]carbammato** (resa quantitativa), con p.f. 81 °C.

¹H-NMR (DMSO-d₆): 9.39 (s, 1 H, all NH); 7.16 (d, J=1.8, 1 H, 2-H); 6.90 (dd, J=8.7, J=1.8, 1 H, 6-H); 6.84 (d, J=8.7, 1 H, 5-H); 4.09 (q, J=7.1, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.91 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.70 (s, 3 H, OCH₃); 3.59-3.53 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.43-2.31 (m, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O e CH₂NCH₂); 1.82 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 1.23 (t, J=7.1, 3 H, CO₂CH₂CH₃).

Sintesi di etile (3-allilossi-4-metossifenil)carbammato

Con la metodica generale, a partire dalla 3-allilossi-4-metossianilina è stato ottenuto l'etile (3-allilossi-4-metossifenil)carbammato (resa quantitativa), con p.f. 84°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.19-7.18 (m, 1 H, 6-H); 6.79-6.78 (m, 1 H, 5-H); 6.77 (d, J=2.0, 1 H, 2-H); 6.47 (s all, 1 H, NH); 6.15-6.01 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.45-5.26 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.62-4.59 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.20 (q, J=6.9, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.84 (s, 3 H, OCH₃); 1.30 (t, J=6.9, 3 H, COOCH₂CH₃).

Sintesi di etile (3-metossi-4-allilossifenil)carbammato

Con la metodica generale, a partire dalla 3-metossi-4-allilossianilina è stato ottenuto l'etile(3-metossi-4-allilossifenil)carbammato (resa quantitativa), con p.f. 84°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.21-7.18 (m, 1 H, 2-H); 6.80 (d, J=8.6, 1 H, 5-H); 6.70 (dd, J=8.6, J=2.6, 1 H, 6-H); 6.47 (s all, 1 H, NH); 6.13-6.00 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.42-5.24 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.58-4.55 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.21 (q, J=7.2, 2 H, COOCH₂CH₃); 3.87 (s, 3 H, OCH₃); 1.30 (t, J=7.2, 3 H, COOCH₂CH₃).

7.3.8. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINICI

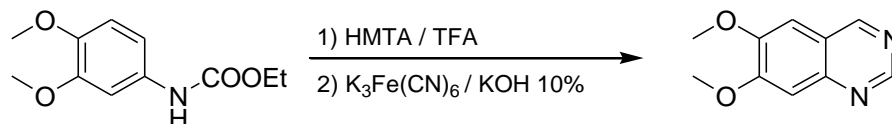
Metodica generale

Una soluzione di carbammato (1.0 mmoli) e urotropina (1.0 mmoli) in TFA (3 mL) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di KOH 10% in EtOH/H₂O 1:1 (30 mL). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto K₃Fe(CN)₆ (4.6 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

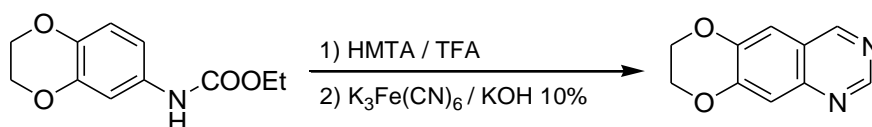
La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in H₂O (500 mL) ed estratta con CHCl₃ (3 x 200 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la chinazolina desiderata.

Sintesi di 6,7-dimetossichinazolina



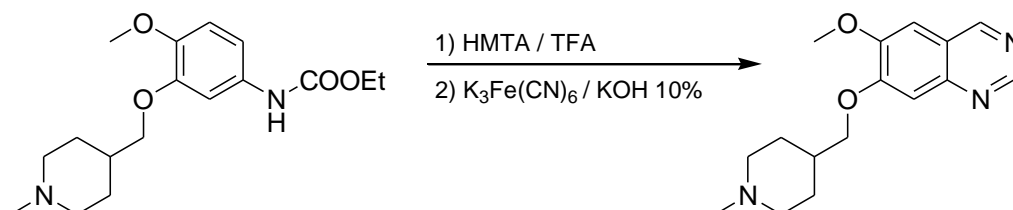
Con la metodica generale, a partire dall'etile (3,4-dimetossifenil)carbammato è stata ottenuta la **6,7-dimetossichinazolina** (resa quantitativa), con p.f. 138 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.28 (s, 1 H, 4-H); 9.06 (s, 1 H, 2-H); 7.48 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 3.98 (s, 3 H, OCH₃) 3.94 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina

Con la metodica generale, a partire dall'etile (2,3-diidro-1,4-benzodiossin-6-il)carbammato è stata ottenuta la **7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina** (resa 72%), con p.f. 109 °C.

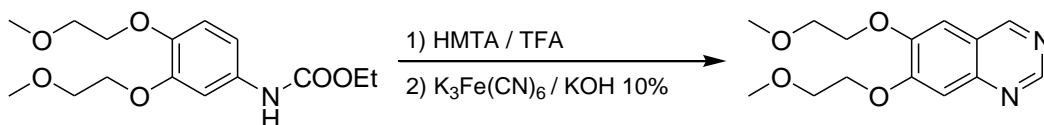
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.30 (s, 1 H, 4-H); 9.03 (s, 1 H, 2-H); 7.55 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.36 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.47-4.38 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina

Con la metodica generale, a partire dall'etile {4-metossi-3-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]-fenil}carbammato è stata ottenuta la **6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina** (resa 90%), con p.f.120°C.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.14 (s, 1 H, 4-H); 9.13 (s, 1 H, 2-H); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.09 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.06 (d, J=6.2, 2H); 4.01 (s, 3 H, OCH₃); 3.04 (d, J=11.2, 2H); 2.39 (s, 3 H, NCH₃); 2.16 (t, J=11.2, 2H); 2.04-1.91 (m, 3 H); 1.62 (d, qd, J=11.2, J=3.0, 2H).

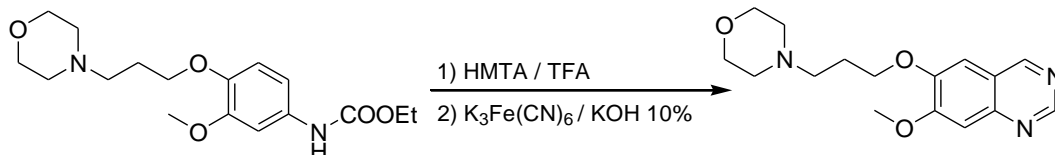
Sintesi di 5,6-di(2'-metossietossi)chinazolina



Con la metodica generale, a partire dall'etile [3,4-di(2'-metossietossi)fenil]carbammato è stata ottenuta la **5,6-di(2'-metossietossi)-chinazolina** (resa 93%), con p.f. 140 °C.

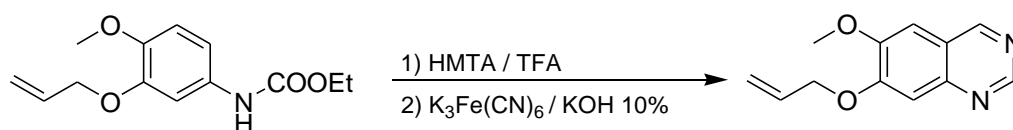
¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.14 (s, 2 H, 2-H e 4-H); 7.03 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.13 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.38-4.31 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.90-3.86 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.49 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

Sintesi di 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina



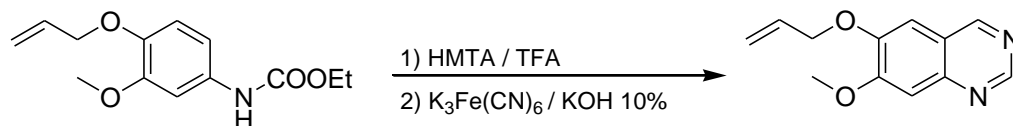
Con la metodica generale, a partire dall'etile [3-metossi-4-(3'-N-morfolino)propossifenil]carbammato è stata ottenuta la **7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina** (resa quantitativa), con p.f. 116 °C.

¹H-NMR (DMSO-d₆): 9.29 (s, 1 H, 4-H); 9.06 (s, 1 H, 2-H); 7.49 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.18 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.99 (s, 3 H, OCH₃); 3.60-3.55 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.46 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 2.41-2.35 (m, 4 H, CH₂NCH₂); 1.98 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

Sintesi di 6-metossi-7-allilossichinazolina

Con la metodica generale a partire dall' etile (3-allilossi-4-metossifenil)carbammato è stata ottenuta la **6-metossi-7-allilossichinazolina** (resa 40%), con p.f. 84°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.20 (s, 1 H, 4-H); 9.14 (s, 1 H, 2-H); 7.40 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.20-6.07 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.57-5.39 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.83-4.81 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.05 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 6-allilossi-7-metossichinazolina

Con la metodica generale, a partire dall'etile (3-allilossi-4-metossifenil)carbammato è stata ottenuta la **6-allilossi-7-metossichinazolina** (resa 12%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 9.23 (s, 1 H, 4-H); 9.16 (s, 1 H, 2-H); 7.48 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.19 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.21-6.08 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.56- 5.39 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.80-4.77 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂), 4.10 (s, 3 H, OCH₃).

7.3.9. SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINONICI

Metodica generale A

Ad una soluzione di chinazolina (1.0 mmoli) in AcOH (0.4 mL) è stata aggiunta, a temperatura ambiente, molto lentamente e sotto agitazione, una soluzione di CAN (4.0 mmoli) in H₂O (5 mL).

Al termine dell'aggiunta (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con AcOH, portando all'ottenimento del derivato chinazolinonico desiderato.

Metodica generale B

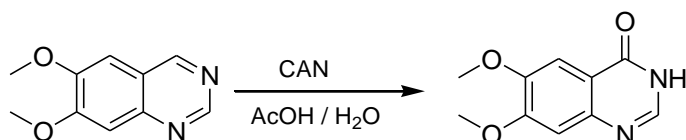
Ad una soluzione di chinazolina (1.0 mmoli) in AcOH (0.4 mL) è stata aggiunta, a temperatura ambiente, molto lentamente e sotto agitazione, una soluzione di CAN (4.0 mmoli) in H₂O (5 mL), (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). Al termine della reazione, la miscela è stata neutralizzata con una soluzione di KOH 5% e concentrata a secchezza. Il residuo ottenuto è stato adsorbito Na₂SO₄ ed estratto con *Soxhlet* per 24 ore (solvente di estrazione: acetone). Il solvente di estrazione è stato concentrato a secchezza, portando all'ottenimento del derivato chinazolinonico desiderato.

Metodica generale C

Una soluzione di chinazolina (1.6 mmoli) in HNO₃ 20% (0.7 mL) è stata posta a riflusso per 8 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 8/2). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata diluita in THF (250 mL) e il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con THF, portando all'ottenimento del derivato chinazolinonico desiderato, in forma di nitrato.

Metodica generale D

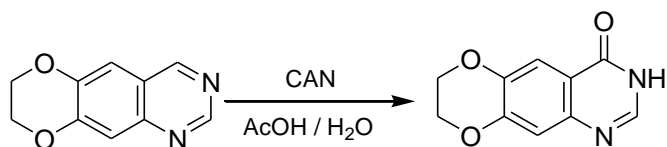
Ad una soluzione chinazolina (2.3 mmoli) in AcOH (1 mL) è stata aggiunta, a temperatura ambiente, molto lentamente e sotto agitazione, una soluzione di CrO₃ (1.4 g, 6.0 mmoli) in H₂O (3 mL) (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1). La miscela di reazione è stata cautamente neutralizzata con NH₄OH, mantenendo la temperatura della soluzione al di sotto di 10 °C. Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con acqua, ottenendo il derivato chinazolinonico desiderato.

Sintesi di 6,7-dimetossichinazolin-4(3H)-one

Con la metodica generale A, a partire 6,7-dimetossichinazolina, è stato ottenuto il **6,7-dimetossichinazolin-4(3H)-one** (resa quantitativa), con p.f. 284 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.15 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.13 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 3.90 (s, 3 H, OCH₃); 3.87 (s, 3 H, OCH₃).

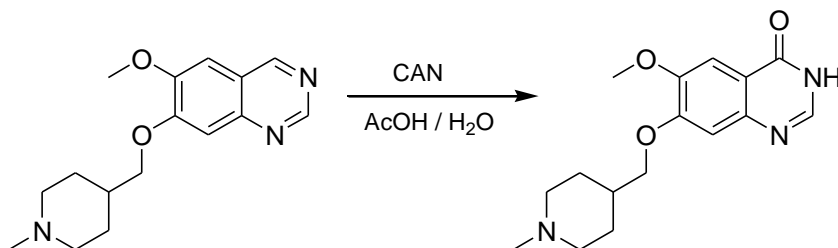
Sintesi di 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4(3H)-one



Con la metodica generale A, a partire dalla 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina è stato ottenuto il **7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4(3H)-one** (resa 81%), con p.f. 282 °C.

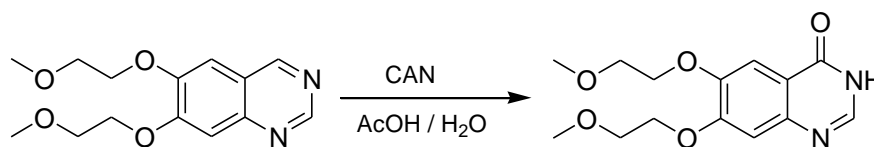
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 12.01 (s all, 1 H, NH); 7.92 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.08 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.39-4.30 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolin-4-(3H)-one



Con la metodica generale B, a partire dalla 6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina è stato ottenuto il **6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolin-4-(3H)-one** (resa 90%), con p.f. >300 °C.

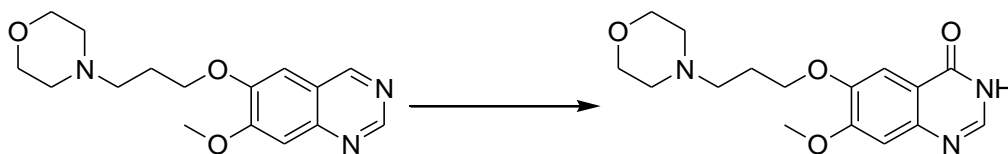
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.99 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.13 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.00 (d, J=6.2, 2 H); 3.90 (s, 3 H, OCH₃); 2.80 (d, J=11.2, 2H); 2.20 (s, 3 H, NCH₃); 1.90 (t, J=11.2, 2 H); 1.85-1.70 (m, 3 H); 1.45-1.30 (m, 2 H).

Sintesi di 6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4(3H)-one

Con la metodica generale A, a partire dalla 5,6-di(2'-metossietossi)chinazolina è stato ottenuto il **6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4(3H)-one** (resa 65%), con p.f. 201 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.15 (s, 1 H, 2-H); 7.47 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.28-4.18 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.75-3.68 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.33 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

Sintesi di 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-(3H)-one

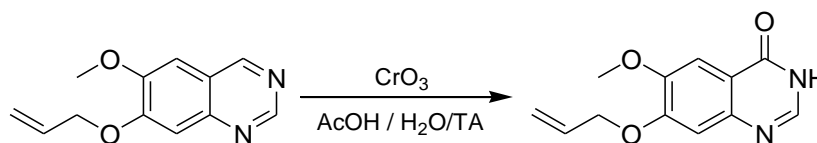


Con la metodica generale B, a partire dalla 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina è stato ottenuto il **7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-(3H)-one** (0.2 g, resa 43%), con p.f. 233 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.97 (s, 1 H, 2-H); 7.42 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.09 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.89 (s, 3 H, CH₃O); 3.60-3.55 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.60-2.20 (m, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O e CH₂NCH₂); 1.91 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

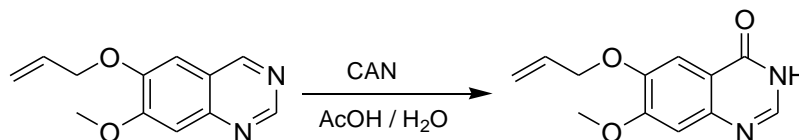
Con la metodica generale C, a partire dalla 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina è stato ottenuto il **7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-(3H)-one nitrato** (0.6 g, resa 65%), con p.f. >300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.02 (s, 1 H, 2-H); 7.48 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.16 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.21-4.14 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.91 (s, 3 H, CH₃O); 3.71-3.62 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 3.37-3.26 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.19-3.01 (m, 4 H, CH₂NCH₂); 2.23-2.09 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

Sintesi di 6-metossi-7-allilossichinazolin-4(3H)-one

Con la metodica generale D, a partire dalla 6-metossi-7-allilossichinazolin-4(3H)-one è stato ottenuto il **6-metossi-7-allilossichinazolin-4(3H)-one** (resa 43%), con p.f. 230°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.98 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.14 (s, 1 H, 5 H o 8 H); 6.15-6.02 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.48-5.28 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.73-4.71 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.88 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 6-allilossi-7-metossichinazolin-4(3H)-one

Con la metodica generale A, a partire dalla 6-allilossi-7-metossichinazolin-4(3H)-one è stato ottenuto il **6-allilossi-7-metossichinazolin-4(3H)-one** (resa 69%), con p.f. 254 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.10 (s, 1 H, 2-H); 7.46 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.14 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6,14.6.01 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.46-5.27 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.70-4.67 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.91 (s, 3 H, OCH₃).

7.3.10. SINTESI DI DERIVATI CLOROCHINAZOLINICI

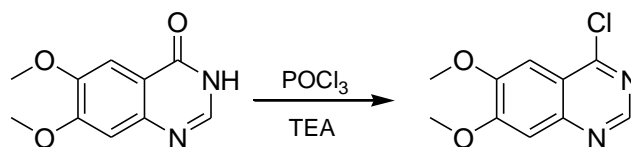
Metodica generale A

Ad una sospensione di chinazolinone (1.2 mmoli) in POCl_3 (26.2 mmoli) è stata aggiunta TEA (1.2 mL). La miscela è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1).

Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza, il residuo ottenuto ripreso con EtOAc (50 mL) e lavato con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (100 mL). La fase organica risultante è stata anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e concentrata a secchezza, ottenendo la clorochinazolina desiderata.

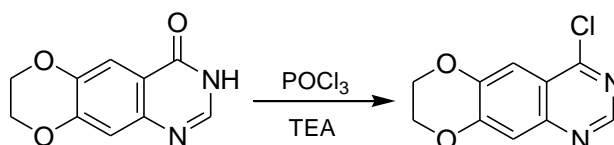
Metodica generale B

Ad una sospensione di chinazolinone (0.2 mmoli) in CH_2Cl_2 sono stati aggiunti CCl_4 (0.2 mL) e Ph_3P (0.7 mmoli). La miscela è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1). Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata a secchezza ed il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (eluente: CE/EtOAc 50:50), ottenendo la clorochinazolina desiderata.

Sintesi di 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina

Con la metodica generale A, a partire dal 6,7-dimetossichinazolin-4(3H)-one è stata ottenuta la **4-cloro-6,7-dimetossichinazolina** (resa quantitativa), con p.f. 183 °C.

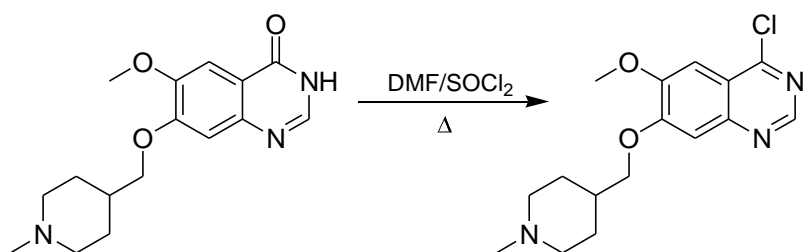
¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.90 (s, 1 H, 2-H); 7.47 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.41 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.09 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

Sintesi di 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina

Con la metodica generale A, a partire dal 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4(3H)-one è stata ottenuta la **4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina** (resa 86%), con p.f. 216 °C.

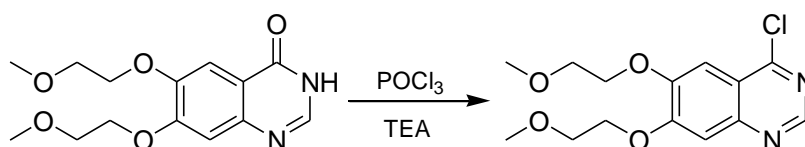
¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 7.66 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.50 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.47-4.39 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

Sintesi di 4-cloro-6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina



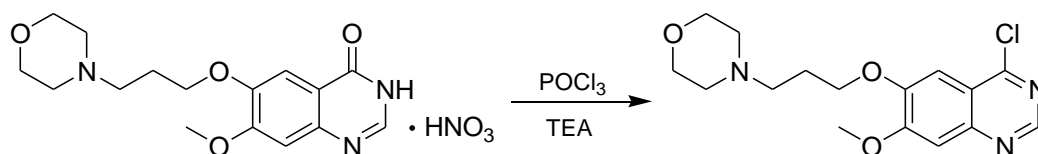
Ad una soluzione 6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina in DMF (5.0 mL) è stato aggiunto cloruro di tionile (50.0 μL). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 1 ora. Dopo raffreddamento il residuo ottenuto è stato triturato in dietil etere (10.0 mL), filtrato e concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato sciolto in etile acetato (50.0 mL) e lavato con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (2 x 20 mL). La fase organica risultante è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]-chinazolina** (resa quantitativa), con p.f.>300°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.90 (s, 1 H, 2-H); 7.46 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.41 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.12 (d, J=6.2, 2 H); 4.02 (s, 3 H, OCH₃); 2.85 (d, J=11.2, 2H,); 2.25 (s, 3 H, NCH₃); 2.00 (t, J=11.2, 2H); 1.90-1.75 (m, 3H); 1.50-1.30 (m, 2 H).

Sintesi di 4-cloro-6,7-di(2'-metossietossi)chinazolina

Con la metodica generale A, a partire dal 6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4(3H)-one è stata ottenuta la **4-cloro-6,7-di(2'-metossietossi)chinazolina** (resa quantitativa), con p.f. 140 °C.

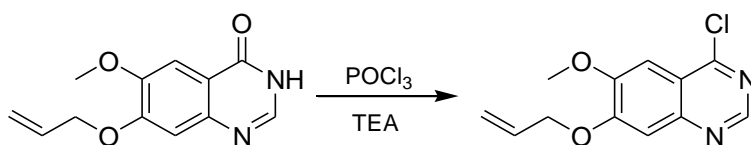
¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 7.43 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.30 (t, J=4.7, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.88 (t, J=4.7, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.50 (s, 3 H, OCH₃); 3.48 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 4-cloro-7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina

Con la metodica generale A, a partire dal 7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4(3H)-one nitrato è stata ottenuta la **4-cloro-7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina** (resa quantitativa), con p.f. 180 °C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 7.39 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.33 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.28 (t, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 4.05 (s, 3 H, OCH₃); 3.80-3.68 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.60 (t, J=6.8, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O); 2.55-2.46 (m, 4H, CH₂NCH₂); 2.14 (quint, J=6.8, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

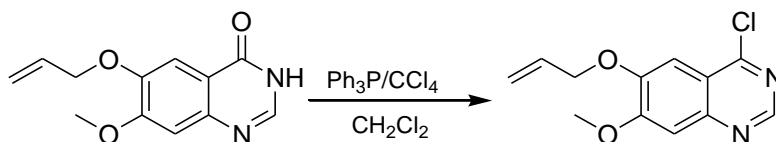
Sintesi di 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina



Con la metodica generale A, a partire dalla 6-metossi-7-allilossichinazolin-4(3H)-one è stata ottenuta la **4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina** (resa 93%), con p.f. 117°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d) 8.87 (s, 1 H, 2-H); 7.41 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.34 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.20-6.06 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.58-5.37 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.82-4.79 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.07 (s, 3 H, OCH₃).

Sintesi di 4-cloro-6-allilossi-7-metossichinazolina



Con la metodica generale B, a partire da 6-allilossi-7-metossichinazolin-4(3H)-one è stata ottenuta la **4-cloro-6-allilossi-7-metossichinazolina** (resa 24%), con p.f. 110°C.

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.88 (s, 1 H, 2-H); 7.43 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.43 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.21-6.08 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.58-5.40 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.81-4.79 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.08 (s, 3 H, OCH₃).

7.3.11. SINTESI DI DERIVATI ARILAMMINOCHINAZOLINICI

Metodica generale A

Una soluzione di clorochinazolina (0.4 mmoli) in ⁱPrOH (3 mL) è stata addizionata dell'opportuno sintone amminobiarilico (0.4 mmoli) ed irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

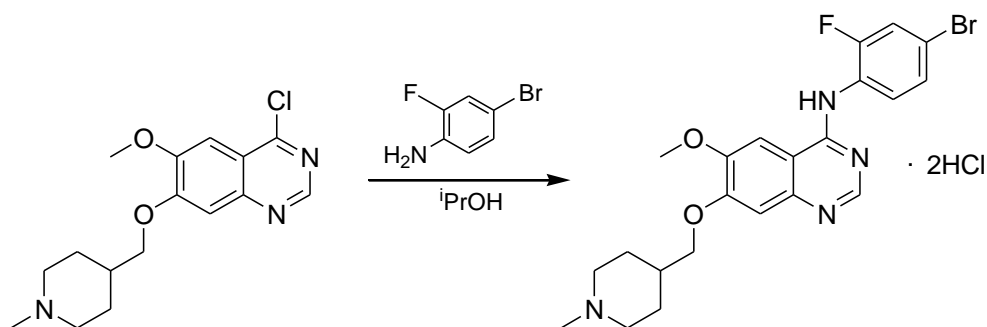
Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con ⁱPrOH, portando all'ottenimento del derivato arilamminochinazolinico desiderato, in forma di cloridrato.

Metodica generale B

Ad una soluzione dell'opportuno derivato amminobiarilico (0.5 mmoli) in THF anidro (3 mL) è stato aggiunto NaH (2.2 mmoli), e la miscela risultante è stata posta in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Tale miscela è stata quindi addizionata della clorochinazolina (0.4 mmoli) ed irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: CHCl₃/MeOH, 9/1).

La miscela di reazione è stata quindi versata in H₂O (50 mL), ed estratta con EtOAc (3 x 50 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata e concentrata a secchezza. Il residuo ottenuto è stato quindi purificato con la metodica di volta in volta indicata, portando all'ottenimento del prodotto di condensazione desiderato.

Sintesi di Vandetanib

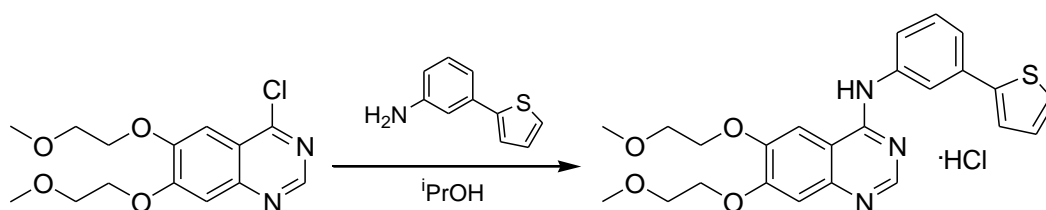


Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolina è stata ottenuta la **{6-metossi-7-[(1'-metilpiperidin-4'-il)metossi]chinazolin-4-il}-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato (Vandetanib)** (resa 89%), con p.f. 242°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.38 (s, 1 H, 2-H); 7.80 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.68 (dd, J=6.5, J=2.3, 1 H, H_{arom}); 7.55 (t, J=2.3, 1 H, H_{arom}); 7.48 (d, J=6.5, 1 H, H_{arom}); 7.20 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.02 (d, J=6.2, 2 H); 3.95 (s, 3 H, OCH₃); 2.80 (d, J=11.2, 2 H); 2.19 (s, 3 H, NCH₃); 1.90 (t, J=11.2, 2 H); 1.90-1.70 (m, 3 H) ; 1.45-1.30 (m, 2 H).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₂H₂₅BrFN₄O₂ (M⁺ +H)

475.1145 (calcolato) 475.1167 (trovato)

Sintesi di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina cloridrato

Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6,7-di(2'-metossietossi)chinazolina e 3-amminobifenile è stata ottenuta la **[6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina cloridrato** (resa 93%), con p.f. 258 °C.

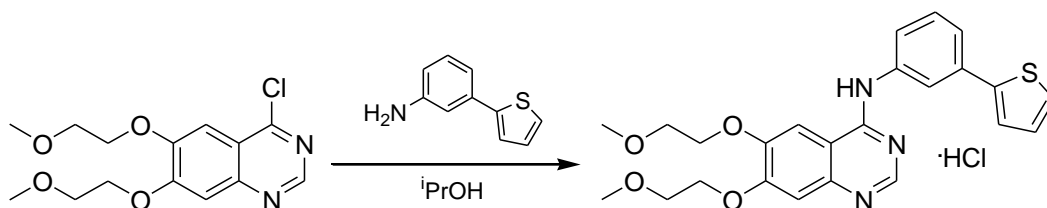
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.20 (s all, 1 H, NH), 8.82 (s, 1 H, 2-H) 8.24 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.99 (s, 1 H, H_{arom}); 7.75-7.66 (m, 3 H, H_{arom}); 7.65-7.61 (m, 1 H, H_{arom}); 7.58 (t, J=7.4, 1 H, H_{arom}); 7.50 (t, J=7.4, 2 H, H_{arom}); 7.44-7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.32 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.40-4.29 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.83-3.75 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.37 (s, 3 H, OCH₃); 3.36 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₆H₂₈N₃O₄ (M⁺ +H)

446.2074 (calcolato)

446.2168 (trovato)

Sintesi di [6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina cloridrato



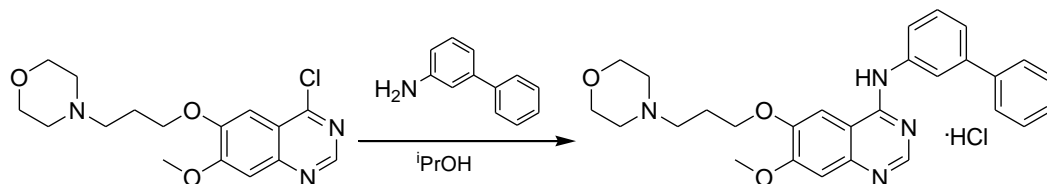
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6,7-di(2'-metossietossi)chinazolina e 3-(tien-2'-il)anilina è stata ottenuta la **[6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina cloridrato** (resa 31%), con p.f. 256 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.05 (s all, 1 H, NH), 8.81 (s, 1 H, 2-H); 8.19 (s, 1 H, H_{arom}); 7.96 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.96-7.49 (m, 4 H, H_{arom}); 7.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.18 (dd, J=5.0, J=3.7, 1 H, H_{arom}); 4.39-4.30 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.72-3.79 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.37 (s, 3 H, OCH₃); 3.36 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₄H₂₆N₃O₄S (M⁺ +H)

452.1639 (calcolato) 452.1767 (trovato)

Sintesi di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina cloridrato



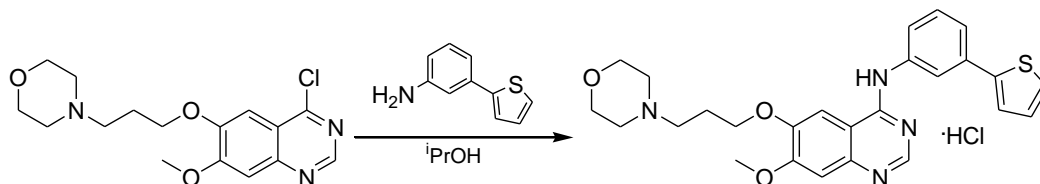
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7-metossi-6-(3'-N-morfolino)-propossichinazolina e 3-amminobifenile è stata ottenuta la **[7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)ammina cloridrato** (resa 3%), con p.f. 216 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.60 (s, 1 H, 2-H); 8.06 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.83 (d, J=7.5, 1 H, H_{arom}); 7.77-7.64 (m, 2 H, H_{arom}); 7.42-7.30 (m, 6 H, H_{arom}); 7.24 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.39-4.23 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.96 (s, 3 H, OCH₃); 3.86-3.82 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 3.49-3.40 (m, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O e CH₂NCH₂); 2.39-2.15 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF)

471.2391 (calcolato)	471.2627 (trovato)	per C ₂₈ H ₃₁ N ₄ O ₃ (M ⁺ +H)
236.1232 (calcolato)	236.1308 (trovato)	per C ₂₈ H ₃₂ N ₄ O ₃ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina cloridrato

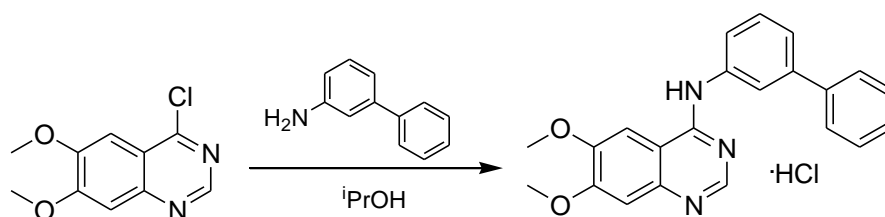


Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina e 3-(tien-2'-il)anilina è stata ottenuta la **[7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-[3-(tien-2'-il)fenil]ammina cloridrato** (resa 5%), con p.f. 224 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.65 (s, 1 H, 2-H); 8.14 (s, 1 H, H_{arom}); 8.05 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.78 (d, J=7.0, 1 H, H_{arom}); 7.64-7.40 (m, 4 H, H_{arom}); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.17 (dd, J=5.0, J=3.6, 1 H, H_{arom}); 4.32 (t, J=5.7, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.98 (s, 3 H, OCH₃); 3.88-3.63 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 3.44-3.36 (m, 6 H, NCH₂CH₂CH₂O e CH₂NCH₂); 2.39-2.19 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF)

477.1955 (calcolato)	477.2029 (trovato)	per C ₂₆ H ₂₉ N ₄ O ₃ (M ⁺ +H)
239.1014 (calcolato)	239.1076 (trovato)	per C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₃ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina cloridrato

Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina e 3-amminobifenile è stata ottenuta la **(6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)ammina cloridrato** (resa quantitativa), con p.f. 255 °C.

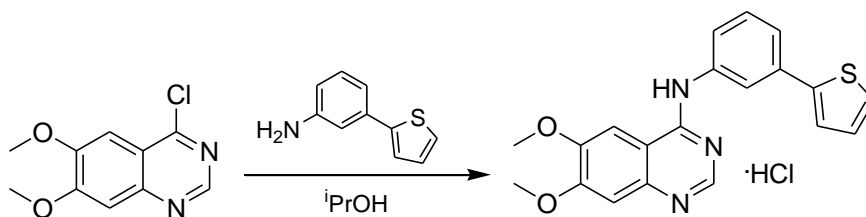
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.80 (s, 1 H, 2-H); 8.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.98 (s, 1 H, H_{arom}); 7.74-7.67 (m, 3 H, H_{arom}); 7.64-7.57 (m, 2 H, H_{arom}); 7.50 (t, J=7.3, 2 H, H_{arom}); 7.45-7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.25 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 4.01 (s, 3 H, OCH₃); 4.00 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₂H₂₀N₃O₂ (M⁺ +H)

355.1550 (calcolato)

355.1570 (trovato)

Sintesi di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-[(3-(tien-2'-il)fenil)ammina cloridrato



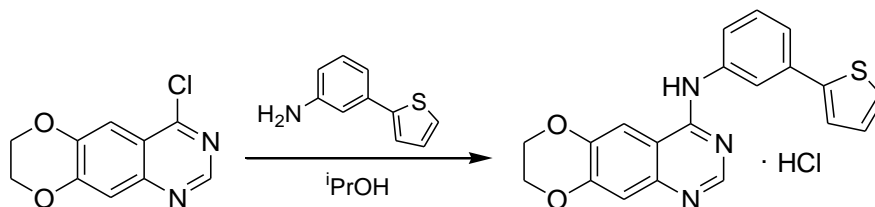
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina e 3-(tien-2'-il)anilina è stata ottenuta la **(6,7-dimetossichinazolin-4-il)-[(3-(tien-2'-il)fenil)ammina cloridrato** (resa 50%), con p.f. 248 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.84 (s, 1 H, 2-H); 8.18 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.95 (s, 1 H, H_{arom}); 7.68-7.50 (m, 5 H, H_{arom}); 7.29 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.17 (dd, J=3.7, J=5.1, 1 H, H_{arom}); 4.02 (s, 3 H, OCH₃); 4.01 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₀H₁₈N₃O₂S (M⁺ +H)

364.1114 (calcolato) 364.1207 (trovato)

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina cloridrato



Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina e 3-(tien-2'-il)anilina, è stata ottenuta la **(7,8-diidro[1,4]-diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(tien-2''-il)fenil]ammina cloridrato** (resa 70%), con p.f. > 300 °C.

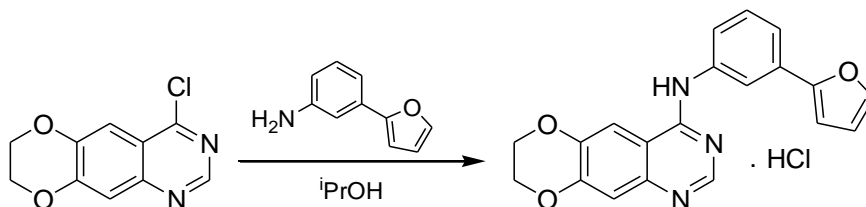
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.96 (s all, 1 H, NH); 8.82 (s, 1 H, 2-H); 8.33 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 8.01 (t, J=1.7, 1 H, 2'-H); 7.71 (dd, J=8.0, J=1.7, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.64-7.48 (m, 4 H, 5'-H e 4'-H o 6'-H e 3''-H e 5''-H); 7.32 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.18 (dd, J=5.1, J=3.6, 1 H, 4''-H); 4.55-4.44 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₀H₁₆N₃O₂S (M⁺ +H)

362.0958 (calcolato)

362.0896 (trovato).

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(furan-2''-il)fenil]ammina cloridrato



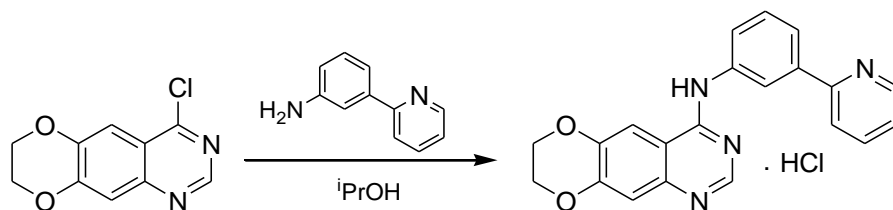
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina e 3-(furan-2'-il)anilina, è stata ottenuta la **(7,8-diidro[1,4]-diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(furan-2''-il)fenil]ammina cloridrato** (resa 52%), con p.f. 75 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.02 (s all, 1 H, NH); 8.83 (s, 1 H, 2-H); 8.33 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 8.05 (d, J=1.7, 1 H, 5''-H); 7.81 (s, 1 H, 2'-H); 7.71-7.62 (m, 2 H, 4'-H e 6'-H); 7.53 (t, J=7.7, 5'-H); 7.32 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.00 (d, J=3.4, 1 H, 3''-H); 6.64 (dd, J=3.4, J=1.7, 1 H, 4''-H); 4.55-4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₀H₁₆N₃O₃ (M⁺ +H)

346.1186 (calcolato) 346.1135 (trovato)

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(piridin-2''-il)fenil]ammina cloridrato



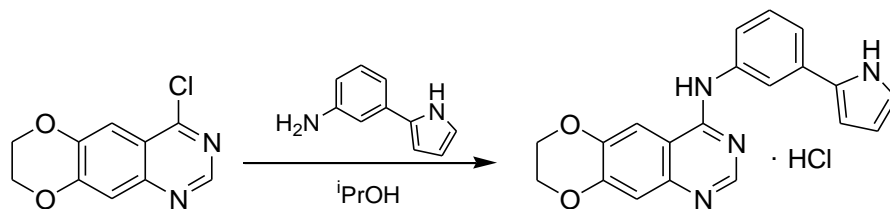
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina e 3-(piridin-2'-il)anilina è stata ottenuta la **(7,8-diidro-[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(piridin-2''-il)fenil]ammina cloridrato** (resa 56%), con p.f. > 300 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.01 (s all, 1 H, NH); 8.82 (s, 1 H, 2-H); 8.70 (d, J=3.2, 1 H, 6''-H); 8.45 (s, 1 H, 2'-H); 8.34 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 8.05-7.82 (m, 4 H, 4'-H, 5'-H, 6'-H e 3''-H); 7.60 (t, J=7.6, 1 H, 4''-H); 7.41 (dd, J=7.6, J=3.2, 1 H, 5''-H); 7.30 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.55-4.42 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF)

357.1346 (calcolato)	357.1318 (trovato)	per C ₂₁ H ₁₇ N ₄ O ₂ (M ⁺ +H)
179.0709 (calcolato)	179.0661 (trovato)	per C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₂ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(pirrol-2''-il)]fenil]ammina cloridrato



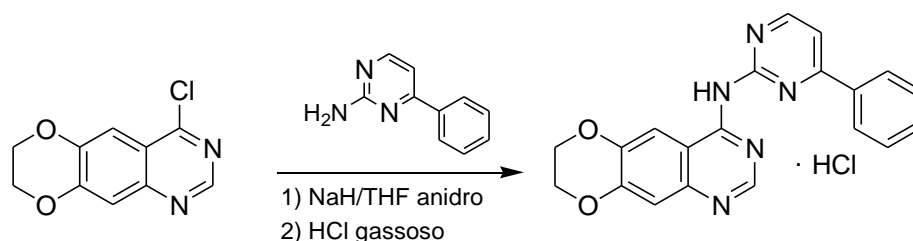
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina e 3-(pirrol-2'-il)anilina è stata ottenuta la **(7,8-diidro[1,4]-diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[3'-(pirrol-2''-il)]fenil]ammina cloridrato** (resa 67%), con p.f. 270 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.38 (s all, 1H, NH); 11.10 (s all, 1 H, NH); 8.81 (s, 1 H, 2-H); 8.34 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.89 (s, 1 H, 2'-H); 7.61-7.55 (m, 1 H, 5'-H); 7.49-7.41 (m, 2 H, 4'-H e 6'-H); 7.33 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 6.88 (dd, J=4.1, J=2.7, 1 H, 3''-H o 5''-H); 6.54 (dd, J=5.1, J=4.1, 1 H, 4''-H); 6.14 (dd, J=5.1, J=2.7, 1 H, 3''-H o 5''-H); 4.55-4.43 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₀H₁₇N₄O₂ (M⁺ +H)

345.1346 (calcolato) 345.1364 (trovato)

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(4'-fenilpirimidin-2'-il)ammina cloridrato



La sintesi è stata condotta con la metodica generale B, a partire da 2-ammino-4-fenilpirimidina e 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina.

Il residuo è stato ripreso con ⁱPrOH (4 mL) e tale soluzione insufflata di HCl gassoso, fino a saturazione. Il precipitato ottenuto è stato raccolto mediante filtrazione, portando all'isolamento della **(7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(4'-fenilpirimidin-2'-il)ammina cloridrato** (resa 5%), con p.f. > 300 °C.

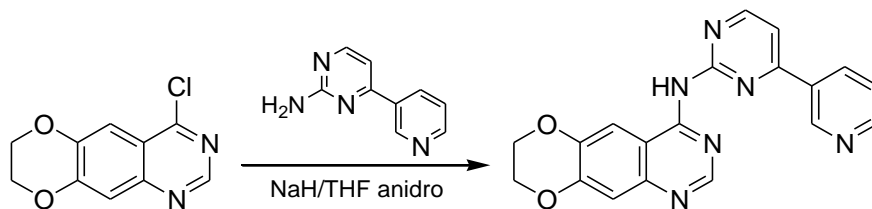
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.95 (d, J=5.4, 1 H, 6'-H); 8.87 (s, 1 H, 2-H); 8.46 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 8.32-8.26 (m, 2 H, 2''-H e 6''-H); 8.04 (d, J=5.4, 1 H, 5'-H); 7.67-7.58 (m, 3 H, 3''-H, 4''-H e 5''-H); 7.44 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.57-4.45 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₀H₁₆N₅O₂ (M⁺ +H)

358.1299 (calcolato)

358.1204 (trovato)

Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[4'-(piridin-3''-il)pirimidin-2'-il]ammina



La sintesi è stata condotta con la metodica generale B, a partire da 2-ammino-4-(piridin-3'-il)pirimidina e 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina.

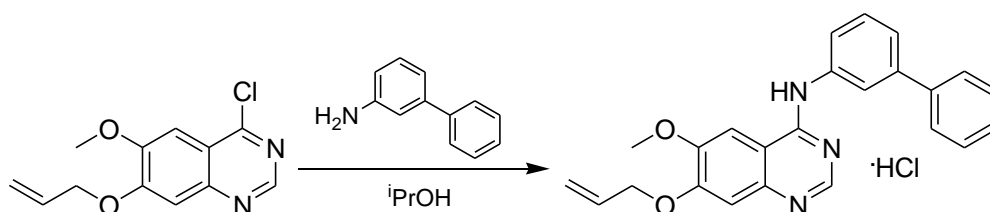
Il residuo è stato purificato mediante cristallizzazione da ⁱPrOH, portando all'ottenimento della **(7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-[4'-(piridin-3''-il)pirimidin-2'-il]ammina** (resa 5%), con p.f. 167 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.35 (d, J=2.2, 1 H, 2''-H); 8.81 (d, J=5.2, 1 H, 6'-H); 8.74 (dd, J=4.8, J=1.6, 1 H, 6''-H); 8.60 (s, 1 H, 2-H); 8.53 (dt, J=8.1, J=2.2, 1 H, 4''-H); 7.95 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.83 (d, J=5.2, 1 H, 5'-H); 7.59 (dd, J=8.1, J=4.8, 1 H, 5''-H); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.46-4.37 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₉H₁₅N₆O₂ (M⁺ +H)

359.1251 (calcolato)

359.1175 (trovato)

Sintesi di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-bifenil)ammina cloridrato

Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina e 3-amminobifenile è stata ottenuta la **(6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-bifenil)ammina cloridrato** (70 mg, resa 42%), con p.f. 241°C.

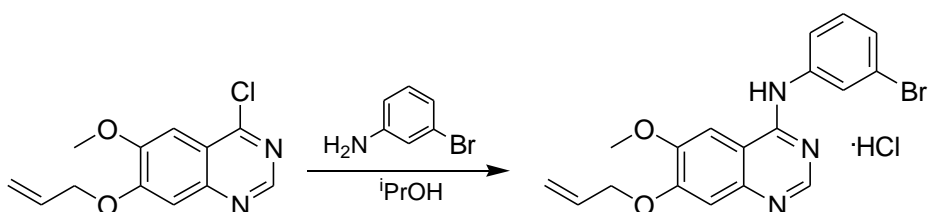
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.78 (s, 1 H, 2-H); 8.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.99 (s, 1 H, H_{arom}); 7.73-7.70 (m, 3 H, H_{arom}); 7.61-7.57 (m, 2 H, H_{arom}); 7.51 (t, J=7.2, 2 H, H_{arom}); 7.44-7.38 (m, 1 H, H_{arom}); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.20-6.05 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.54-5.36 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.84-4.81 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.02 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₄H₂₂N₃O₂ (M⁺ +H)

384.1707 (calcolato)

384.1761 (trovato)

Sintesi di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato

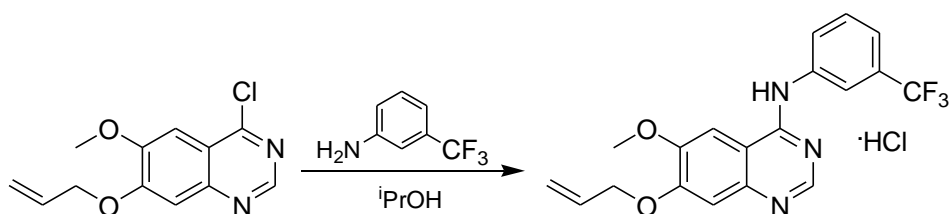


Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina e 3-bromoanilina è stata ottenuta la **(6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-bromofenil)ammina cloridrato** (90 mg, resa 52%), con p.f. 253 °C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.80 (s, 1 H, 2-H); 8.07-8.01 (m, 2 H, 5-H o 8-H e H_{arom}); 7.79-7.73 (m, 1 H, H_{arom}); 7.47-7.43 (m, 2 H, H_{arom}); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.21-6.05 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.55-5.34 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.85-4.80 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.01 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF)

386.0499 (calcolato)	386.0521 (trovato)	per C ₁₈ H ₁₇ BrN ₃ O ₂ (M ⁺ +H)
388.0480(calcolato)	388.0490 (trovato)	per C ₁₈ H ₁₈ BrN ₃ O ₂ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)-ammina cloridrato

Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina e 3-amminobenzotrifluoride è stata ottenuta la **(6-metossi-7-allilossi-chinazolin-4-il)-(3'-trifluorometilfenil)ammina cloridrato** (0.1 g, resa 60%), con p.f. 259°C.

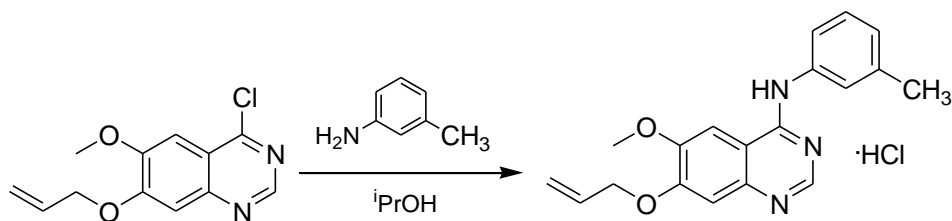
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 8.18 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 8.14 (s, 1H, 2'-H); 8.08 (d, J=8.0, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.74 (t, J=8.0, 1 H, 5'-H); 7.66 (d, J=8.0, 1 H, 4'-H o 6'-H); 7.31 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.19-6.06 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.55-5.36 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.84-4.81 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.03 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₉H₁₇F₃N₃O₂ (M⁺ +H)

376.1267 (calcolato)

376.1302 (trovato)

Sintesi di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato



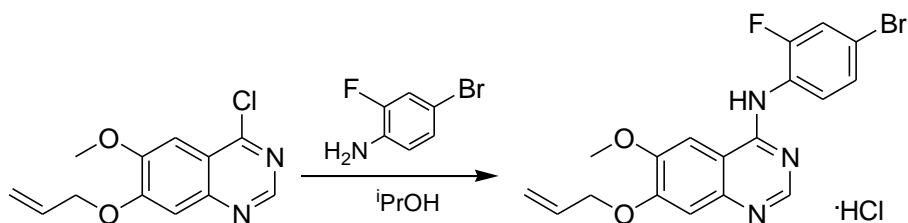
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina e m-toluidina è stata ottenuta la **(6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(3'-metilfenil)ammina cloridrato** (80 mg, resa 55%), con p.f. 246°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.76 (s, 1 H, 2-H); 8.08 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.49 (m, 2 H, 4'-H o 6'-H e 2'-H); 7.37 (t, J=7.8, 1 H, 5'-H); 7.25 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.13 (d, J=7.8, 1 H, 4'-H o 6'-H); 6.18-6.05 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.54-5.35 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.83-4.80 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.00 (s, 3 H, OCH₃); 2.37 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₁₉H₂₀N₃O₂ (M⁺ +H)

322.1550 (calcolato) 322.1571 (trovato)

Sintesi di (6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato



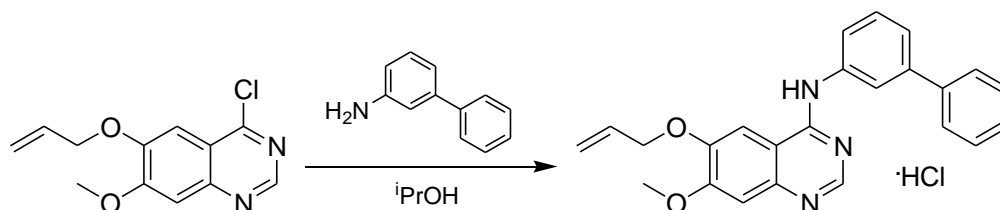
Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-metossi-7-allilossichinazolina e 2-fluoro-4-bromoanilina è stata ottenuta la **(6-metossi-7-allilossichinazolin-4-il)-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ammina cloridrato** (50 mg, resa 27%), con p.f. 253°C.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.72 (s, 1H, 2-H); 8.04 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.78 (d, J=8.7, 1 H, 5'-H o 6'-H); 7.57-7.53 (m, 2 H, 3'-H e 5'-H o 6'-H); 7.27 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.18-6.05 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.53-5.35 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.84-4.80 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.00 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF)

404.0404 (calcolato)	404.0473 (trovato)	per C ₁₈ H ₁₆ BrFN ₃ O ₂ (M ⁺ +H)
406.0386 (calcolato)	406.0420 (trovato)	per C ₁₈ H ₁₇ BrFN ₃ O ₂ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di (6-allilossi-7-metossichinazolin-4-il)-(3'-bifenil)ammina cloridrato



Con la metodica generale A, a partire da 4-cloro-6-allilossi-7-metossichinazolin-2-ile e 3-bifenilammina è stata ottenuta la **(6-allilossi-7-metossichinazolin-4-il)-(3'-bifenil)ammina cloridrato** in tracce.

¹H-NMR (CDCl₃-d); 8.28 (s, 1 H, 2-H); 8.12 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.91-7.85 (m, 1 H, H_{arom}); 7.77-7.73 (m, 1 H, H_{arom}); 7.62-7.59 (m, 2 H, H_{arom}); 7.46-7.40 (m, 4 H, H_{arom}); 7.36 (d, J=7.2, 1 H, H_{arom}); 7.22 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 6.19-6.06 (m, 1 H, CH₂=CHCH₂); 5.58-5.33 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 4.96-4.93 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂); 3.83 (s, 3 H, OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₄H₂₂N₃O₂ (M⁺ +H)

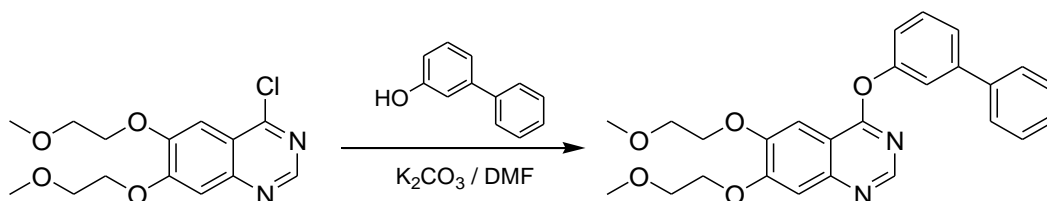
384.1707 (calcolato) 384.1735 (trovato)

7.3.12. SINTESI DI DERIVATI BIFENILOSSICHINAZOLINICI

Metodica generale

Ad una soluzione di 3-idrossibifenile (1.0 mmoli) in DMF anidra (2.5 mL) è stato aggiunto K_2CO_3 (2.5 mmoli). La miscela di reazione è stata posta in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Tale miscela è stata quindi addizionata dell'opportuno derivato 4-clorochinazolinico (1.0 mmoli) e posta a riflusso per 1-4 ore (TLC: $CHCl_3/MeOH$, 85/15). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita in H_2O (20 mL) ed estratta con $CHCl_3$ (3 x 80 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza. La purificazione del residuo ottenuto mediante cromatografia su colonna (eluente $EtOAc/MeOH$ 7:3) ha portato all'ottenimento del derivato bifenilossichinazolinico desiderato.

Sintesi di [(6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere

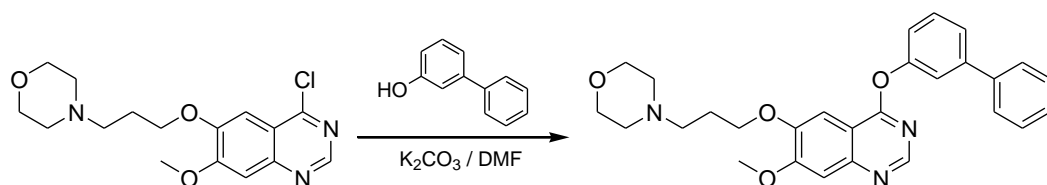


Con la metodica generale da 4-cloro-6,7-di(2'-metossietossi)chinazolina e 3-idrossibifenile è stato ottenuto il **[(6,7-di(2'-metossietossi)chinazolin-4-il)]-(3-bifenil)etere** (resa 3%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.55 (s, 1 H, 2-H); 7.76-7.69 (m, 2 H, H_{arom}); 7.66-7.60 (m, 3 H, 5-H o 8-H e H_{arom}); 7.61-7.54 (t, 1 H, H_{arom}); 7.52-7.37 (m, 4 H, 5-H o 8-H e H_{arom}); 7.35-7.29 (m, 1 H, H_{arom}); 4.38-4.30 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.81-3.72 (m, 4 H, 2 x CH₃OCH₂CH₂O); 3.36 (s, 6 H, 2 x OCH₃).

HRMS (ESI-TOF) per C₂₆H₂₆N₂O₅ (M⁺ +H)

447.1914 (calcolato) 447.1877 (trovato)

Sintesi di [7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)etere

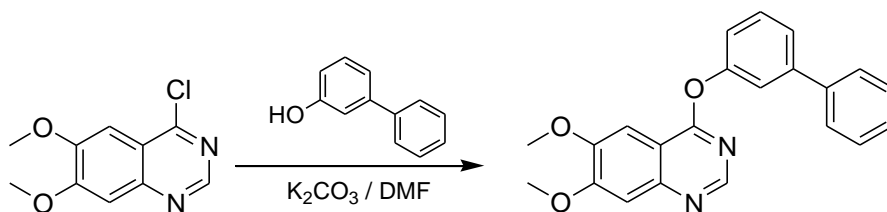
Con la metodica generale da 4-cloro-7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolina e 3-idrossibifenile è stato ottenuto il **[7-metossi-6-(3'-N-morfolino)propossichinazolin-4-il]-(3-bifenil)etere** (resa 5%), di consistenza oleosa.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.55 (s, 1 H, 2-H); 7.75-7.69 (m, 2 H, H_{arom}); 7.67-7.56 (m, 4 H, 5-H o 8-H, H_{arom}); 7.52-7.42 (m, 2 H, H_{arom}); 7.42-7.37 (m, 2 H, 5-H o 8-H e H_{arom}); 7.35-7.29 (m, 1 H, H_{arom}); 4.23 (t, J=6.6, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 3.99 (s, 3 H, CH₃O); 3.61-3.51 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 2.46 (t, J=7.0; 2 H, NCH₂CH₂CH₂O); 2.42-2.32 (m, 4 H, CH₂NCH₂); 2.04-1.92 (m, 2 H, NCH₂CH₂CH₂O).

HRMS (ESI-TOF)

472.2231 (calcolato)	472.2339 (trovato)	per C ₂₈ H ₂₉ N ₃ O ₄ (M ⁺ +H)
236.6152 (calcolato)	236.6179 (trovato)	per C ₂₈ H ₃₀ N ₃ O ₄ (M ²⁺ +2H)

Sintesi di (6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)etere



Con la metodica generale da 4-cloro-6,7-dimetossichinazolina e 3-idrossibifenile è stato ottenuto il **(6,7-dimetossichinazolin-4-il)-(3-bifenil)etere** (resa 4%), con p.f. 171 °C.

1H -NMR (DMSO- d_6): 8.56 (s, 1 H, 2-H); 7.75-7.70 (m, 2 H, H_{arom}); 7.66-7.60 (m, 2 H, H_{arom}); 7.60 (s, 1 H, 5-H o 8-H); 7.59-7.54 (m, 1 H, H_{arom}); 7.51-7.44 (m, 2 H, H_{arom}); 7.43-7.37 (m, 2 H, 5 H o 8-H e H_{arom}); 7.35-7.30 (m, 1 H, H_{arom}); 3.99 (s, 3 H, OCH_3); 3.98 (s, 3 H, OCH_3).

HRMS (ESI-TOF) per $C_{22}H_{18}N_2O_3$ ($M^+ + H$)

359.1390 (calcolato) 359.1506 (trovato)

7.4. METODI DI VALUTAZIONE BIOLOGICA

7.4.1. COLTURE CELLULARI

Cellule tumorali

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari: A431, cellule tumorali di adenocarcinoma squamoso vulvare umano; MCF-7, cellule tumorali di adenocarcinoma della mammella; HeLa, cellule tumorali di adenocarcinoma di cervice uterina umano; HT-29, cellule tumorali di adenocarcinoma colon rettale umano; HepG2, cellule tumorali di carcinoma epatocellulare umano.

Le cellule tumorali sono state coltivate in terreno base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Sigma*) addizionato del 10% di *Fetal Bovine Serum* (FBS, *Euroclone*), di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (*Sigma*) (concentrazione finale 1 mM) e di L-glutamina (*Sigma*) (concentrazione finale 2 mM). Il terreno così composto è stato definito completo.

NIH3T3

Le cellule NIH3T3 (fibroblasti murini embrionali) sono state coltivate in terreno base *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* addizionato del 10% di *Fetal Calf Serum* (FCS, *Promocell*), di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (concentrazione finale 1 mM) e di L-glutamina (*Sigma*) (concentrazione finale 2 mM).

HUVEC

Le cellule HUVEC (cellule di vena di cordone ombelicale umano) sono state estratte attraverso digestione enzimatica utilizzando una soluzione di *Collagenasi IV* (*Sigma*) allo 0.1% in una soluzione tampone sodio-fosfato (PBS; *Gibco-Invitrogen Corporation*). In tal modo viene distrutta la componente collagene del tessuto connettivo e vengono disgregati i contatti tra le cellule. Il tratto di cordone è stato sottoposto a ripetuti lavaggi con PBS, contenente un 1% di antibiotico ed antimicotico (*Sigma*), internamente

ed esternamente alla vena, per eliminare eventuali coaguli di sangue. La formulazione antibiotica-antimicotica conteneva 1000 unità/mL di penicillina G, 10 mg/mL di streptomina solfato e 25 µg/mL di amfotericina B. Mediante incanalazione è stata inserita all'interno della vena una soluzione allo 0.1% di collagenasi IV in PBS. Il cordone è stato incubato con l'enzima per 15 minuti a 37°C in atmosfera umidificata. Al termine di questo periodo, le cellule sono state eluite dalla vena mediante lavaggio con 3-5 mL di terreno selettivo per le cellule endoteliali MV₂ (terreno base) (*PromoCell*). Tale terreno è stato definito completo quando addizionato dei seguenti fattori:

<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	5%
<i>human Epidermal Growth Factor</i>	5.0 ng/mL
Idrocortisone	0.2 µg/mL
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	0.5 ng/mL
<i>human basic Fibroblast Growth Factor</i>	10 ng/mL
<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>	20 ng/mL
Acido ascorbico	1 ng/mL
Antibiotico/antimicotico	1%

La sospensione cellulare così ottenuta è stata centrifugata per 5 minuti a 1500 giri/minuto, il *pellet* è stato risospeso in terreno MV₂ completo e le cellule sono state seminate in piastra Petri (*Falcon*) precedentemente condizionata con una soluzione di fibronectina (*B&D Biosciences*) (1 µg/cm²) in acqua. Il condizionamento garantisce la riproduzione dell'effetto dell'ECM all'interno della coltura, migliorando i contatti cellula-substrato. Tutti i saggi sono stati eseguiti con colture cellulari al secondo o terzo passaggio di subcoltura.

7.4.2. DETERMINAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

La vitalità cellulare è stata determinata verificando l'attività metabolica delle cellule in coltura attraverso un saggio colorimetrico che utilizza il 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobromuro (sale giallo di tetrazolio, MTT). L'analisi sfrutta la riduzione dell'MTT a cristalli di formazano (viola) indotta dalle deidrogenasi presenti esclusivamente nelle cellule vitali. I cristalli di formazano, insolubili in ambiente

acquoso, sono stati estratti dalle cellule con propan-2-olo acido (0.04 M HCl in propan-2-olo). La determinazione quantitativa è stata effettuata tramite lettura spettrofotometrica a 570 nm.^{63, 64}

Procedura

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pz (BD *Falcon*) in presenza di terreno completo a densità diverse a seconda della linea cellulare: 5×10^3 cellule/pz per A431 e NIH3T3, 3.5×10^3 cellule/pz per HUVEC e MCF-7, 3×10^3 per HT-29, 2.7×10^3 per HeLa e HepG2. Dopo 24 h di incubazione a 37°C è stato effettuato un lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui di terreno, e sono stati aggiunti i composti da testare disciolti in terreno completo (volume finale 200 µL).

I derivati chinazolinici e i rispettivi composti di riferimento, disciolti in terreno completo, sono stati testati alle seguenti concentrazioni: 10 µM, 1 µM, 0.1 µM e 0.01 µM.

Il controllo era costituito da cellule in terreno completo non trattate. Trascorse 68 h di incubazione con le sostanze a 37°C, nei pozzetti è stato aggiunto il 10% di MTT (*Sigma*, 5 mg/mL in PBS) e si è atteso un periodo di altre 4 h affinché il composto venisse metabolizzato dalle cellule. I cristalli di formazano formati sono stati solubilizzati con 75 µL di isopropanolo acido (*Carlo Erba*) e la piastra è stata posta sotto blanda agitazione meccanica per 20 minuti al buio. La lettura dei valori di assorbanza è stata eseguita con *Microplate autoreader* EL 13 a 570 nm. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student. Dalle curve dose-risposta sono stati ottenuti i valori di IC₅₀, corrispondenti alle concentrazioni che inducono una diminuzione del 50% nella proliferazione cellulare rispetto alle colture di controllo non trattate.

7.4.3. VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI CELLULE ANN V⁺,PI⁺

L'apoptosi, definita anche morte cellulare programmata, è coinvolta in numerosi processi fisiologici (sviluppo embrionale, ricambio tissutale, regolazione del sistema immunitario) e patologici (infezioni virali, infarto, malattie degenerative, cancro). Questa morte fisiologica comporta una serie di variazioni morfologiche e biochimiche nella cellula, tra le quali la riduzione delle dimensioni cellulari, l'alterazione della membrana plasmatica, la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA. Queste modificazioni, caratterizzanti il processo apoptotico, possono essere identificate attraverso saggi biologici. Ad esempio, variazioni della distribuzione fosfolipidica e dell'integrità della membrana plasmatica possono essere analizzate mediante citofluorimetria dopo marcatura con Annessina V-FITC/propidio ioduro (PI). L'Annessina V lega la fosfatidilserina che, nelle fasi precoci del processo apoptotico, viene esposta a livello della superficie cellulare e non più al suo interno. Il propidio ioduro, invece, permette di individuare le cellule necrotiche dato che non viene internalizzato dalle cellule in apoptosi.

Procedura

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 3×10^5 cellule/pz in piastre da 6 pz (BD *Falcon*) in presenza di terreno completo (1 mL per pz). Dopo 24 h di incubazione a 37°C sono state aggiunte le sostanze da testare (concentrazione 1 μ M). Ad intervalli di 24, 48 e 72h dall'esposizione ai composti, le cellule sono state tripsinizzate, risospese nel loro terreno di coltura in tubi da FACS (BD *Falcon*), centrifugate per 8 minuti a 1800 giri/minuto e il surnatante è stato eliminato. Il *pellet* è stato risospeso in PBS freddo ed è stato centrifugato per 8 minuti a 1800 giri/minuto. Dopo l'eliminazione del surnatante, per l'analisi dei campioni è stato usato *Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit* (eBioscience). Le cellule, risospese in 195 μ L *Binding Buffer* 1X e dopo aggiunta di 5 μ L di Annessina V-FITC sono state lasciate in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state centrifugate per 8 minuti a 1800 giri/minuto, il surnatante è stato eliminato e il *pellet* risospeso in 190 μ L di *Binding Buffer* 1X. I campioni, dopo l'aggiunta di 10 μ L di PI (20 μ g/mL), sono stati analizzati al citofluorimetro.

7.4.4. REVERSIBILITA' DEGLI EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI

Per valutare se l'inibizione della proliferazione cellulare indotta dai composti in analisi fosse reversibile, è stato effettuato il saggio di reversibilità dell'effetto citotossico che prevede il trattamento delle cellule con i composti in analisi seguito da un tempo di recupero con solo terreno di coltura proliferativo.

Procedura

Le cellule sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pz per le A431, 3×10^3 cellule/pz per le HUVEC e in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo. Dopo 24 h di incubazione a 37°C è stato effettuato un lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui di terreno, e sono state aggiunte le sostanze da testare, alla concentrazione di 10 μ M, disciolte in terreno completo (volume finale 200 μ L).

Il controllo è costituito da cellule in terreno completo non trattate. Dopo 4 h di incubazione, i terreni sono stati rimossi, è stato effettuato un lavaggio con PBS ed è poi stato aggiunto solo terreno completo (200 μ L/pz).

Trascorse 64 h di incubazione a 37°C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μ L di MTT (*Sigma*) (5 mg/mL in PBS) e si è atteso un periodo di altre 4 h affinché il composto venisse metabolizzato dalle cellule. Il saggio è poi proseguito come descritto al punto **7.4.2**. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student.

7.4.5. EFFETTI SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE INDOTTA DA EGF ESOGENO

Modulazione dell'effetto di EGF esogeno

Per verificare se i derivati fossero in grado di contrastare l'aumento della vitalità cellulare stimolata da EGF esogeno, l'attività metabolica delle cellule è stata valutata attraverso il saggio colorimetrico con MTT, come descritto al punto **7.4.2**, seguendo due protocolli di trattamento.

a) Incubazione con i composti, rimozione e aggiunta di EGF esogeno

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pz in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo (200 μ L per pz). Dopo 24 h di incubazione a 37°C è stato effettuato un lavaggio con PBS e sono state aggiunte le sostanze da testare disciolte in terreno completo (volume finale 200 μ L). I derivati 4-aminochinazolinici sono stati testati alla concentrazione risultato meno citotossica nel saggio di determinazione della vitalità cellulare: i composti **PD153035**, **2**, **3**, **61c**, **61f** e **61g** sono stati testati alla concentrazione 0.01 μ M, mentre **Vandetanib** e il composto **1** alla concentrazione 0.1 μ M. Trascorse 24 h di incubazione a 37°C, le sostanze sono state rimosse, è stato effettuato un lavaggio con PBS ed è stato aggiunto terreno base DMEM addizionato dello 0.5% di FBS, di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (concentrazione 1 mM), di L-glutamina (concentrazione 2 mM) e di EGF (*Sigma*) 5 ng/mL, per un volume totale di 200 μ L/pz. Il controllo era costituito da cellule non trattate coltivate nel terreno appena descritto. Trascorse 68 h di incubazione a 37°C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μ L di MTT e si è atteso un periodo di altre 4 h per permettere alle cellule di metabolizzare il composto. La rilevazione dei cristalli di formazano è stata effettuata come descritto nel punto come descritto al punto **7.4.2**.

b) Incubazione contemporanea con i composti ed EGF esogeno

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 5×10^3 cellule/pz in piastre da 96 pz in presenza di terreno completo (200 μ L per pz). Dopo 24 h di incubazione a 37°C è stato effettuato un lavaggio con PBS e sono state aggiunte le sostanze da testare, alle concentrazioni sopra indicate, disciolte in terreno base DMEM addizionato dello 0.5% di FBS, di una soluzione di *Penicillin Streptomycin* (concentrazione 1 mM), di L-glutamina

(concentrazione 2 mM) e di EGF (*Sigma*) 5 ng/mL, per un volume totale di 200 µL/pz. Il controllo era costituito da cellule non trattate coltivate nel terreno appena descritto. Trascorse 68 h di incubazione a 37°C, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 µL di MTT e si è atteso un periodo di altre 4 h per permettere alle cellule di metabolizzare il composto. La rilevazione dei cristalli di formazano è stata effettuata come descritto nel punto come descritto al punto **7.4.2**.

I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture non trattate. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student.

7.4.6. EFFETTI SULL'ATTIVITA' TIROSINCHINASICA

L'attivazione di proteine ad attività tirosinchinasica è strettamente dipendente dalla fosforilazione dei propri residui tirosinici e delle proteine substrato. Per determinare la fosforilazione di questo tipo di recettori ci sono differenti tecniche e metodiche. L'attività tirosinchinasica di un pannello di TK *in vitro* e la fosforilazione di EGFR da lisato cellulare sono stati valutati con due diversi saggi.

a) Valutazione dell'attività tirosinchinasica in vitro

Per valutare se i derivati fossero in grado di inibire l'azione enzimatica di differenti TK, l'attività tirosinchinasica di un pannello di enzimi è stata determinata con metodo radioattivo che utilizza [γ -³²P] ATP e un substrato proteico basico fosforilabile.

Procedura

I domini chinasi sono stati diluiti in *Kinase dilution buffer* (5 mM MOPS pH 7.2, 2.5 mM glicerolo-2-fosfato, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM EGTA, 0.4 mM EDTA, 0.05 mM DTT, 0.5 mM BSA). Le reazioni sono state condotte in tubi da microcentrifuga raffreddati precedentemente. Alle proteinchinasasi (concentrazione finale di 200 ng/mL) sono stati aggiunti i composti **1**, **2**, **3**, **61c**, **61f** e **61g** (0.1 µM), 0.2 mg/mL di substrato (*Myelin Basic Protein*, *Sigma*); 0.05 mM ATP e 0.25 mCi di [γ -³²P] ATP (*PerkinElmer*, Monza, MI) per un volume totale di 25 µL. Il controllo negativo è stato preparando sostituendo l'acqua al substrato, mentre nel controllo positivo è stata aggiunta acqua in luogo dei

composti da testare. Le reazioni sono state condotte a 30°C per 20 minuti e infine bloccate mediante incubazione a 95°C per 5 minuti con *loading buffer* contenente β -mercaptoetanololo 0.25 mM. I campioni sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10% p/v. Le immagini del substrato fosforilato (proteina mielina basica) sono state acquisite con il sistema *VersaDoc* (*Biorad*) ed analizzate con il software *Quantity One* (*Biorad*).

b) Determinazione della fosforilazione di EGFR da lisato cellulare

Per determinare la fosforilazione di EGFR immunoprecipitato da lisato cellulare, è stata utilizzata la tecnica del Western Blotting che permette di identificare una determinata proteina mediante il suo riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Per facilitare il riconoscimento, la proteina di interesse è stata fatta migrare su un gel di poliacrilammide e poi trasferita su una membrana di nitrocellulosa dove è seguito il riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico. La membrana di nitrocellulosa è stata riutilizzata per l'analisi di Shc (proteina adattatrice di EGFR) e di EGFR dopo lo *strip*.

Procedura

Le cellule A431 sono state seminate ad una densità di 1×10^6 cellule/piastra su piastre del diametro di 10 cm (*BD Falcon*). Raggiunta la confluenza dell'80% le cellule sono state lasciate O/N senza siero. Le cellule sono state quindi incubate per 2 h a 37°C con i composti **1**, **2**, **3**, **61c**, **61f** e **61g** alla concentrazione 10^{-6} M. Al termine del periodo di incubazione, è stato aggiunto EGF (*Sigma*) (concentrazione 100 ng/mL) per 5 minuti. L'incubazione è stata bloccata per aggiunta di PBS freddo al pH di 7.4. Il monostrato di cellule è stato lavato due volte con PBS freddo e quindi lisato in ghiaccio per 45 minuti mediante *buffer* RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.25% sodio deossicolato, 0.1% Nonidet P-40, 100 μ g/mL NaVO_4 , 1mM NaF, 10 μ g/mL aprotinina, 10 μ g/mL leupeptina). I campioni sono stati quindi centrifugati a 15.000xg per 5 minuti a 4°C. Sul surnatante è stata determinata la concentrazione delle proteine mediante saggio di Bradford. Ad 1 mg/mL di proteine in RIPA, dopo essere stato incubato con 0.1 μ g/mL di un Ab anti-EGFR (*Cell Signaling*) O/N a 4°C, è stata aggiunta una resina G (*Santa Cruz*), che riconosce l'Ab anti-EGFR, per 2 h a 4°C. Il campione dopo essere stato centrifugato a 15000 rpm per 30 secondi a 4°C è stato lavato con PBS 3 volte. È stato poi aggiunto un

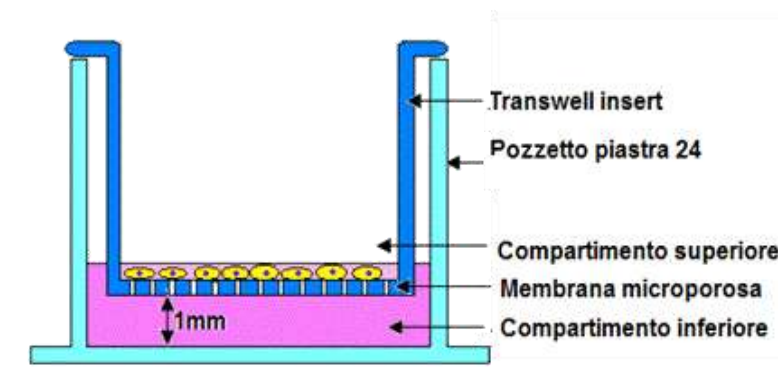
loading buffer contenente β -mercaptoetanololo. La sospensione ottenuta è stata quindi frazionata mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 7% p/v e successivamente trasferita su una membrana di nitrocellulosa.

Il trasferimento è stato condotto per 1 h a 110 mV a 4°C utilizzando un *buffer* di trasferimento (Tris base 20 mM, glicina 150 mM metanolo 20% v/v, SDS 0.1% v/v). Al fine di bloccare legami aspecifici, la membrana di nitrocellulosa è stata quindi incubata a temperatura ambiente per 20 minuti con una soluzione di latte non grasso (*Oncogene*) al 5% p/v in PBS-TWEEN. Dopo 3 lavaggi in PBS-TWEEN, la membrana è stata incubata con un Ab *mouse* anti-fosfotirosina (PY99, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluito 1:1000 in PBS-TWEEN. L'incubazione è stata protratta per 2 h a temperatura ambiente sotto costante agitazione. La membrana è stata quindi nuovamente lavata (3 volte per 5 minuti) in PBS-T ed incubata per 1 h a RT con un Ab diretto contro le IgG di *mouse* e coniugato con la perossidasi di rafano (HRP) diluito 1:2000 in PBS-TWEEN. Dopo ulteriori lavaggi la membrana è stata incubata al buio per 5 minuti con il substrato chemiluminiscente "*SuperSignal West Dura Extended Duration*" (*Pierce*) 1:2 in PBS-TWEEN. Gli immunocomplessi sono stati quindi visualizzati mediante reazione con l'Ab coniugato HRP, fotografati con il sistema *VersaDoc* (*Biorad*) ed analizzati con il *software Quantity One* (*Biorad*).

La membrana è stata incubata per 30 minuti a 50°C in *Strip buffer* (Tris HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanololo 100 mM) Dopo 2 lavaggi in PBS-T, la membrana è stata incubata con latte non grasso (*Oncogene*) al 5% p/v in PBS-T. Dopo ulteriori lavaggi in PBS-T, la membrana è stata incubata O/N con Ab *mouse* anti-EGFR (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*) diluito 1:250 e Ab *rabbit* anti-Shc (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*) diluito 1:100 in PBS-TWEEN. Al termine del periodo di incubazione la membrana è stata lavata per 3 volte con PBS-TWEEN e incubata 1 h a RT con un Ab diretto contro le IgG di *rabbit* e coniugato con la perossidasi di rafano (HRP) diluito 1:2000 in PBS-TWEEN. Gli immunocomplessi sono stati visualizzati come precedentemente descritto.

7.4.7. MIGRAZIONE CELLULARE

Una delle fasi fondamentali del processo angiogenico è la migrazione delle EC dal lume del vaso al tessuto da neovascolarizzare. L'inibizione della migrazione cellulare indotta dai composti oggetto di studio è stata valutata eseguendo il seguente test: in pozzetti contenenti i composti da testare a concentrazione non citotossica è stato inserito un filtro poroso su cui sono state seminate le HUVEC. In questo modo è stata valutata la tendenza delle HUVEC a migrare al di là della membrana microporosa. Sono stati utilizzati filtri *Transwell*® costituiti da una membrana di policarbonato di diametro di 6.5 mm aventi pori di 5,0 µm per piastre a 24 pozzetti (*Corning*). Per identificare le cellule migrate è stato utilizzato un montante acquoso contenente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindolo), che intercalandosi nel DNA conferisce ai nuclei cellulari una caratteristica fluorescenza blu. Per ogni filtro sono stati fotografati cinque campi utilizzando un microscopio a fluorescenza e sono state contate le cellule migrate. Il numero di cellule migrate è stato rapportato al controllo rappresentato da colture non trattate.



Procedura

Le HUVEC sono state seminate sulla membrana microporosa ad una densità di 5×10^4 cellule/filtro in terreno base contenente l'1% di FCS (*Fetal Calf Serum, Promocell*) e i composti in concentrazione pari a 1 µM. Ogni filtro è stato posizionato in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti, in cui erano stati precedentemente posti 400 µL di terreno di coltura completo. Dopo 4 h di incubazione a 37°C le cellule sono state fissate con una soluzione di formaldeide al 10% per 24 h. Il filtro è quindi stato sciacquato con PBS e le cellule che non erano migrate, rimaste quindi sul lato superiore della membrana, sono state rimosse con un bastoncino di cotone. Il filtro è stato quindi nuovamente lavato con PBS e, una volta staccato dal supporto, è stato posizionato su un vetrino

portaoggetti e trattato con un montante acquoso con DAPI (*Vector Laboratories*). Utilizzando un microscopio a fluorescenza (*Leica*), sono stati fotografati cinque campi per ogni filtro (ingrandimento x100) seguendo uno schema a croce e sono state contate le cellule migrate rimaste adese alla parte inferiore del filtro. La migrazione è stata espressa come variazione percentuale rispetto al controllo non trattato. L'analisi statistica dei dati, media di almeno 3 esperimenti, è stata effettuata con il *t*-test di Student.

Precedentemente era stato effettuato un saggio di determinazione della vitalità cellulare con MTT come descritto precedentemente al punto **7.4.2**, lasciando però incubare le cellule per 4 h con i composti in analisi al fine di identificare la concentrazione non citotossica da utilizzare nel saggio sopra descritto.

7.4.8. MORFOGENESI IN VITRO

Le EC sono in grado di aggregarsi per formare delle strutture simil-capillari, mimando il processo di formazione dei capillari che si verifica *in vivo*.^{65, 66, 67}

In alcuni studi è stata inoltre dimostrata la possibilità di indurre le HUVEC al differenziamento e alla formazione di strutture tubulari dopo un periodo di 4-6 settimane se seminate in assenza di mitogeni.⁶⁶ Tuttavia, seminando le cellule su superfici opportunamente condizionate, tale evento può essere accelerato. *In vivo* le EC poggiano sulla lamina basale costituita da collagene IV, proteoglicani ad eparan solfato (HSGP) e glicoproteine, come ad esempio la laminina. Quest'ultima, in particolare, oltre a promuovere l'adesione cellulare al pari del collagene, sembra stimolare anche la crescita, la differenziazione e la migrazione delle cellule.^{68, 69, 70} Sulla base di queste considerazioni è stato utilizzato, per il condizionamento delle piastre, il Matrigel, ovvero un estratto di lamina basale del sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), ricco in proteine della matrice extracellulare, quali collagene IV, laminina, HSGP, entactina. Il Matrigel, a temperatura ambiente, polimerizza producendo una matrice biologicamente attiva simile a quella presente nei tessuti di mammifero, mentre a 4°C è liquido. Si è dimostrato efficace nel promuovere i processi di adesione e differenziamento sia di cellule normali che trasformate, e fornisce un substrato ideale per studi di angiogenesi. In commercio sono due i tipi di Matrigel disponibili: un primo

tipo, chiamato Matrigel Normale, contiene, oltre alle proteine della matrice extracellulare, anche fattori di crescita come TGF-2, FGF-2, IGF-1 e IGF-2. Un secondo tipo (chiamato *Growth Factor Reduced*-Matrigel Ridotto), invece, contiene le proteine della matrice extracellulare e una quantità ridotta di fattori di crescita.

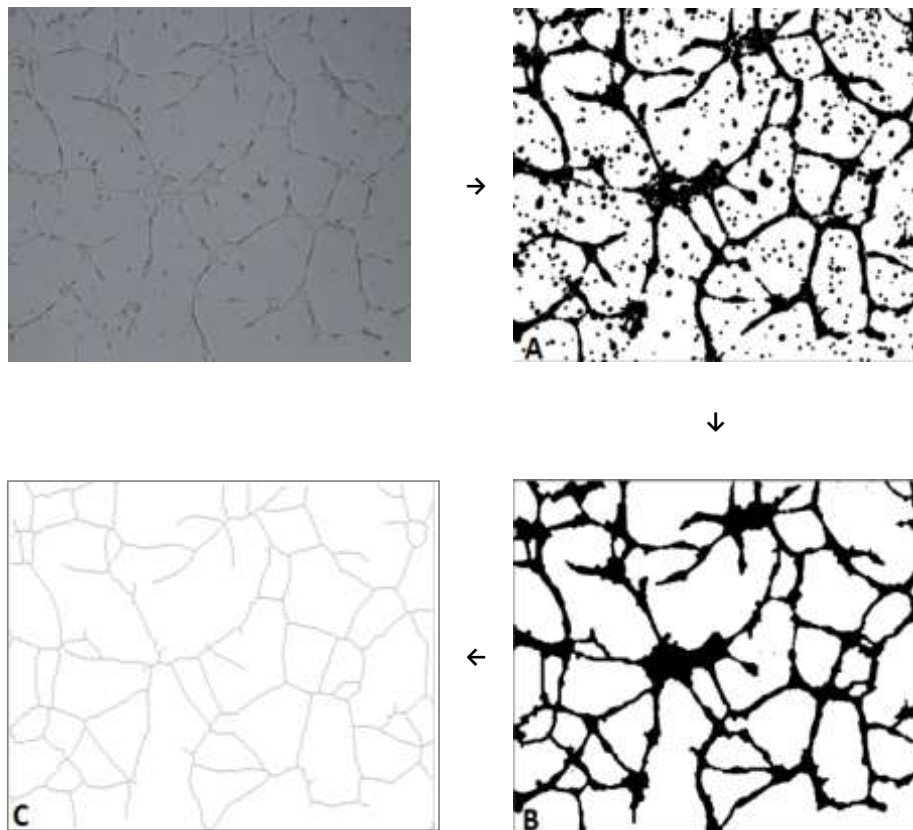
Fattori di crescita	Matrigel normale	Matrigel ridotto
FGF-2 (pg/mL)	0-0.1	0-0.1
EGF (ng/mL)	0.5-1.3	<0.5
IGF-1 (ng/mL)	15.6	5
PDGF (pg/mL)	12	<5
NGF (ng/mL)	<0.2	<0.2
TGF-beta (ng/mL)	2.3	1.7

Concentrazione dei fattori di crescita nel Matrigel Normale e Ridotto

a) Effetti sulla morfogenesi in vitro

Ciascun pozzetto di una piastra da 24 pz (*Falcon*) è stato condizionato con uno strato di Matrigel Normale (50 µL/pz) (*B&D Biosciences*), precedentemente scongelato a 4°C in ghiaccio, con l'accortezza di utilizzare materiale (puntali, pipette, piastre) pre-raffreddato in *freezer* e che il supporto di plastica per la coltura cellulare rimanesse in ghiaccio durante tutta la procedura di condizionamento. La piastra è poi stata incubata a 37°C per almeno 1 h per indurre la gelificazione della matrice glicoproteica. In ciascun pozzetto condizionato sono state seminate 7.5×10^4 cellule sospese in 1 mL di terreno MV₂ base contenente l'1% di FCS (*Promocell*) e i composti in esame a concentrazione non citotossica come risultato da saggi di vitalità cellulare condotti nelle medesime condizioni: 0.1 µM per tutti i derivati e i composti di riferimento. Dopo 18 h di incubazione a 37°C e un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate con una soluzione al 2% di glutaraldeide (*Merck*) in tampone sodio cacodilato 0.1 M (*Sigma*) (Albini A *et al*, 2004). Per ogni pozzetto sono poi stati fotografati 5 campi (ingrandimento x50), seguendo uno schema a croce. Le immagini così ottenute sono state analizzate grazie all'impiego del *Software ImageJ-Matrigel Assay*, valutando sia parametri dimensionali, come la percentuale dell'area coperta dalle cellule, la lunghezza totale della rete formata dalle HUVEC per ogni campo e l'area percentuale racchiusa all'interno delle maglie, sia parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e di punti di ramificazione per campo. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi

come variazioni percentuali rispetto al campione non trattato. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student.



Analisi delle immagini ottenute con il software "IMAGEJ ANGIOJ- MATRIGEL ASSAY". Partendo dall'immagine catturata al microscopio, grazie al software, si ottiene dapprima l'immagine di contrasto in bianco e nero (A), quindi l'immagine viene corretta manualmente (B) ed infine si ottiene lo scheletro della rete di maglie (C).

b) Effetti sulla morfogenesi *in vitro* indotta da citochine esogene

Il saggio è stato ripetuto utilizzando Matrigel ridotto seminando le cellule in 1 mL di terreno base contenente l'1% di FCS, FGF-2 alla concentrazione di 50 ng/mL o VEGF alla concentrazione di 20 ng/mL da soli o con i composti in analisi alle stesse concentrazioni non citotossiche elencate nel protocollo precedente. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto alle colture di controllo trattate rispettivamente con FGF-2 e VEGF. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student.

Precedentemente erano stati effettuati saggi di determinazione della vitalità cellulare con MTT come descritto precedentemente al punto **7.4.2**, lasciando però incubare le cellule per 18 h con i composti in analisi da soli o con 50 ng/mL di FGF-2 o 20 ng/mL di

VEGF, al fine di identificare la concentrazione non citotossica da utilizzare nei saggi sopra descritti.

7.4.9. SAGGIO *IN VIVO* CON *PLUG* DI MATRIGEL

Lo studio dell'angiogenesi attraverso i modelli *in vitro* permette la valutazione delle singole fasi del processo e il vantaggio di controllare, almeno in parte, le molteplici variabili che accompagnano l'esecuzione dei saggi (quali le concentrazioni dei fattori angiogenici o il numero di cellule impiegate per il test), oltre alla possibilità di ridurre i costi e le difficoltà rispetto agli esperimenti *in vivo*. Tuttavia, le limitazioni dei saggi *in vitro* sono molte, prima fra tutte la natura stessa delle EC, che mostrano differenze fenotipiche legate all'origine micro e macrovascolare e all'organo d'origine. Inoltre all'interno della parete del vaso sanguigno, le EC si trovano in una fase di quiescenza, da cui escono quando poste in coltura, riacquistando così la capacità di dividersi. Le cellule proliferanti, però, possono subire variazioni del loro stato di attivazione, del cariotipo, dell'espressione di antigeni superficiali e delle proprietà legate alla crescita in funzione del tessuto di provenienza.⁷¹ Le EC, inoltre, non sono i soli tipi cellulari coinvolti nell'angiogenesi. All'interno delle varie fasi del processo, infatti, intervengono cellule di supporti (periciti, fibroblasti, cellule muscolari lisce), cellule mesenchimali e cellule circolanti del sangue, oltre ad una vasta gamma di fattori pro e antiangiogenici prodotti e liberati dai diversi tipi cellulari. L'influenza di questo insieme di cellule e fattori sull'endotelio durante la creazione di nuovi vasi è difficile da valutare appieno *in vitro*. Sono presenti, inoltre, diversi studi in letteratura in cui composti in grado di interferire con una o più fasi del processo angiogenico non hanno dimostrato la stessa attività anche *in vivo*, rendendo quindi indispensabile affiancare i risultati ottenuti dai modelli *in vitro* a quelli derivanti da saggi *in vivo*. I modelli *in vivo* utilizzati per lo studio dell'angiogenesi comprendono test su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test), saggio su mesentero di ratto, saggi con impianto di *plug* di Matrigel e modelli di angiogenesi tumorale.⁷² L'impianto di una matrice polimerica (*plug* di Matrigel) nella zona sottocutanea di topi C57 Black rappresenta un saggio largamente utilizzato *in vivo* per verificare la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno del gel inoculato, grazie alla possibilità di sospendere cellule e/o fattori pro o antiangiogenici all'interno del

Matrigel.^{73,74} Il Matrigel, mantenuto alla temperatura di 4°C, viene aggiunto di eparina, FGF-2 ed eventuali sostanze da testare per valutare la capacità di quest'ultime di contrastare l'effetto stimolatorio sul processo angiogenico esercitato dalla citochina. Il gel viene quindi inoculato sottocute e, solidificando alla temperatura corporea, forma un *plug* gelatinoso e compatto. Dopo un certo periodo, la risposta angiogenica può essere quantificata attraverso una misurazione del contenuto di emoglobina, indicatore della presenza di nuovi vasi sanguigni, mediante immunisto chimica per verificare la presenza di *marker* specifici delle EC su microsezioni di matrice polimerica, o ancora mediante fluorescenza.⁷⁵ Il dosaggio dell'emoglobina viene effettuato attraverso l'impiego del *kit Drabkin's Reagent (Sigma)*, normalmente utilizzato per la determinazione quantitativa di tipo colorimetrico dell'emoglobina nel sangue intero a scopo diagnostico. La reazione specifica è l'ossidazione dell'emoglobina e dei suoi derivati a metaemoglobina, in presenza di un composto alcalino quale il ferricianuro di potassio. La metaemoglobina reagisce col cianuro di potassio per formare cianometamoglobina, che presenta un massimo di assorbimento a 540 nm. L'assorbanza misurata a questa lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di emoglobina. Questa metodica, inoltre, offre un'esecuzione relativamente rapida e semplice, se paragonata ad altri modelli di studio *in vivo*.

a) Impianto dei plug di matrigel

Per ogni animale (topi C57 Black), sono stati usati 500 µL di Matrigel (*B&D Biosciences*), precedentemente scongelato a 4°C O/N. Il materiale da utilizzare per la procedura (puntali, eppendorf) è stato preraffreddato in *freezer*. Sono stati quindi miscelati con il Matrigel 200 ng/mL di FGF-2 (*Sigma*) e 12 U.I./*plug* di eparina (*Vister*); successivamente sono stati aggiunti i composti oggetto di studio alla concentrazione non citotossica di 1 µM. I topi sono stati sedati mediante anestetico gassoso e, al momento dell'iniezione sottocutanea, sono stati utilizzati aghi e siringhe preventivamente raffreddati in *freezer*. I topi trattati con Matrigel contenente solo eparina rappresentavano i controlli negativi, mentre quelli con Matrigel contenente eparina ed FGF-2 i controlli positivi.

b) Determinazione del contenuto di emoglobina

Dopo sette giorni dall'iniezione gli animali sono stati sacrificati tramite inalazione di anidride carbonica. I *plug* sono stati rimossi, immersi in un *buffer* costituito da 300 µL di *Brij-35* 0.1% in PBS per *plug*, e posti a 4°C O/N. Successivamente sono stati centrifugati

per 5 minuti a 13500 giri/minuti e nel surnatante è stato determinato il contenuto di emoglobina, usando il *Drabkin's Reagent*, contenente NaHCO_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, e KCN.

E' stata costruita una retta di taratura per calcolare la concentrazione di emoglobina estratta dal *plug*, dopo lettura dell'assorbanza. Questa è stata ottenuta mediante la preparazione di una soluzione standard di emoglobina con concentrazione pari a 10 mg/mL in *Drabkin's Solution* (1 vial di *Drabkin's Reagent* in 1 L di acqua distillata addizionato di 0.5 mL di *Brij-35 Solution* 30%). Con questa soluzione madre sono stati preparati sette standard di cianometemoglobina diluiti con *Drabkin's Solution* a concentrazione nota in un intervallo compreso tra 0 mg/mL e 10 mg/mL (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 e 10.0 mg/mL). L'assorbanza degli standard è stata letta a 540 nm ed è stata ricavata una retta con i valori di assorbanza contro la concentrazione di cianometemoglobina (mg/mL). Da questa sono state calcolate le concentrazioni a partire dai valori di assorbanza dei campioni letti a 540 nm. I risultati, media di almeno 3 animali, sono stati espressi come mg/mL di emoglobina. L'analisi statistica è stata effettuata con il *t*-test di Student.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Marzaro, G.; Guiotto, A.; Pastorini, G.; Chilin, A. A novel approach to quinazolin-4(3H)-one via quinazoline oxidation: an improved synthesis of 4-anilinoquinazolines. *Tetrahedron* **2010**, 66, 962-968.
2. Bos, M.; Mendelsohn, J.; Kim, Y. M.; Albanell, J.; Fry, D. W.; Baselga, J. PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin Cancer Res* **1997**, 3, 2099-106.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, 646-74.
4. Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, 411, 355-65.
5. Mareel, M.; Leroy, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **2003**, 83, 337-76.
6. Bennisroune, A.; Gardin, A.; Aunis, D.; Cremel, G.; Hubert, P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **2004**, 50, 23-38.
7. Croce, C. M. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **2008**, 358, 502-11.
8. Johnson, L. N. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys* **2009**, 42, 1-40.
9. Arora, A.; Scholar, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 315, 971-9.
10. Tannock, I. F.; Hill, R. P.; Bristow, R. G.; Harrington, L. The Basic Science of Oncology. In Fourth Edition ed.; The McGraw-Hill Companies: 2005.
11. Mitsos, S.; Katsanos, K.; Koletsis, E.; Kagadis, G. C.; Anastasiou, N.; Diamantopoulos, A.; Karnabatidis, D.; Dougenis, D. Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials. *Angiogenesis* **2011**.
12. Milkiewicz, M.; Ispanovic, E.; Doyle, J. L.; Haas, T. L. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, 38, 333-57.
13. Conway, E. M.; Collen, D.; Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **2001**, 49, 507-21.
14. Roodink, I.; Leenders, W. P. Targeted therapies of cancer: angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett* **2010**, 299, 1-10.
15. Neal, C. P.; Berry, D. P. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. *Surgery* **2006**, - 24, - 125.
16. Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, 407, 249-57.

17. Tugues, S.; Koch, S.; Gualandi, L.; Li, X.; Claesson-Welsh, L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med* **2011**, *32*, 88-111.
18. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. *Biologia Cellulare* 2nd Edition. In Masson, E., Ed. 2008.
19. Fry, D. W. Site-directed irreversible inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases as novel chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Drug Des* **2000**, *15*, 3-16.
20. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry Fourth Edition*. Oxford University Press: 2009; p 551-563.
21. Roskoski, R., Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *319*, 1-11.
22. Saito, Y. D.; Jensen, A. R.; Salgia, R.; Posadas, E. M. Fyn: a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer* **116**, 1629-37.
23. Mendelsohn, J.; Howley, P.; Israel, M. *The Molecular Basis of Cancer (Third Edition)*. Elsevier: 2008.
24. Elferink, L. A.; Resto, V. A. Receptor-tyrosine-kinase-targeted therapies for head and neck cancer. *J Signal Transduct* **2011**, 982879.
25. Wesche, J.; Haglund, K.; Haugsten, E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* **2011**, *437*, 199-213.
26. Porter, A. C.; Vaillancourt, R. R. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* **1998**, *17*, 1343-52.
27. Lurje, G.; Lenz, H. J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **2009**, *77*, 400-10.
28. Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**, *141*, 1117-34.
29. Lammerts van Bueren, J. J.; Bleeker, W. K.; Brannstrom, A.; von Euler, A.; Jansson, M.; Peipp, M.; Schneider-Merck, T.; Valerius, T.; van de Winkel, J. G.; Parren, P. W. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 6109-14.
30. Olayioye, M. A.; Neve, R. M.; Lane, H. A.; Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **2000**, *19*, 3159-67.
31. Zandi, R.; Larsen, A. B.; Andersen, P.; Stockhausen, M. T.; Poulsen, H. S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* **2007**, *19*, 2013-23.
32. Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **2005**, *69* Suppl 3, 4-10.
33. Tugues, S.; Koch, S.; Gualandi, L.; Li, X.; Claesson-Welsh, L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med* **2011**, *32*, 88-111.

34. Bremnes, R. M.; Camps, C.; Sirera, R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* **2006**, *51*, 143-58.
35. Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* **2007**, *19*, 2003-12.
36. Eswarakumar, V. P.; Lax, I.; Schlessinger, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **2005**, *16*, 139-49.
37. McDermott, U.; Ames, R. Y.; Iafrate, A. J.; Maheswaran, S.; Stubbs, H.; Greninger, P.; McCutcheon, K.; Milano, R.; Tam, A.; Lee, D. Y.; Lucien, L.; Brannigan, B. W.; Ulkus, L. E.; Ma, X. J.; Erlander, M. G.; Haber, D. A.; Sharma, S. V.; Settleman, J. Ligand-dependent platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha activation sensitizes rare lung cancer and sarcoma cells to PDGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* **2009**, *69*, 3937-46.
38. Socinski, M. A. Multitargeted receptor tyrosine kinase inhibition: an antiangiogenic strategy in non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* **37**, 611-7.
39. Hubbard, S. R.; Till, J. H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 373-98.
40. Pytel, D.; Sliwinski, T.; Poplawski, T.; Ferriola, D.; Majsterek, I. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **2009**, *9*, 66-76.
41. Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* **2010**, *223*, 14-26.
42. Wheeler, D. L.; Iida, M.; Dunn, E. F. The role of Src in solid tumors. *Oncologist* **2009**, *14*, 667-78.
43. Garber, K. The second wave in kinase cancer drugs. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 127-30.
44. Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
45. Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Fretz, H.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P. W. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* **2002**, *93*, 79-98.
46. Petrelli, A.; Giordano, S. From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Curr Med Chem* **2008**, *15*, 422-32.
47. Zhou, W.; Hur, W.; McDermott, U.; Dutt, A.; Xian, W.; Ficarro, S. B.; Zhang, J.; Sharma, S. V.; Brugge, J.; Meyerson, M.; Settleman, J.; Gray, N. S. A structure-guided approach to creating covalent FGFR inhibitors. *Chem Biol* **2010**, *17*, 285-95.
48. Fry, D. W. Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res* **2003**, *284*, 131-9.
49. Garofalo, A.; Goossens, L.; Six, P.; Lemoine, A.; Ravez, S.; Farce, A.; Depreux, P. Impact of aryloxy-linked quinazolines: a novel series of selective VEGFR-2 receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 2106-12.

50. Scagliotti, G.; Govindan, R. Targeting angiogenesis with multitargeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncologist* **2010**, *15*, 436-46.
51. Riely, G. J. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **2008**, *3*, S146-9.
52. Takeuchi, K.; Ito, F. EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. *Febs J* **2009**, *277*, 316-26.
53. Kluter, S.; Simard, J. R.; Rode, H. B.; Grutter, C.; Pawar, V.; Raaijmakers, H. C.; Barf, T. A.; Rabiller, M.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance. *Chembiochem* **2010**, *11*, 2557-66.
54. Giaccone, G.; Wang, Y. Strategies for overcoming resistance to EGFR family tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* **2011**, *37*, 456-64.
55. Koyama, Y.; Barrett, T.; Hama, Y.; Ravizzini, G.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. In vivo molecular imaging to diagnose and subtype tumors through receptor-targeted optically labeled monoclonal antibodies. *Neoplasia* **2007**, *9*, 1021-9.
56. Chilin, A.; Conconi, M. T.; Marzaro, G.; Guiotto, A.; Urbani, L.; Tonus, F.; Parnigotto, P. Exploring epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor features: the role of fused dioxygenated rings on the quinazoline scaffold. *J Med Chem* **2007**, *50*, 1862-6.
57. Sarkar, S.; Mazumdar, A.; Dash, R.; Sarkar, D.; Fisher, P. B.; Mandal, M. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3-K and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* **2010**, *9*, 592-603.
58. Oksvold, M. P.; Skarpen, E.; Lindeman, B.; Roos, N.; Huitfeldt, H. S. Immunocytochemical localization of Shc and activated EGF receptor in early endosomes after EGF stimulation of HeLa cells. *J Histochem Cytochem* **2000**, *48*, 21-33.
59. Fabbro, D.; Garcia-Echeverria, C. Targeting protein kinases in cancer therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2002**, *5*, 701-12.
60. Baselga, J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* **2006**, *312*, 1175-8.
61. Jucker, M.; Schiffer, C. A.; Feldman, R. A. A tyrosine-phosphorylated protein of 140 kD is constitutively associated with the phosphotyrosine binding domain of Shc and the SH3 domains of Grb2 in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **1997**, *89*, 2024-35.
62. Naumova, E.; Ubezio, P.; Garofalo, A.; Borsotti, P.; Cassis, L.; Riccardi, E.; Scanziani, E.; Eccles, S. A.; Bani, M. R.; Giavazzi, R. The vascular targeting property of paclitaxel is enhanced by SU6668, a receptor tyrosine kinase inhibitor, causing apoptosis of endothelial cells and inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 1839-49.
63. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* **1986**, *89*, 271-7.

64. Wemme, H.; Pfeifer, S.; Heck, R.; Muller-Quernheim, J. Measurement of lymphocyte proliferation: critical analysis of radioactive and photometric methods. *Immunobiology* **1992**, 185, 78-89.
65. Folkman, J.; Haudenschild, C. Angiogenesis in vitro. *Nature* **1980**, 288, 551-6.
66. Maciag, T.; Kadish, J.; Wilkins, L.; Stemerman, M. B.; Weinstein, R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* **1982**, 94, 511-20.
67. Madri, J. A.; Williams, S. K. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol* **1983**, 97, 153-65.
68. Grant, D. S.; Kleinman, H. K.; Leblond, C. P.; Inoue, S.; Chung, A. E.; Martin, G. R. The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. *Am J Anat* **1985**, 174, 387-98.
69. Hay, E. D. Extracellular matrix. *J Cell Biol* **1981**, 91, 205s-223s.
70. Kleinman, H. K.; Cannon, F. B.; Laurie, G. W.; Hassell, J. R.; Aumailley, M.; Terranova, V. P.; Martin, G. R.; DuBois-Dalcq, M. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* **1985**, 27, 317-25.
71. Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* **2001**, 61, 253-70.
72. Norrby, K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* **2006**, 10, 588-612.
73. Plunkett, M. L.; Hailey, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab Invest* **1990**, 62, 510-7.
74. Dellian, M.; Witwer, B. P.; Salehi, H. A.; Yuan, F.; Jain, R. K. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol* **1996**, 149, 59-71.
75. Akhtar, N.; Dickerson, E. B.; Auerbach, R. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* **2002**, 5, 75-80.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la prof.ssa Conconi e il prof. Castagliuolo, la dott.ssa Brun e la dott.ssa Zanusso per la collaborazione nei saggi di valutazione biologica dei derivati studiati.