UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Sintesi di derivati purinici come potenziali inibitori di Bcr-Abl nel trattamento della leucemia mieloide cronica

Relatore:

Prof.ssa Anna Carbone

Candidata:

Giordana De Agostini

Anno accademico 2023-2024

SOMMARIO

ABSTRACT - ITALIANO 1
ABSTRACT - ENGLISH 2
1. INTRODUZIONE 3
1.1. Leucemie 3
1.1.1. Origine e classificazione 3
1.1.2. Forme leucemiche più comuni 5
1.1.3. Cause 6
1.2. LMC 8
1.3. Bcr-Abl nella LMC 9
1.3.1. Struttura del cromosoma Philadelphia 9
1.3.2. Struttura e attivazione della proteina Bcr-Abl 11
1.3.3. Pathways di segnalazione correlati all'attivazione di Bcr-Abl 15
1.4. Bcr-Abl come target terapeutico 18
1.4.1. Forme resistenti di LMC 19
1.5. Inibitori di Bcr-Abl utilizzati nella terapia della LMC 21
1.5.1. Inibitori di prima generazione: imatinib 23
1.5.2. Inibitori di seconda generazione: dasatinib, nilotinib, bosutinib 26
1.5.3. Inibitori di terza generazione: ponatinib 29
1.5.4. Inibitori allosterici: asciminib 30
1.6. Inibitori di Bcr-Abl con scaffold purinico 32
2. SCOPO DELLA TESI 40
3. RISULTATI E DISCUSSIONE 46
4. CONCLUSIONI 51
5. PARTE SPERIMENTALE 54
6. BIBLIOGRAFIA 60

ABSTRACT - ITALIANO

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una forma di leucemia che rappresenta circa il 15% di questi tumori. È caratterizzata dalla presenza dell'oncogene di fusione *Bcr-Abl* (presente nel 95% dei pazienti malati) che codifica per la rispettiva tirosin-chinasi Bcr-Abl. Quest'ultima risulta costitutivamente espressa dando così origine alla proliferazione incontrollata delle cellule del sangue ed all'attivazione di diversi pathways di segnalazione che concorrono allo sviluppo del tumore. Per questo motivo Bcr-Abl è considerato un importante target farmacologico nella lotta contro la LMC. Dopo l'imatinib, il primo inibitore ATP-competitivo di Abl approvato nel 2001, molti altri inibitori entrarono in terapia per la cura della LMC. Nonostante gli ottimi risultati ottenuti, è di continuo interesse la ricerca verso nuove molecole attive soprattutto a causa di diversi fenomeni di resistenza comparsi nel corso del trattamento, tra le quali particolarmente critica risulta essere la mutazione T315I, che rappresenta il 25% delle mutazioni clinicamente più rilevanti. Partendo da una libreria di composti precedentemente sintetizzati a *scaffold* pirazolo[3,4-*d*]pirimidinico dotati di notevole attività inibitoria nei confronti delle tirosin-chinasi Abl e/o Src ed antiproliferativa su diverse linee cellulari tumorali umane, durante la mia tesi sperimentale ho partecipato ad un progetto di ricerca volto alla sintesi di nuovi potenziali inibitori di Abl caratterizzati da un core purinico variamente sostituito in posizione C-6 ed N-9. I saggi di inibizione nei confronti di Abl sono attualmente in corso, ma sono stati conclusi studi di docking mirati all'ottenimento di informazioni sul *binding mode* delle nuove molecole sintetizzate. Lo studio di docking ha consentito di ottenere informazioni strutturali importanti per l'ottimizzazione dell'interazione con il target, allo scopo di indirizzare gli studi futuri verso potenziali inibitori più attivi.

ABSTRACT - ENGLISH

Chronic myeloid leukemia (CML) is a tumoral pathology representing around 15% of all leukemic-type cancers. It is typically distinguished by the presence of the fusion oncogene *Bcr-Abl,* evident in 95% of relevant patients. This oncogene encodes the corresponding Bcr-Abl tyrosine kinase, resulting in intrinsic expression, and consequently produces an uncontrolled growth of the blood cells and the activation of several triggering pathways that contribute to cancer evolution. For the above reasons, Bcr-Abl is considered a significant pharmacological target in the treatment of CML. Since the 2001 approval of imatinib, the first ATP-competitive inhibitor of tyrosine-kinase Abl, a considerable number of similar drugs were approved in therapy for treatment of CML. Regardless of the remarkable outcomes obtained, researchers are continuously evolving towards the discover of new active molecules, mainly because of several risks of resistance discovered during treatment; among them, the mutation T315I seems to be particularly critical and represents 25% of the most relevant clinical transformation. Starting from a library of compounds previously synthetized with a pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinic *scaffold*, which showed substantial inhibiting capability towards Abl and/or Src kinases in different lines of human tumoral cells, I have, during my experimental thesis, participated in a research project aimed at synthesizing new potential purinic inhibitors of Abl. In detail, these new compounds are substituted in position N-9 and C-6. Inhibition assays towards Abl are currently in progress, but, in parallel, docking studies aimed at obtaining information about the *binding mode* of the new molecules have been completed. Docking studies allowed structural information valuable for optimizing the interaction with the target to be derived, with the final goal of targeting future studies in the direction of potentially more active inhibitors.

1. INTRODUZIONE

1.1. Leucemie

1.1.1. Origine e classificazione

Il termine "leucemie" fu descritto per la prima volta nel diciannovesimo secolo. Le leucemie rappresentano un vario gruppo di tumori che colpiscono le cellule del sangue. Le cellule ematiche possono essere divise in due classi principali: le linfoidi (cellule T, B e NK) e le mieloidi (granulociti, monociti, eritrociti e megacariociti). Queste cellule hanno una durata di vita limitata, che va da diverse ore, come nel caso dei granulociti, a diverse settimane, come nel caso dei globuli rossi. Alcune cellule, come i linfociti T della memoria, hanno invece una vita che può durare diversi anni. È quindi necessario che vengano prodotte in vasta quantità e periodicamente [1]. Tutte queste cellule derivano da una linea cellulare staminale pluripotente comune (HSC) prodotta a livello del midollo osseo. Il processo di produzione delle cellule del sangue è chiamato ematopoiesi: a partire dalle cellule staminali si sviluppano e si differenziano le quattro linee cellulari del sangue, ovvero le cellule mieloidi, linfoidi, eritroidi e le piastrine (**Figura 1**).

Nei soggetti colpiti da leucemia la proliferazione risulta essere incontrollata e questo comporta un'alterazione nel normale sviluppo delle cellule del sangue [2,3]. Queste cellule maligne sono generalmente immature, anormali e scarsamente differenziate e vengono definite blasti (linfoblasti o mieloblasti). Se queste linee cellulari subiscono un'espansione tale da interferire con il normale sviluppo delle cellule ematopoietiche portano a sintomi clinici, sviluppando perciò forme tumorali [4].

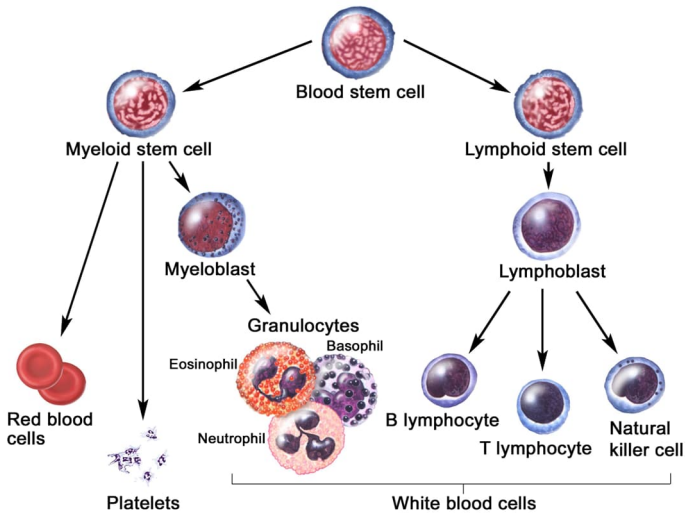


Figura 1. *Rappresentazione grafica della maturazione delle linee cellulari linfoidi e mieloidi a partire dalla cellula staminale ematopoietica progenitrice [5].*

Queste forme tumorali possono essere classificate in base alla velocità di progressione della malattia ed in base alla tipologia di cellule coinvolte [6]. Nel primo caso, si fa riferimento alla distinzione tra malattia acuta e malattia cronica: la leucemia acuta presenta i sintomi in maniera precoce a causa di un'elevata e rapida proliferazione delle cellule tumorali, mentre nella leucemia cronica si verifica un incremento della proliferazione cellulare più lento. Pertanto, i sintomi non si presentano nelle fasi iniziali e si assiste ad un declino della malattia meno rapido. Se la malattia avanza, però, anche le forme croniche possono diventare aggressive. Le cellule blastiche immature generalmente predominano nella leucemia acuta, mentre nelle forme croniche sono presenti un numero maggiore di cellule mature non blastiche.

In base alle cellule coinvolte, si riconoscono le leucemie linfoidi e le leucemie mieloidi [7]. Le prime colpiscono le cellule linfoidi che sono coinvolte nella produzione di linfociti. Nel secondo caso, le cellule compromesse sono le cellule mieloidi che sono responsabili della generazione delle altre linee cellulari non linfocitarie [6].

1.1.2. Forme leucemiche più comuni

Si distinguono vari tipi di leucemie, ma tra queste le quattro forme più comuni sono rappresentate dalla leucemia linfoblastica acuta (LLA), leucemia linfocitica cronica (LLC), leucemia mieloide acuta (LMA) e la leucemia mieloide cronica (LMC).
Generalmente, le leucemie acute insorgono più comunemente in età infantile. Esse rappresentano infatti oltre il 25% di tutti i tumori nei bambini e, di conseguenza, le neoplasie pediatriche più frequenti. In particolare, la LLA (che colpisce le cellule B e T) rappresenta il 75% di tutte le leucemie che colpiscono bambini fino all'età di 14 anni. Al contrario, negli adulti la maggior parte delle leucemie acute è di forma mieloide (con una percentuale del 70-75%) [2]. A differenza della LLA, la LMA è la leucemia acuta più comune negli adulti ed è caratterizzata dalla presenza di blasti mieloidi superiori al 20%. Per questo motivo, è uno dei cancri più aggressivi, caratterizzato da prognosi infausta e decorso molto rapido [4]. Queste due leucemie prevedono l'utilizzo di chemioterapia ad alte dosi, oppure il ricorso a trapianto [8].

Le leucemie croniche sono invece neoplasie che si sviluppano con un decorso più lento. Questo permette di avere terapie mirate al controllo della progressione, senza necessariamente avere un'eradicazione del tumore. La LLC è dovuta alla proliferazione di cellule linfoidi monoclonali, in genere del linfocita B. La maggior parte degli individui sviluppa la malattia tra 60 e 70 anni [4] e solo il 10-15% dei pazienti sviluppa la malattia sotto i 50 anni. Alcuni pazienti dopo diagnosi conducono una vita normale, mentre altri muoiono entro cinque anni [9]. Nella maggior parte dei casi è definita una malattia indolente e non tutti i pazienti a cui viene diagnosticata la malattia avranno bisogno di iniziare una terapia fino a che non si ha la manifestazione della sintomatologia.
Infine, la LMC (trattata più in dettaglio nel paragrafo 1.2.) provoca la comparsa di una popolazione di granulociti disfunzionali, prevalentemente neutrofili, basofili ed eosinofili [4]. Essa rappresenta il 15-20% di tutti i casi di leucemia.
Studi AIRTUM evidenziano che la forma più frequente di leucemia cronica è quella LLC a cellule B che rappresenta il 30% di tutte le leucemie dell'età avanzata, mentre la LMC ha un'incidenza più bassa [2].

1.1.3. Cause

Per quanto riguarda i fattori scatenanti la malattia, essi risultano tutt'oggi poco conosciuti e chiari; infatti, solo pochi tipi di leucemia possono essere attribuiti a fattori identificati con certezza. Sono stati evidenziati dei legami tra la comparsa della malattia e l'esposizione a diverse sostanze cancerogene, ma anche in seguito a dosi massicce di radiazioni. Gran parte delle leucemie, però, deriva da mutazioni a carico del DNA [2]. Nel dettaglio, i fattori che possono essere correlati a queste forme tumorali, vengono raggruppati in tre categorie: cause di familiarità e cause genetiche, fattori ambientali e fattori medici o correlati a terapie (**Figura 2**) [10].

FATTORI DI RISCHIO DELLE LEUCEMIE	
Fattori familiari e genetici	• Malattie ereditarie (per esempio sindrome di Down) • Altre anomalie cromosomiche (per esempio cromosoma Philadelphia)
Fattori ambientali	• Radiazioni ionizzanti/non-ionizzanti • Esposizioni occupazionali (per esempio industria conciaria o tipografica) • Fumo • Pesticidi • Agenti chimici (per esempio benzene) • Altri (per esempio dieta)
Fattori medici/correlati a terapie	• Radioterapia • Radiologia diagnostica • Chemioterapia • Farmaci (per esempio Cloramfenicolo) • Virus (per esempio HTLV o Herpesvirus)

Figura 2. *Fattori di rischio correlati all'insorgenza di leucemie [10].*

Tra le diverse cause descritte, quelle genetiche giocano il ruolo più rilevante. Tra le aberrazioni cromosomiche, che siano innate o acquisite, sicuramente una delle più studiate è quella che riguarda il cromosoma Philadelphia (paragrafo 1.3.1.), in associazione con l'insorgenza della LMC. Tuttavia, sembra che non sia la sola presenza di quest'anomalia cromosomica a portare alla progressione della malattia nella sua fase acuta. Si suppone che altre malattie genetiche come la sindrome di Down, la sindrome di Klinefelter e l'atassia teleangectasia possano portare ad un rischio di insorgenza della leucemia, soprattutto in età infantile, dove si manifestano forme acute [11]. Per esempio,

è stato stimato che bambini affetti da trisomia 21 abbiano da dieci a trenta volte più possibilità di sviluppare leucemie rispetto a un bambino sano. Al contempo, il 3% dei bambini a cui è stata diagnosticata la leucemia, è anche affetto da trisomia 21 [12]. Sono stati effettuati studi su famiglie che sembrano supportare geneticamente l'ipotesi di un aumento del rischio dell'insorgenza di leucemie tra i membri della stessa famiglia. Nonostante ciò, le malattie ereditarie possono spiegare solo un esiguo numero di casi di leucemia.

Relativamente ai fattori ambientali e occupazionali, si pensa che l'esposizione al benzene, derivante per esempio dal fumo di sigaretta o nell'industria conciaria e petrolchimica, sia collegata a una maggior incidenza di leucemia (soprattutto LMA) [13]. Circa il contesto di esposizione occupazionale, altre sostanze chimiche come butadiene e stirene, particolarmente utilizzate nel settore dei polimeri e delle plastiche, sono state associate all'insorgenza di queste neoplasie. Anche fattori quale l'esposizione a pesticidi è stato analizzato in relazione all'associazione con la malattia, anche se non sembra esserci un legame particolarmente forte tra di essi. Infine, l'esposizione del paziente a radiazioni ionizzanti si pensa possa costituire un fattore di rischio rilevante. In generale bisogna considerare che i dati a disposizione dagli studi di correlazione tra fattori ambientali ed insorgenza di leucemia sono spesso inconsistenti, ne consegue che risulta difficile fare delle stime precise.

L'ultima categoria descritta in **Figura 2** prende in considerazione i fattori medici e relativi alle terapie: è stata appunto investigata la connessione tra l'assunzione di farmaci chemioterapici e la radioterapia con l'insorgenza di diverse forme di leucemia che viene definita in questo caso secondaria. Particolare attenzione viene posta al virus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1); esso è l'unico retrovirus oncogenico conosciuto e causa una particolare forma tumorale definita ATL (adult T-cell leukemia/limphoma). Tuttavia, i meccanismi molecolari e oncogenici innescati da questo tipo di virus non sono completamente chiariti [14].

1.2. LMC

La LMC è una malattia mieloproliferativa, che rappresenta il 15% circa di tutti i casi di leucemie. In Italia colpisce circa 1-2 persone ogni 100000 [15,16]. Di solito la malattia si presenta in età adulta, essendo diagnosticata in media a circa 65 anni. L'evoluzione della malattia viene divisa in tre fasi, definite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, in base alla quantità di blasti (cellule immature) presenti a livello del sangue e del midollo osseo.

La prima fase, definita fase cronica, è caratterizzata da iperplasia e vengono prodotte massivamente cellule mieloidi che rispondono ai fattori di crescita. Come schematizzato in **Figura 3**, le cellule mieloidi vengono prodotte in quantità maggiori a discapito delle cellule linfoidi. La percentuale di blasti risulta inferiore al 10%. Questa fase può avere una durata anche molto lunga e nella maggior parte dei casi il paziente riceve la diagnosi durante questo stadio in cui si verifica una risposta alla terapia più efficace.

Se il tumore non è controllato si può entrare nella seconda fase, detta accelerata, in cui la proliferazione è in continuo accrescimento e la percentuale di blasti aumenta fino al 20%. In questo stadio della patologia la risposta ai farmaci è minore e si ha una sopravvivenza media di circa 1-2 anni [17]. Lo sviluppo del tumore tende ad aggravarsi, passando velocemente alla fase successiva, ossia la fase blastica, in cui la percentuale di blasti supera il 20%. Infatti, come illustrato in **Figura 3**, la maturazione delle cellule subisce un arresto. Inoltre, nelle cellule staminali tumorali si accumulano un gran numero di aberrazioni genetiche di vario tipo e le cellule blastiche escono dal midollo osseo per accumularsi nel sangue periferico. In questo stadio finale si può avere la presenza di un fenotipo cellulare linfoblastico (25%), mieloblastico (50%) oppure cellule indifferenziate/con entrambi i fenotipi cellulari (25%) (**Figura 3)**. La mancanza della differenziazione cellulare ed una massiccia infiltrazione da parte di blasti immaturi, causa la mortalità dei pazienti per infezioni, trombosi o anemie [18]. La leucemia diventa più aggressiva e di conseguenza la risposta ai farmaci è meno soddisfacente. In questo caso la sopravvivenza del paziente è di circa 3-6 mesi [17].

Nella maggior parte dei malati la neoplasia viene riconosciuta nella fase cronica. A questo stadio il soggetto è perlopiù asintomatico o può riferire lievi sintomi correlati al tumore, quali anemia, fatica generale, perdita di peso dovuta allo scarso appetito, sudorazione e splenomegalia. Quando la malattia progredisce nelle fasi avanzate i sintomi diventano

sensibilmente peggiori a causa del progressivo malfunzionamento del midollo osseo. Alcuni di questi sintomi sono: febbre, sudorazione eccessiva, continua perdita di peso, dolori addominali e all'apparato osseo, sanguinamenti, anemia e splenomegalia in continuo peggioramento [19].

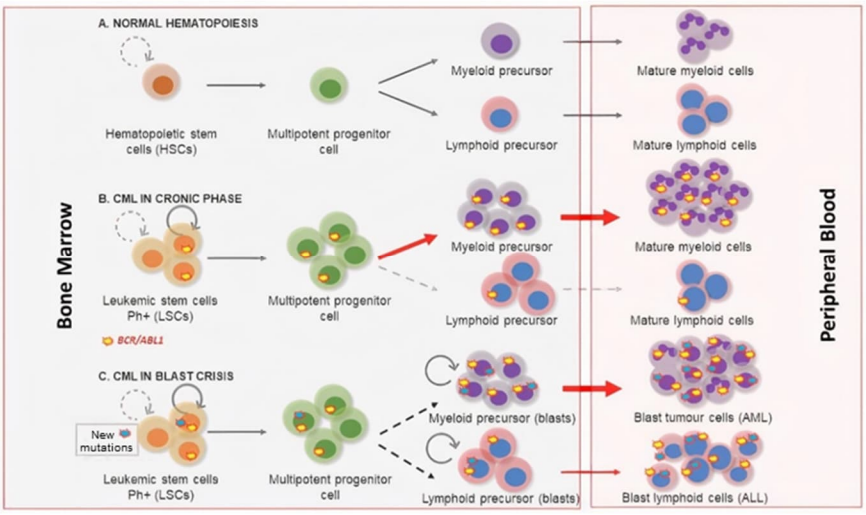


Figura 3. *Rappresentazione schematica di un processo di ematopoiesi nelle cellule normali (A), nelle cellule tumorali nella fase cronica (B) e nella fase blastica (C) [18].*

1.3. Bcr-Abl nella LMC

1.3.1. Struttura del cromosoma Philadelphia

La LMC è caratterizzata da un'aberrazione cromosomica causata dalla fusione dei geni *Bcr* e *Abl* [20]. In particolare, nell'uomo la proteina Bcr (Break-point Cluster Region) è codificata dal corrispondente gene *Bcr* localizzato sul cromosoma 22. Il protoncogene *c-Abl*, che codifica per la proteina tirosin-chinasica Abl (Ableson leukemia virus), si trova sul cromosoma 9.

La proteina Bcr si pensa possa possedere attività GTPasica agendo da interruttore molecolare per altre proteine chinasi, anche se il suo ruolo non è ancora ben noto [21,22]. La proteina Abl si attiva in risposta a fattori di crescita, citochine, danni al DNA, stress ossidativo ed altri segnali, promuovendo la proliferazione, il differenziamento cellulare o la morte cellulare [23]. La traslocazione del gene *Bcr* sul cromosoma 9, in corrispondenza

del gene *Abl*, genera un accorciamento del cromosoma 22, definito "cromosoma Philadelphia" ed un allungamento del cromosoma 9 **(Figura 4**) [20].

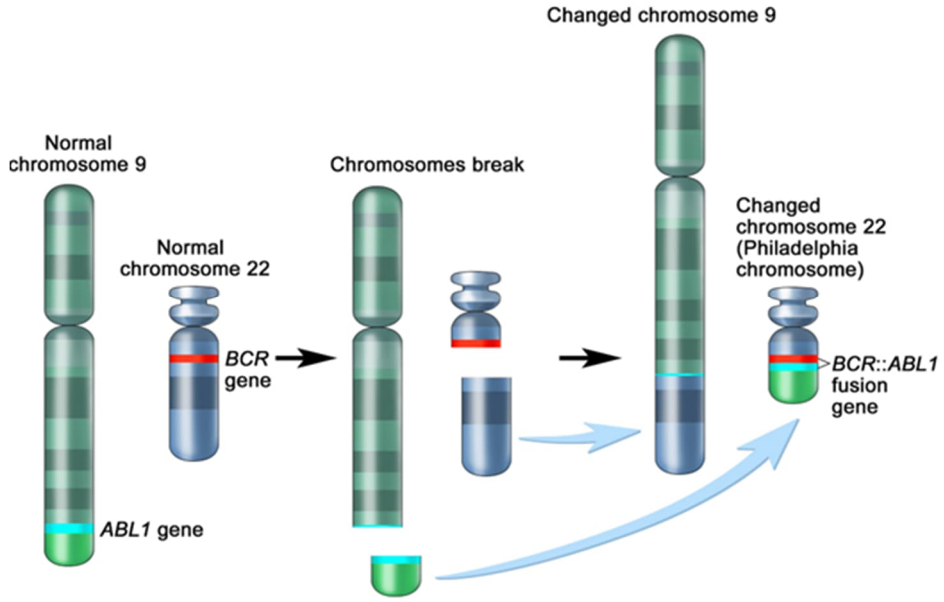


Figura 4. *Rappresentazione grafica della traslocazione che porta alla formazione del cromosoma Philadelphia [24].*

Questa traslocazione, scoperta da Rowley ed i suoi collaboratori nel 1970 [25], porta alla formazione dell'oncogene *Bcr-Abl*, codificante per la corrispondente proteina chimerica espressa costitutivamente ed avente attività tirosin-chinasica.

Più nel dettaglio, questo fenomeno è caratterizzato dalla sostituzione dell'esone iniziale codificante per la proteina Abl con la sequenza codificante Bcr. A seconda del sito di break-point nel gene *Bcr*, il peso della proteina di fusione può variare da 185-190 kDa a 230 kDa. Tutte le isoforme contengono quindi la stessa porzione della proteina Abl e differiscono per la lunghezza di Bcr all'estremità *N*-terminale (**Figura 5**) [26].

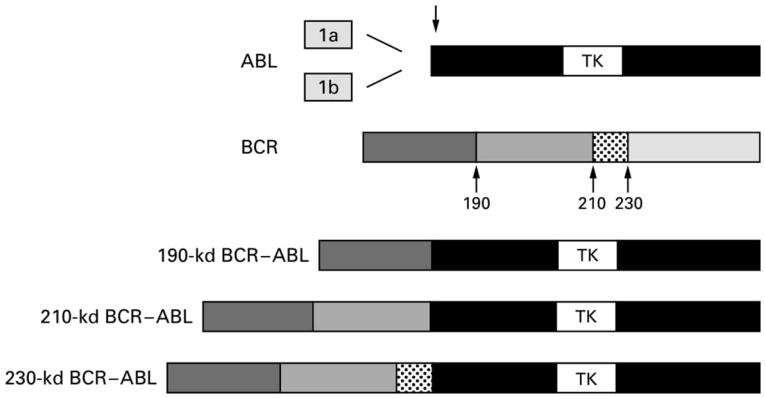


Figura 5. *Rappresentazione schematica delle proteine di fusione Bcr-Abl. Nella porzione raffigurante Bcr, le frecce indicano i punti di break-point diversi. TK indica il dominio tirosin-chinasico di Abl [26].*

L'isoforma prevalente nelle cellule affette da LMC è quella caratterizzata da peso molecolare di 210 kDa. Al contrario, l'isoforma 185-190 kDa caratterizza le cellule affette da LMA [27].

1.3.2. Struttura e attivazione della proteina Bcr-Abl

La proteina di fusione Bcr-Abl presenta la struttura schematizzata in **Figura 6**. Innanzitutto, nella porzione *N*-terminale troviamo un'importante sequenza detta CC (coiled-coil domain) derivante dalla proteina Bcr, che consente la dimerizzazione/tetramerizzazione e la successiva auto-fosforilazione, favorendo in questo modo l'amplificazione dei segnali molecolari [18]. Sempre nella sequenza di Bcr troviamo il dominio Ser/Thr chinasico, dove evidenziamo la presenza di un amminoacido fondamentale per l'attività della proteina: Tyr177 [28]. Infine, vi è il dominio Rho/GEF (Rho guanine-nucleotide exchange factor) che svolge anch'esso un ruolo importante per l'attività della proteina.

La proteina presenta quindi i domini SH3 e SH2, il linker SH2, il dominio SH1 e la regione *C*-terminale. Quest'ultima contiene inoltre la sequenza NLS (Nuclear Localization Signal) e la sequenza ABD (Actin-binding domain); quest'ultima risulta particolarmente importante per la determinazione della distribuzione intracellulare di Bcr-Abl e per il suo reclutamento nel citoscheletro. Queste ultime due sequenze sono sempre

derivanti da Abl (**Figura 6**). Il dominio SH1 è definito dominio catalitico ed è fondamentale per la funzione chinasica della proteina chimerica, mentre SH2 e SH3 mediano interazioni con altre proteine [18]. I domini SH1, SH2 e SH3 sono generalmente conservati nelle varie chinasi; in particolare, Abl presenta un'elevata similarità con la proteina Src, anch'essa coinvolta in diverse forme tumorali. Le due differiscono soprattutto al dominio *C*-terminale, mostrando invece sequenze del dominio chinasico SH1 aventi un'omologia del 68% [29].

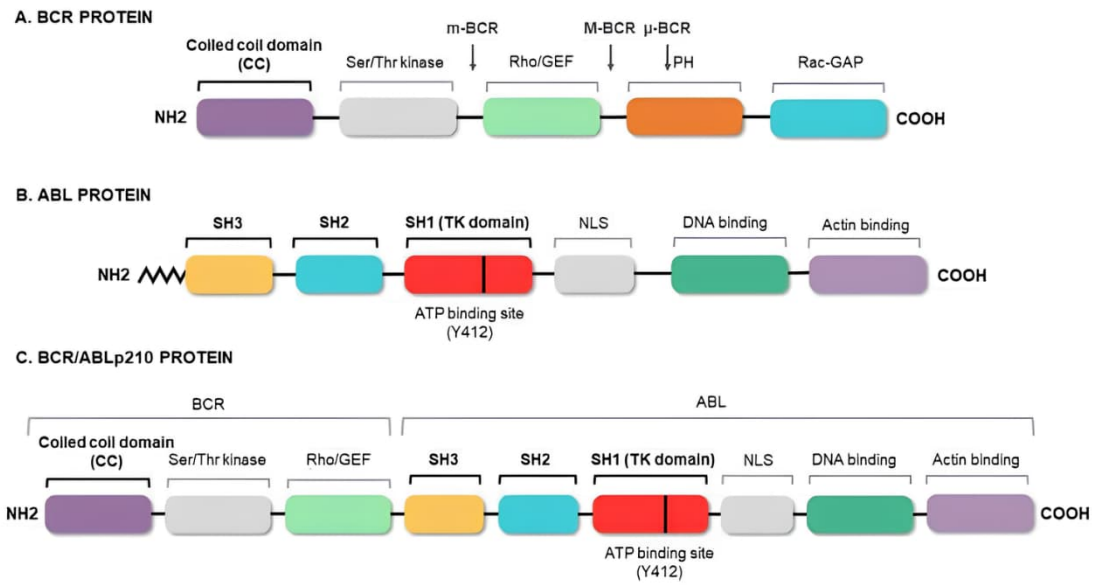


***Figura 6**. Domini della proteina Bcr-Abl. In grassetto sono evidenziati SH1 (il dominio tirosin-chinasico), SH2 e SH3 (i domini regolatori) [18].*

In dettaglio, il dominio SH1 è caratterizzato da una struttura bilobata: presenta un lobo *N*-terminale più piccolo (circa 80 amminoacidi) e un lobo *C*-terminale più grande (circa 180 amminoacidi).

La regione tra i due lobi, detta *hinge region*, contiene il sito di legame per l'ATP ed ospita molti residui amminoacidici catalitici essenziali. Il lobo *C*-terminale è coinvolto nel riconoscimento dei substrati, mentre il lobo *N*-terminale contiene la maggior parte dei residui fondamentali per la creazione della tasca di legame dell'ATP [35]. Il lobo *N*-terminale è composto da 5 β-filamenti ed un'α-elica chiamata α-C. Il lobo *C*-terminale, invece, è formato prevalentemente da α-eliche (**Figura 7B**) [36]. In particolare, l'ATP si

lega nella fessura che si forma tra i due lobi e rappresenta una zona altamente conservata nelle varie chinasi. In **Figura 7A** sono mostrate le sequenze critiche della chinasi: in corrispondenza del lobo *N*-terminale riconosciamo una sequenza coordinatrice del fosfato, definita P-loop (Phosphate-binding Loop), ricca in residui di glicina [37]. Inoltre, una lisina a valle è essenziale per il legame con l'ATP [38]. Invece, nel lobo *C*-terminale è presente un'altra sequenza importante, definita A-Loop (Activation Loop), che svolge un ruolo perlopiù regolatorio. Infatti, questa zona è soggetta alla fosforilazione di chinasi a monte del circuito di attivazione. La fosforilazione del loop di attivazione è fondamentale per indurre riarrangiamenti strutturali necessari per l'attivazione catalitica (**Figura 7A**), in particolare l'orientamento dell'elica α-C. Questa elica porta un residuo di acido glutammico fondamentale per la catalisi [37]. Inoltre, nell'A-Loop è presente una sequenza Asp-Phe-Gly altamente conservata definita DFG (**Figura 7A**). La sequenza DFG controlla l'accesso al sito attivo dell'enzima [39]. La conformazione attiva è definita da due caratteristiche strutturali fondamentali: l'orientamento della sequenza DFG verso il sito attivo (DFG-Asp-in), dove l'aspartato può coordinare l'ATP e lo ione Mg^{2+}, e la formazione di un ponte salino tra la lisina del P-Loop e il glutammato nell'elica α-C. Al contrario, la conformazione inattiva è caratterizzata dalla rotazione di 180° del motivo DFG rispetto alla conformazione attiva. Per questo motivo, l'aspartato si allontana dal sito attivo impedendo la catalisi (DFG-Asp-out) [40]. Come vedremo, la distinzione delle due conformazioni è fondamentale per definire il meccanismo d'azione di molti farmaci utilizzati in terapia, che vengono classificati anche in base a questa distinzione DFG-out e DFG-in. Grazie alla sua elevata flessibilità, il residuo P-loop si può interporre tra il β-fosfato e il γ-fosfato dell'ATP provocando la rottura del legame. Particolarmente essenziale è il ruolo del residuo di aspartato per il corretto posizionamento del γ-fosfato da trasferire e potrebbe essere anche necessario per stabilizzare la carica del γ-fosfato nello stato di transizione della reazione [41]. Si pensa che la sua funziona sia fondamentale anche nel rilascio del prodotto fosforilato [42].

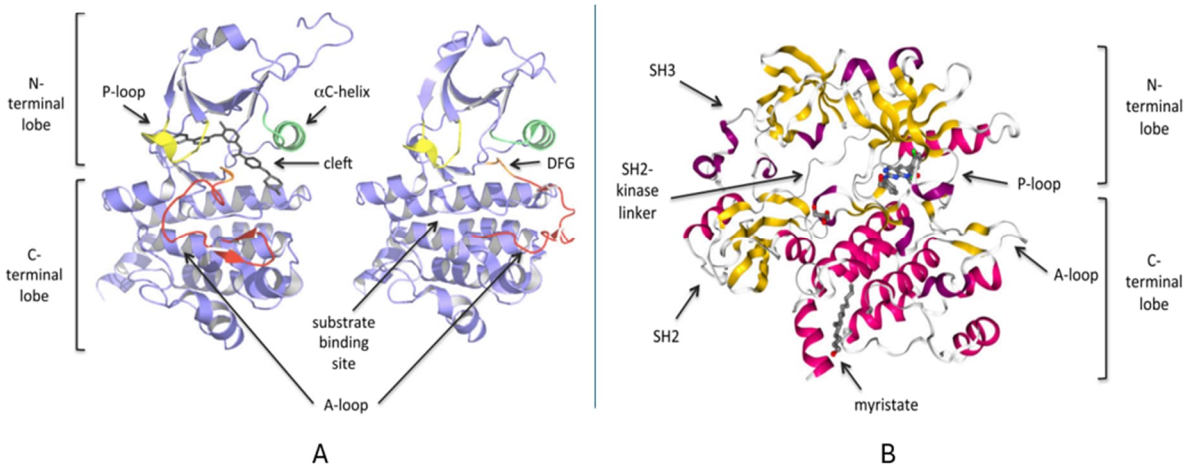


Figura 7. *Rappresentazione del dominio tirosin-chinasico di Abl. Figura **A**: il P-Loop e l'A-Loop sono evidenziati rispettivamente in giallo e in rosso. Nell'adatta conformazione attiva, l'A-Loop risulta in una forma estesa e aperta, consentendo il legame con il substrato (figura B). Al contrario, quando l'A-Loop è piegato verso l'interno è non-fosforilato e blocca il sito di legame. Il motivo DFG è inoltre evidenziato in arancione. Figura **B**: Rappresentazione di Abl con evidenziati i domini SH2 e SH3. Le α-eliche sono in magenta, mentre i β-foglietti in giallo. È infine mostrato il gruppo miristoilato necessario per l'attivazione e inattivazione di Abl [43].*

In aggiunta, nel dominio SH1 è presente un altro amminoacido che occorre mettere in evidenza: Thr315. Questo è definito amminoacido *gatekeeper,* ed è essenziale nel riconoscimento del substrato nella tasca ATPasica. Proprio per questo, mutazioni che lo coinvolgono (descritte nel paragrafo 1.4.1) risultano un ostacolo per un'efficace risposta al trattamento farmacologico [34].

In condizioni fisiologiche, la regione *N*-terminale della chinasi Abl include una porzione definita "cap" comprendente 80 aminoacidi, che risulta importante nel passaggio conformazionale nello stato attivo della chinasi [30]. Abl, infatti, si presenta in due conformazioni: quella chiusa, che corrisponde alla proteina non attiva, e quella aperta, corrispondente alla proteina attiva [31]. Il passaggio dallo stato inattivo allo stato attivo avviene in seguito alla fosforilazione di due residui di tirosina estremamente importanti (Tyr412 e Tyr245) presenti nel dominio SH1. Tale fosforilazione può avvenire per auto-

fosforilazione o è mediata dall'attività di altre tirosin-chinasi, e sembra inoltre favorita da eventi di dimerizzazione e tetramerizzazione che si verificano a monte della fosforilazione di questi residui [32]. La presenza dei due residui di tirosina fosforilati, impedisce quindi il legame del dominio SH3 sia con il lobo *N*-terminale del dominio SH1 sia con il linker SH2. In queste condizioni la proteina non riesce a ripristinare la sua conformazione chiusa e inattiva (**Figura 8**). Nell'oncoproteina Bcr-Abl la porzione *N*-terminale manca della presenza del cap, perciò questo meccanismo auto-regolatorio risulta compromesso e la proteina di fusione è costitutivamente attiva [33].

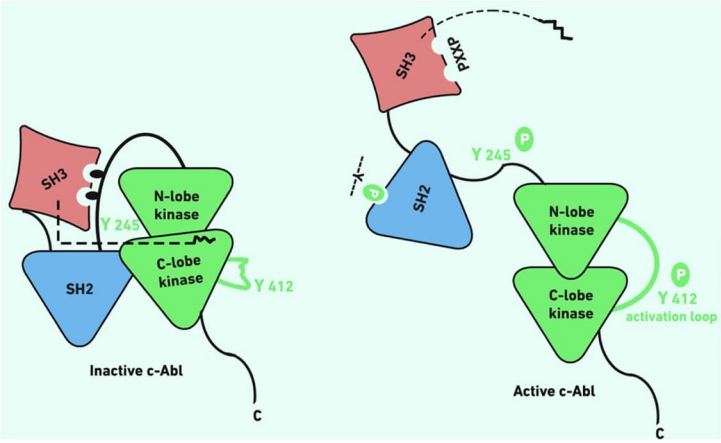


Figura 8. *Rappresentazione grafica di Abl nelle sue conformazioni chiusa (inattiva) e aperta (attiva) [20].*

1.3.3. Pathways di segnalazione correlati all'attivazione di Bcr-Abl

Nelle cellule sane l'attivazione di Abl è regolata in modo tale da permettere il corretto svolgimento delle sue funzioni; al contrario, nelle cellule tumorali Abl risulta iper-attivata in maniera costitutiva a causa della sua fusione con Bcr, causando un'errata regolazione di diversi processi cellulari chiave. La proto-oncoproteina risultante è distribuita nel nucleo ma soprattutto a livello citoplasmatico, dove partecipa alle vie di trasduzione principali coinvolte nello sviluppo di tumori.

L'attività costitutiva nel citoplasma della proteina Bcr-Abl porta, infatti, ad un'attivazione incontrollata di diverse vie di trasduzione del segnale. Tra queste, le più note sono: il trasduttore di segnale ed attivatore della trascrizione 5 (STAT5), RAS e la

fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). Uno dei meccanismi di proliferazione incontrollata delle cellule mieloidi si basa su un'anomalia nella cascata di trasduzione del segnale Janus chinasi 2 (JAK2)/STAT5 mediata [44]. Infatti, nelle cellule staminali ematopoietiche sane, STAT5 viene fosforilato dalla chinasi JAK2. STAT5, in seguito alla fosforilazione, dimerizza per traslocare nel nucleo e legarsi al suo promotore target. Al contrario, nelle cellule malate, la proteina chinasi mutata Bcr-Abl fosforila direttamente STAT5, inducendo una cascata di eventi indipendenti da JAK2 (**Figura 9**) [45].

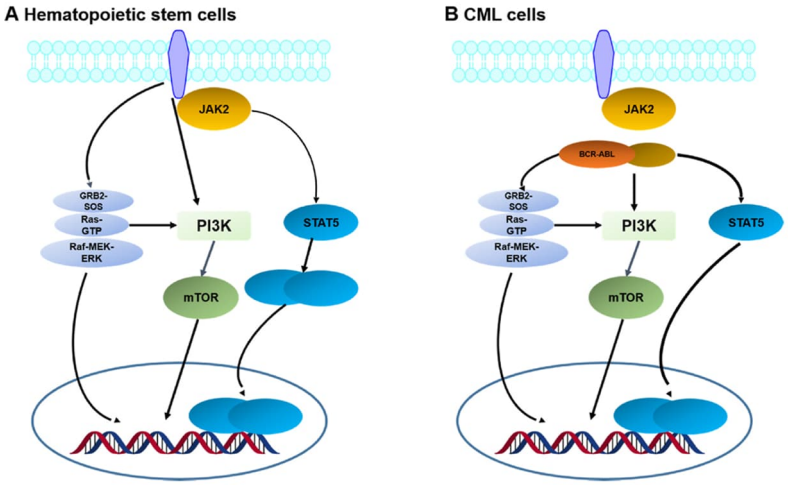


Figura 9. *Trasduzione del segnale JAK2/STAT5 in cellule staminali ematopoietiche sane (A) e in cellule tumorali (B) [44].*

Inoltre, è stato evidenziato un importante ruolo della Tyr177 sulla porzione Bcr della proteina Bcr-Abl, in relazione alla cascata di segnali che partono dalla proteina legata al recettore del fattore di crescita *2* (GRB2). La Tyr177 viene infatti fosforilata secondo i meccanismi precedentemente descritti e permette il legame ad alta affinità con GRB2. Essa, nella sua forma fosforilata, possiede un ruolo chiave nell'attivazione della cascata di segnali [46]; permette infatti un'alta affinità di legame di Bcr-Abl con la proteina citoplasmatica GRB2. Quest'ultima è responsabile da un lato del reclutamento della proteina Son of Sevenless (SOS), che attiva a cascata la segnalazione mediata da Ras [47], e dall'altro della proteina legante associata a GRB2 (GAB2), che attiva il pathway di segnalazione PI3K (**Figura 10**) [46].

A valle di SOS, la mitogen-activated protein kinase (MAPK) risulta costitutivamente attivata e ciò concorre ai meccanismi incontrollati di proliferazione cellulare. D'altra parte, l'attivazione del pathway PI3K promuove la sopravvivenza cellulare sopprimendo l'attività di fattori trascrizionali come fork head O (FOXO), essenziali per regolare il meccanismo di apoptosi. Inoltre, quest'ultimo pathway induce la proliferazione cellulare e riduce l'autofagia attraverso l'attivazione di mammalian target of rapamycin (mTOR) [48].

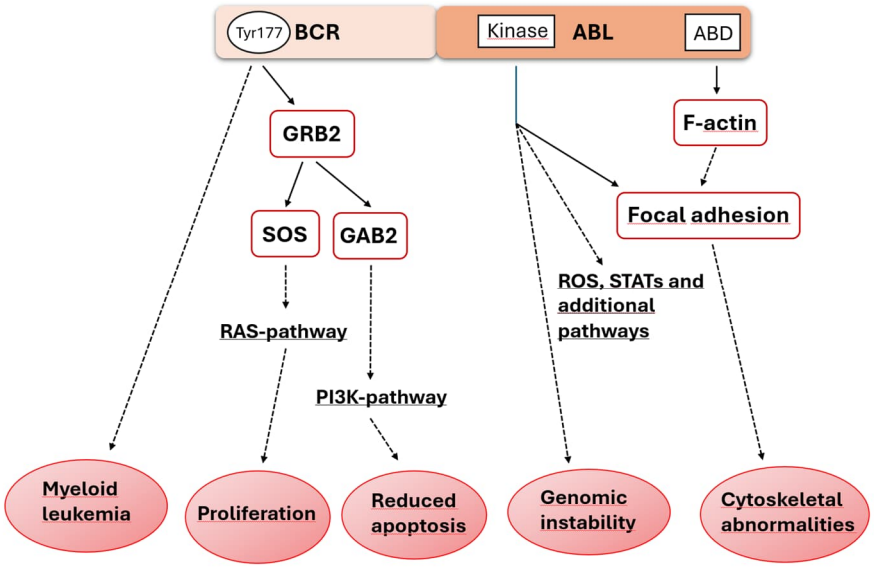


Figura 10. *Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione attivate in cellule tumorali positive per la proteina Bcr-Abl [46].*

Pertanto, le cellule staminali ematopoietiche positive alla mutazione Bcr-Abl mostrano una proliferazione incontrollata, un'azione indipendente dai fattori di crescita ed una mancata risposta a fattori promuoventi l'apoptosi [18].

1.4. Bcr-Abl come target terapeutico

Il gene di fusione *Bcr-Abl* risulta oggi un marker importante della LMC. Infatti, la presenza di questo oncogene è stata osservata nel 95% dei pazienti affetti da questa patologia e, più in generale, nel 15% dei pazienti affetti da leucemia [49]. Di conseguenza, Bcr-Abl è considerato un ideale target farmacologico per il trattamento LMC [45].
Quando la LMC fu scoperta le prime cure messe in atto furono cure di tipo palliativo [50]. Il primo esempio di farmaco risultato attivo fu l'arsenico e successivamente venne introdotta una radioterapia mirata alla milza. Furono poi introdotti nella terapia degli agenti citostatici come busulfano e idrossiurea. In particolare, l'idrossiurea mostrò minori complicazioni rispetto al busulfano e prolungò, in misura limitata, la sopravvivenza dei pazienti. Si passò da una terapia palliativa ad una terapia curativa più mirata con l'avvento del trapianto di midollo che fu introdotto alla fine degli anni Settanta. Allo stesso tempo, l'interferone alfa (IFN-α) mostrò il potenziale di indurre completamente la remissione citogenetica, soprattutto nei pazienti giovani [50].
La conoscenza specifica della proteina Bcr-Abl e dei meccanismi coinvolti nella LMC hanno permesso un grande sviluppo per quanto riguarda la terapia farmacologica e gli studi furono rivolti verso la classe di farmaci appartenenti alla categoria degli inibitori di tirosin-chinasi (TKIs). In particolare, l'introduzione dell'imatinib (trattato in maniera più approfondita nel paragrafo 1.5.1.) nella terapia ha segnato un importante progresso per quanto riguarda sia l'efficacia del trattamento farmacologico sia la diminuzione delle reazioni avverse [51]. Ad oggi, la terapia con TKIs è diventata il trattamento di prima linea per la cura della LMC. Questi farmaci hanno incrementato la sopravvivenza a lungo termine nei pazienti e ridotto fortemente il rischio di progressione del tumore soprattutto se impiegati durante la fase cronica della malattia [52].
Nei grafici sotto riportati, vengono illustrati rispettivamente l'aspettativa di vita di pazienti malati di LMC rispetto alla media della popolazione generale (**Figura 11**, sinistra) ed il cambiamento nel tempo della sopravvivenza netta a 5 o 10 anni dalla diagnosi (**Figura 11**, destra). Come si può apprezzare nel grafico a destra, la sopravvivenza netta a 10 anni dalla diagnosi è aumentata del 30% circa tra la fine degli anni '90 e il secondo decennio degli anni '00. È proprio in questo contesto temporale che

sono stati approvati come terapia di prima linea nel trattamento della LMC gli TKIs di prima generazione [53].

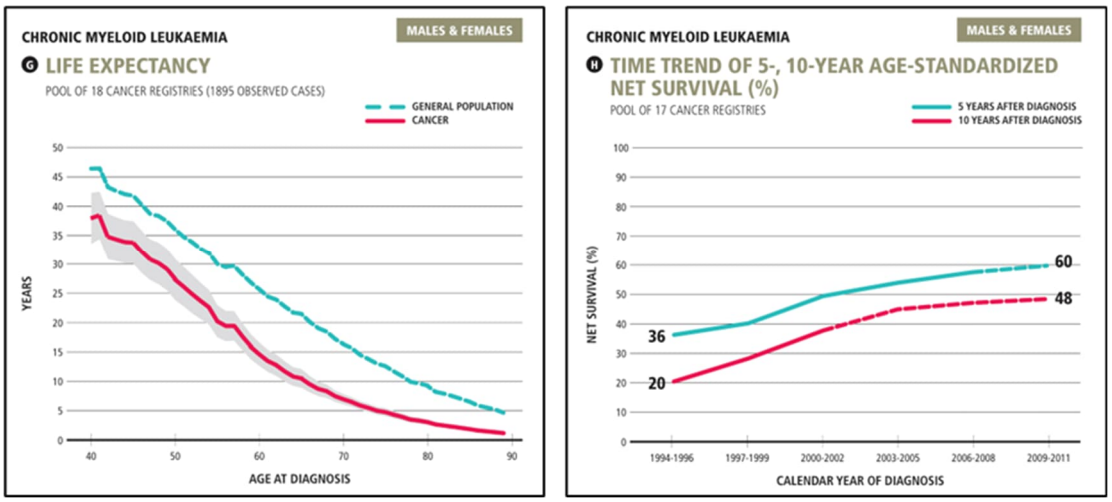


Figura 11. Sinistra: *confronto tra l'aspettativa di vita di pazienti malati e il resto della popolazione generale sulla base dell'età al momento della diagnosi. Per esempio, a circa 65 anni un malato ha un'aspettativa di vita di circa dieci anni. Diversamente, un individuo sano avente la stessa età possiede un'aspettativa di vita di circa venti anni.* ***Destra:*** *andamento del cambiamento nel tempo della sopravvivenza netta % a 5 o 10 anni sulla base dell'anno in cui i pazienti hanno ricevuto la diagnosi. L'arco di tempo analizzato fa riferimento al periodo dal 1994-1996 al 2009-2011 [53].*

1.4.1. Forme resistenti di LMC

Nonostante gli ottimi risultati ottenuti con l'introduzione in terapia degli TKIs (descritti nel paragrafo 1.5) nella lotta contro la LMC, un loro limite è la comparsa di fenomeni di resistenza che portano ad una prognosi sfavorevole nei pazienti, sottolineando l'importanza nella ricerca di nuovi inibitori in grado di superare questo problema.

I meccanismi responsabili della comparsa della resistenza sono essenzialmente due: la sovraespressione di Bcr-Abl dovuta principalmente all'amplificazione genica, ma più frequentemente la comparsa di mutazioni nel dominio chinasico dell'enzima [54,55]. Nel primo caso, l'amplificazione del gene *Bcr-Abl* determina una sovrapproduzione della corrispondente chinasi, rendendo la concentrazione intracellulare del farmaco

insufficiente per inibire l'aumento dei livelli della proteina. In questo caso potrebbe essere utile aumentare la dose dell'inibitore, anche se l'amplificazione del gene è il meccanismo di resistenza principale evidenziato in colture cellulari trattate con concentrazioni gradualmente crescenti di inibitore [56,57].

La comparsa di mutazioni è stata riportata come la causa principale della comparsa di recidive in seguito al trattamento con TKIs come imatinib. Le mutazioni possono portare a cambiamenti negli aminoacidi che svolgono un ruolo critico nell'interazione con l'inibitore o che permettono l'accesso dell'inibitore al sito di legame dell'ATP. Mutazioni nel dominio chinasico di Bcr-Abl sono state rilevate nel 50%-90% dei pazienti con resistenza acquisita, con oltre 100 diverse sostituzioni di aminoacidi descritte, di cui 20 sono clinicamente rilevanti [58]. Le mutazioni più importanti sono di 4 tipi: a) mutazioni nel loop di legame del fosfato per l'ATP (P-loop), che rappresentano il 40% delle mutazioni; b) mutazioni dell'aminoacido T315 che determinano il 25% delle mutazioni; c) mutazioni dell'aminoacido M351 che si trova in prossimità del dominio catalitico responsabili del 25% delle mutazioni; d) mutazioni nel loop di attivazione (5%).

Sono stati riportati altri meccanismi che possono contribuire alla resistenza agli TKIs, specie all'imatinib [59], come l'eccessivo legame del farmaco alle proteine plasmatiche (per esempio alla glicoproteina acida α-1), la ridotta disponibilità intracellulare dell'imatinib causata dalla sovraespressione della glicoproteina P multifarmaco-resistente (MDR-1) o l'insensibilità delle cellule staminali leucemiche agli TKIs [60,61].

Le mutazioni di T315 sono sicuramente al centro dell'attenzione nello sviluppo di nuovi farmaci, poiché questo aminoacido è di particolare rilevanza nel determinare la sensibilità sia all'imatinib, sia ad altri inibitori. Infatti, la mutazione di T315 in Ile (T315I) conferisce un'elevata resistenza a Bcr-Abl. L'aminoacido T315 è stato definito come una sorta di "*gatekeeper*" che controlla l'accesso degli inibitori al sito di legame. La natura del residuo *gatekeeper* cambia in diverse chinasi ed è un fattore importante nel determinare la specificità inibitoria [62].

È stato evidenziato che la sostituzione della treonina con l'isoleucina più voluminosa ed idrofobica impedisce un importante legame idrogeno necessario per il legame dell'inibitore ed inoltre crea un ostacolo sterico che potrebbe interferire con il posizionamento dell'imatinib all'interno della tasca di legame dell'ATP [54]. Ad oggi, la

mutazione T315I rimane la più difficile da superare ed è associata alla prognosi peggiore nei pazienti con LMC [44].

1.5. Inibitori di Bcr-Abl utilizzati nella terapia della LMC

I TKIs sono, ad oggi, la terapia di prima linea utilizzata per la LMC. Questo settore si è rivelato infatti uno dei più ampiamente perseguiti nell'ambito di sviluppo di nuovi farmaci[39].

Gli inibitori di Bcr-Abl possono essere raggruppati in varie classi in base al tipo di interazione che stabiliscono con la chinasi. Due di queste sono le categorie principali e comprendono la maggior parte dei farmaci usati in terapia contro la LMC: gli inibitori di tipo 1 (dasatinib, bosutinib) e gli inibitori di tipo 2 (imatinib, nilotinib, ponatinib). Negli inibitori di tipo 1, la molecola si lega alla conformazione attiva della chinasi (DFG-in), mentre, gli inibitori di tipo 2 si legano alla conformazione inattiva (DFG-out). Entrambi competono con l'ATP per il legame con il sito attivo dell'enzima bloccando il meccanismo di fosforilazione. Di conseguenza, la loro azione impedisce la proliferazione delle cellule tumorali e quindi la progressione della malattia [63]. Come descritto in precedenza, nel dominio catalitico SH1 della tirosin-chinasi si forma una tasca tra il lobo *N*-terminale e il lobo *C*-terminale: è proprio in questa regione che agisce la maggior parte degli inibitori, impedendo le varie interazioni che avvengono in questa regione con la molecola di ATP. Per questo motivo, solitamente questi inibitori presentano uno scaffold purinico o pirimidinico che richiama l'adenosina dell'ATP. La **Figura 12**, riporta una rappresentazione tridimensionale dell'enzima legato ai due tipi di inibitori appena descritti [63].

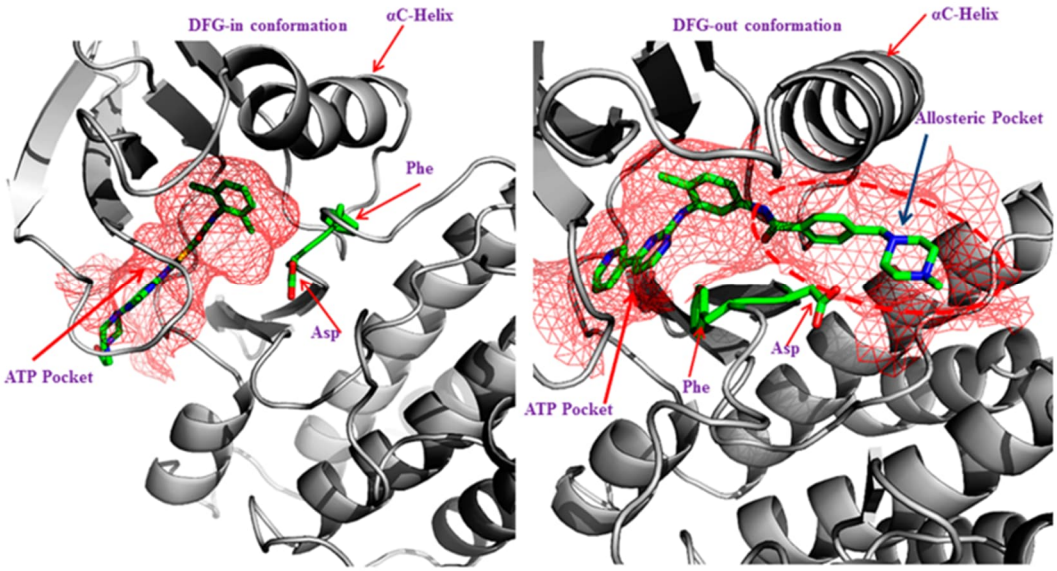


Figura 12. *La figura a sinistra mostra la conformazione DFG-in della chinasi Bcr-Abl legata al dasatinib, con il residuo di Asp rivolto verso il sito di legame dell'ATP. A destra, invece, abbiamo una conformazione DFG-out del dominio catalitico di Bcr-Abl legato all'imatinib, con il residuo di Asp non rivolto verso la tasca di legame dell'ATP. In questo caso Phe e Asp hanno scambiato le loro posizioni rispetto alla conformazione attiva. L'orientamento capovolto apre anche una tasca allosterica evidenziata con i trattini rossi [64].*

Oltre a questi due gruppi, esistono anche gli inibitori di tipo 3 (legano una tasca di legame adiacente a quella dell'ATP) e di tipo 4 (di cui ricordiamo asciminib), che si legano ad un sito diverso rispetto agli inibitori facenti parte delle prime due classi. Nel dettaglio, gli inibitori di tipo 3 legano una tasca di legame adiacente a quella dell'ATP, mentre gli inibitori di tipo 4 interagiscono con una tasca distante rispetto al sito di legame dell'ATP. Questi ultimi sono entrambi inibitori allosterici e perciò non ATP-competitivi [39].

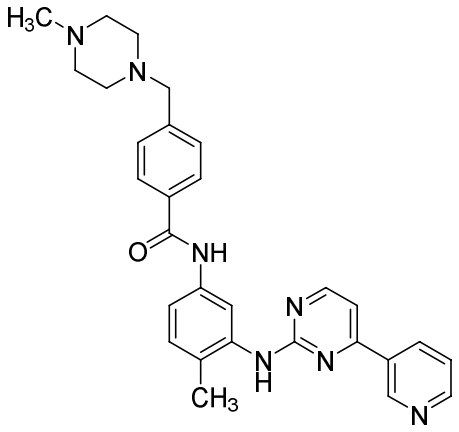
Inoltre, una classificazione degli inibitori tiene conto della loro capacità o meno di superare i fenomeni di resistenza. Sono state riportate principalmente tre generazioni di farmaci: la prima generazione include molecole attive solo sulla LMC indotta da Bcr-Abl *wild-type* (wt) (ad esempio imatinib), la seconda generazione comprende molecole attive verso le forme di LMC resistenti all'imatinib (ad eccezione della mutazione T315I), come

il dasatinib, ed infine la terza generazione è rappresentata da composti attivi contro le LMC resistenti multiple, spesso inclusa la mutazione T315I.

Bcr-Abl rappresenta la prima chinasi per la quale furono approvati inibitori. Come accennato in precedenza, il capostipite di questa classe di farmaci è l'imatinib. L'imatinib è stato oggetto di vari studi di relazione struttura-attività (SAR) ed è risultato fondamentale per fornire una comprensione più profonda del meccanismo di inibizione della chinasi. Successivamente, altri inibitori di Bcr-Abl sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della LMC, tra i quali ricordiamo: dasatinib, nilotinib, bosutinib, potatinib e asciminib [63].

1.5.1. Inibitori di prima generazione: imatinib

L'**imatinib** (STI571) (**Figura 13**) è stato il primo inibitore di Bcr-Abl approvato dalla FDA nel 2001 per il trattamento della LMC, essendo in grado di mantenere la malattia sotto controllo, soprattutto nei pazienti in fase cronica [65,66]. L'imatinib presenta un elevato livello di selettività nei confronti di Abl, presentando valori di IC_{50} nell'intervallo di 25 nM. Gli effetti collaterali più comuni riferiti comprendono crampi muscolari, edema periferico, eruzioni cutanee e problematiche a livello gastrointestinale [67].



Imatinib

Figura 13. *Struttura chimica dell'imatinib.*

Gli studi che portarono all'imatinib inizialmente erano indirizzati all'inibizione della proteina chinasi C (PKC) [41]. Il primo composto che si mostrò essere promettente fu un derivato fenilaminopirimidinico. Successivamente, si ottenne una forte inibizione della PKC con l'aggiunta di un anello piridinico (**Figura 14**, ***a***). La svolta durante l'ottimizzazione di questa classe strutturale di composti fu l'introduzione di un gruppo ammidico direttamente legato al fenile (**Figura 14**, ***b***). Era stato osservato, infatti, che l'ammide conferiva attività inibitoria contro le tirosin-chinasi, come Bcr-Abl. Infine, lo sviluppo della SAR di questa molecola dimostrò che l'introduzione di un sostituente in posizione 6 dell'anello diamminofenile (nel caso di imatinib un metile) portava ad una perdita di attività nei confronti della PKC, mentre l'attività contro la tirosin-chinasi risultava mantenuta o addirittura aumentata (**Figura 14**, ***c***).

In seguito, gli studi si focalizzarono sul miglioramento del profilo farmacocinetico del candidato farmaco. Infatti, la prima serie di inibitori selettivi risultò poco solubile in acqua e mostrò una scarsa biodisponibilità. L'introduzione della *N*-metil piperazina migliorò nettamente la biodisponibilità orale della molecola. Inoltre, per evitare il potenziale mutageno del gruppo anilinico, si interpose un distanziatore tra l'anello fenile e l'atomo di azoto. Il migliore composto della serie fu l'imatinib (**Figura 14**, ***d***), che fu selezionato come il candidato più promettente per lo sviluppo clinico [68].

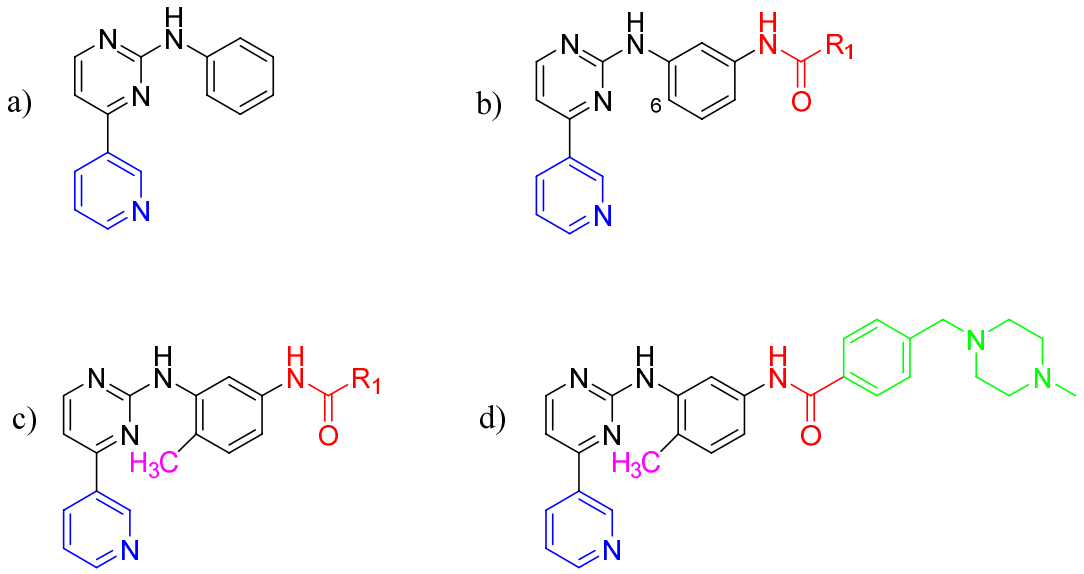


Figura 14. *Ottimizzazione chimica dell'imatinib [68].*

Studi di docking hanno successivamente dimostrato la capacità dell'imatinib di legarsi al sito di legame per l'ATP (**Figura 15**). In dettaglio, la porzione 4-piridin-3-il-pirimidinica occupa la regione dove normalmente si lega l'adenina dell'ATP. Il resto del composto penetra ulteriormente all'interno della tasca idrofobica (controllata dal residuo *gatekeeper* T315), congelando la chinasi nella conformazione inattiva (DFG-out).

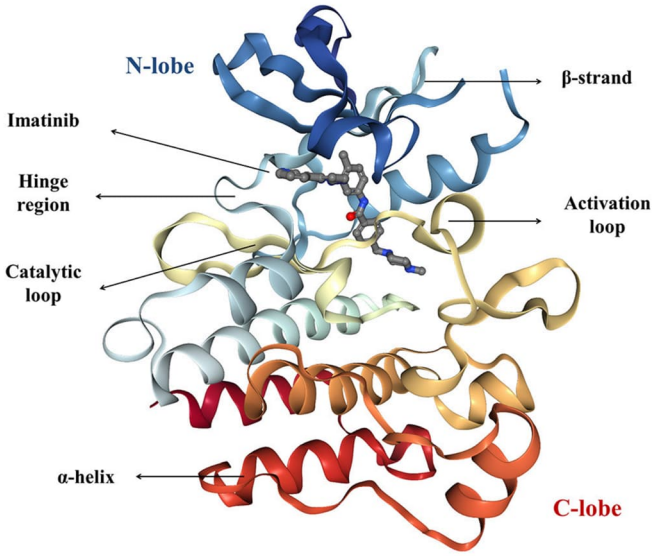


Figura 15. *Struttura cristallografica dell'imatinib legato al target (PDB code: 2HYY) [69].*

In particolare, l'imatinib forma sei legami idrogeno con la proteina e diversi altri contatti con il sito attivo sono mediati da interazioni di van der Waals. I legami idrogeno avvengono tra l'atomo di N dell'anello piridinico ed il gruppo NH della M318, tra l'NH che lega la pirimidina all'anello fenilico e l'ossigeno dell'OH della T315, tra l'NH amidico ed il carbonile del E286 e tra il carbonile amidico e l'NH del D381. Altri due legami idrogeno addizionali si formano tra l'atomo di azoto terminale ($N-CH_3$) dell'anello piperazinico ed i due gruppi carbonilici di H361 e I360 (**Figura 16**) [68].

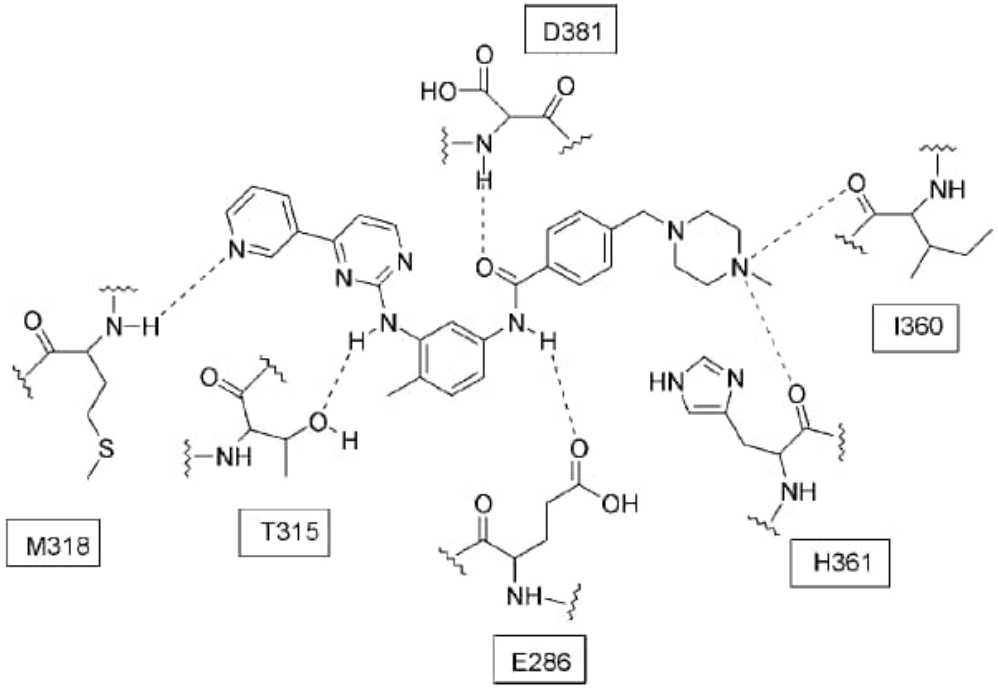


Figura 16. *Rappresentazione schematica dei legami idrogeno dell'imatinib con il sito attivo di Abl.*

Questi studi hanno indicato che il gruppo *N*-metilpiperazinico, che era stato introdotto per migliorare il profilo farmacocinetico del farmaco, era anche in grado di interagire con la profonda tasca idrofobica adiacente al sito di legame dell'ATP, mentre il metile presente sull'anello fenilico fornisce ulteriori interazioni idrofobiche che aumentano l'affinità per l'enzima [68]. Le forti interazioni garantiscono un'elevata selettività del farmaco nei confronti di Bcr-Abl che tuttavia ha acquisito nel tempo una notevole resistenza. In generale, l'imatinib rimane un'opzione di trattamento per i pazienti anziani o quelli a basso rischio [44]. Tuttavia, il suo utilizzo è diminuito fortemente nel tempo, con la scoperta degli inibitori di seconda generazione, che si sono rivelati più efficaci dell'imatinib nel raggiungere una risposta citogenetica completa [52,70].

1.5.2. Inibitori di seconda generazione: dasatinib, nilotinib, bosutinib

Il **dasatinib** (BMS-354825) (**Figura 17**) è un TKI avente *scaffold* tiazolo-carbossammidico. Fu approvato nel 2006 per il trattamento della LMC in pazienti

resistenti o intolleranti all'imatinib. Il dasatinib è un farmaco multi-target, che presenta anche attività nei confronti, ad esempio, della TK Scr. Questo è dovuto all'alta omologia strutturale tra il sito attivo delle due chinasi ed alle loro simili conformazioni DFG-in [71]. Diversamente dall' imatinib, è un inibitore di tipo 2 poiché si lega a Bcr-Abl nella sua conformazione attiva (DFG-in) [44]. Rispetto all'imatinib, l'inibizione dell'attività di fosforilazione della chinasi Abl risulta più potente ($IC_{50} < 1.0$ nM) [72]. Inoltre, questo farmaco è risultato essere efficace nei confronti di molte resistenze sviluppate nei confronti dell'imatinib. In particolare, in uno studio il farmaco è stato testato contro 15 diverse mutazioni di Abl clinicamente rilevanti: 14 di queste risultarono inibite in un basso range nanomolare di IC_{50s} [73]. Furono efficacemente inibite tutte le mutazioni a carico del P-Loop della chinasi mentre l'unica mutazione che rimane tutt'ora resistente è la T315I [36]. Il dasatinib presenta meno rischi cardiovascolari rispetto agli altri farmaci appartenenti a questa categoria. Tuttavia, il suo utilizzo in terapia è stato associato a complicazioni polmonari e alla pleura [74].

Il **nilotinib** (AMN107) (**Figura 17**) è un analogo strutturale dell'imatinib e come quest'ultimo è selettivo nei confronti di Abl, che lega nella sua conformazione inattiva (DFG-out) con $IC_{50} < 30$ nM. Nonostante una struttura chimica simile, mostra un adattamento migliore nella tasca della chinasi [75]. Il nilotinib è dotato di maggiore lipofilia, caratteristica che rende il composto più selettivo e più potente: sono stati infatti introdotti il sostituente trifluorometile ed un anello imidazolico, rendendo almeno 20 volte più forte l'inibizione dell'enzima. Particolarmente importante si è rivelato il gruppo trifluorometile, che è in grado di stabilire ulteriori interazioni idrofobiche importanti. Gli ottimi risultati ottenuti dagli studi clinici hanno portato all'approvazione da parte della FDA del nilotinib nel 2007 per la terapia della LMC, sia nei pazienti al primo stadio della malattia, sia per quelli in fase accelerata [76]. Oltre a essere significativamente più potente rispetto all'imatinib, questo farmaco mantiene l'attività contro la maggior parte delle mutazioni di Bcr-Abl resistenti all' imatinib [77,78]. Tuttavia, la mutazione T315I non risulta ancora superata, poiché impedisce le interazioni tra i residui della tasca idrofobica dell'enzima con i sostituenti caratteristici della molecola (*scaffold* fenil-imidazolico e gruppo trifluorometile) [39]. Come il dasatinib, gli effetti avversi e la tossicità sono significativi, mostrando una notevole tossicità cardiovascolare, con un effetto dose-dipendente ed inducendo disordini metabolici, quali dislipidemia e iperglicemia [79,80].

Il **bosutinib** (SKI-606) (**Figura 17**) è un altro inibitore duale di tipo 1, con attività nei confronti di Bcr-Abl e di Src. L'inibizione nei confronti di Abl si è rivelata più efficace, mostrando un IC_{50} di 1.4 nM. Di conseguenza, il composto è stato approvato nel 2012 dalla FDA, per il trattamento di seconda linea LMC [44]. È indicato per pazienti adulti, anche in fase blastica, nel caso in cui sia presente intolleranza agli altri farmaci di seconda generazione [81]. Diversamente dagli altri farmaci descritti, il bosutinib è caratterizzato da un nucleo anilino-chinolinico, piuttosto simile a molecole inibitrici di EGFR. L'azoto dell'anello chinolinico forma un legame a idrogeno con la tasca enzimatica, mentre il sostituente anilinico occupa una tasca idrofobica adiacente alla T315. Inoltre, il gruppo nitrile si inserisce in un altro dominio adiacente alla T315, contribuendo alla selettività del composto [39]. Anche il bosutinib è tuttavia inefficace nei confronti della mutazione T315I. Non è indicato per il trattamento di prima linea a causa dei suoi effetti avversi soprattutto sintomi gastrointestinali (quali diarrea, nausea e dolore addominale) ed a livello ematologico ed epatico [82].

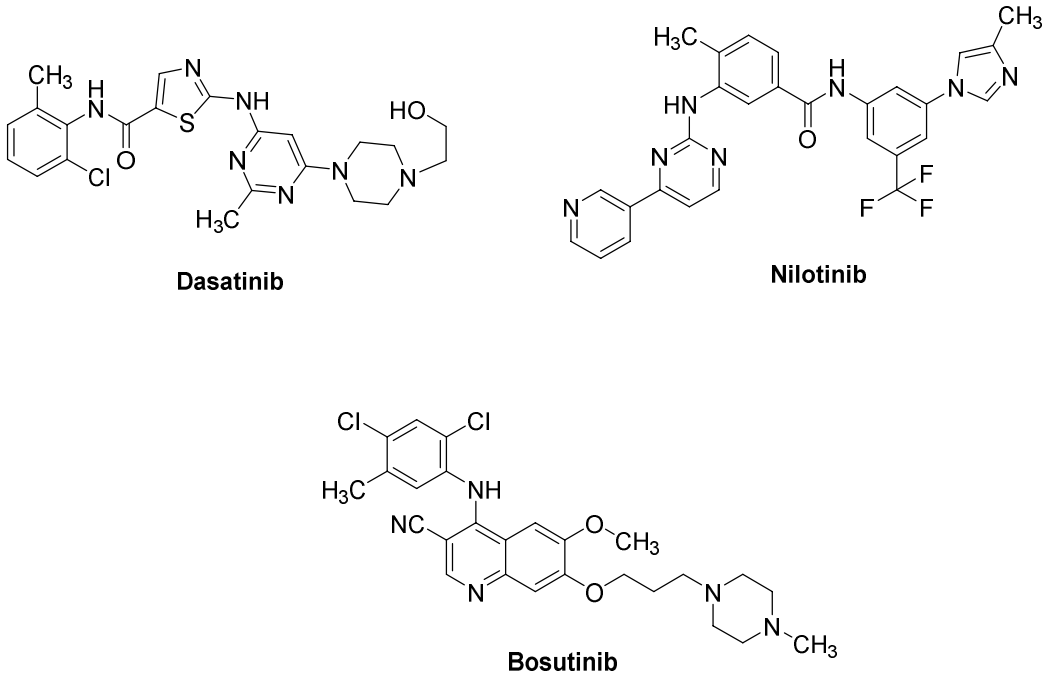


Figura 17. *Strutture chimiche degli inibitori di seconda generazione.*

1.5.3. Inibitori di terza generazione: ponatinib.

Il **ponatinib** (AP24534) è un farmaco multi-target (**Figura 18**). In particolare, lega Bcr-Abl nella sua conformazione inattiva (DGF-out), rendendolo un inibitore di tipo 2. Viene utilizzato in terapia per la LMC, soprattutto nei pazienti che presentano la mutazione T315I, rimanendo l'unico inibitore ATP-competitivo presente in terapia in grado di superarla [41]. Per questo motivo, il ponatinib fu approvato dalla FDA nel 2012 come trattamento di seconda linea in pazienti intolleranti o resistenti al dasatinib e nilotinib [83,84].

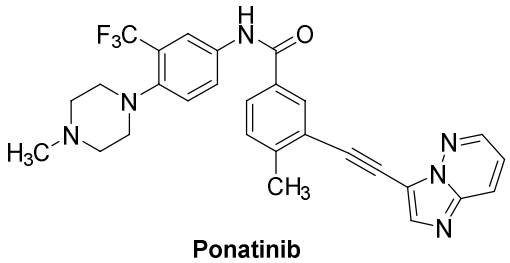


***Figura 18**. Struttura chimica del ponatinib.*

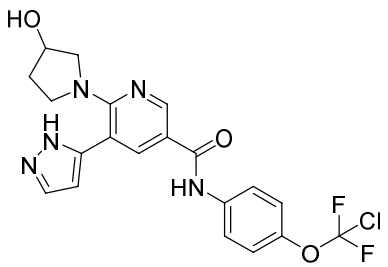
Dal punto di vista strutturale invece di avere un linker amminopirimidinico che interagisce con il residuo *gatekeeper* T315, il ponatinib è caratterizzato da un alchino. Inoltre, presenta un anello piperazinico legato al fenile, che ricorda la struttura dell'imatinib, ed il gruppo trifluorometile che, come nel precedente composto nilotinib, favorisce interazioni idrofobiche essenziali per la selettività nei confronti della chinasi [39]. Il farmaco si lega nello stesso sito degli altri inibitori precedentemente descritti, tuttavia, la sua struttura impedisce lo sviluppo di resistenza, evitando il contatto con l'Ile315. È proprio la presenza di un triplo legame carbonio-carbonio lineare che permette il superamento della mutazione: esso si riesce a inserire nella tasca enzimatica, evitando il blocco di tipo sterico attuato da Ile [84]. Furono inoltre ottimizzati tutti gli altri siti di interazione tra l'inibitore e la chinasi, ottenendo un composto con maggiore affinità ed efficacia di inibizione. Aumentando i punti di legame tra farmaco e target si è ottenuto un livello di inibizione maggiore e questo è fondamentale perché assicura che si verifichi l'attività inibitoria anche nei casi in cui uno dei siti di legame possa essere perduto, a causa di una specifica mutazione [83]. Il ponatinib inibisce la forma nativa di Abl e la

forma mutata Abl^{T315I} con IC_{50} rispettivamente di 0.37 nM e di 2.0 nM. Tutte le altre mutazioni clinicamente rilevanti sono inibite con valori di IC_{50} compresi tra 0.30-0.44 nM [85].

Nonostante le sue caratteristiche promettenti, ad ottobre 2013 la FDA ha sospeso la vendita di ponatinib a causa dell'aumento dell'incidenza di trombosi ed altre complicazioni cardiovascolari. Durante gli studi clinici, infatti, circa il 24% dei pazienti dello studio clinico in fase II e circa il 48% di quelli in fase I ha subito gravi effetti avversi [86]. Tuttavia, nonostante questa tossicità, a dicembre del 2013, a causa della mancanza di opzioni di trattamento alternative, FDA ha permesso l'utilizzo di ponatinib in terapia con indicazioni più ristrette (uso limitato a pazienti con la mutazione T315I o a pazienti per i quali non è indicata una terapia con TKIs alternativi) [84,87].

1.5.4. Inibitori allosterici: asciminib

La scoperta e l'ottimizzazione degli inibitori ATP-competitivi di Bcr-Abl ha permesso un notevole successo nel consentire alla maggior parte dei pazienti con LMC (specialmente quelli in fase cronica della malattia) di avere una speranza di vita vicina a quella della popolazione non malata. Nonostante questo, come precedentemente descritto, la terapia è spesso associata all'insorgenza di resistenze od intolleranze nei confronti dei farmaci. Queste limitazioni evidenziano la necessità di nuovi agenti di prima linea per trattare la malattia in modo più efficace. In questo contesto, diventa importante l'asciminib, (**Figura 19**) che riesce a superare le mutazioni riguardanti gli inibitori leganti il sito ATPasico, compresa la mutazione T315I [88].



Asciminib

***Figura 19**. Struttura chimica dell'asciminib.*

L'**asciminib** (ABL001) è il primo inibitore allosterico (di tipo 4) di Bcr-Abl approvato nel 2021 da FDA per il trattamento della LMC in pazienti precedentemente trattati con gli inibitori ATP-competitivi. Anche in questo caso si verificano alcuni effetti collaterali, tra cui trombocitopenia, neutropenia e anemia. Inoltre, fenomeni di resistenza possono emergere anche in questo caso a causa di mutazioni nel sito allosterico. La combinazione dell'asciminib con i precedenti farmaci potrebbe sopprimere efficacemente l'insorgenza di resistenze alla terapia.

L'asciminib genera legami a idrogeno con il sito allosterico. Il gruppo $-CF_2Cl$ del composto può inserirsi in una tasca idrofobica che risulta essenziale per la sua attività e selettività [44]. In particolare, il farmaco lega un dominio (tasca miristoilica) che induce cambiamenti conformazionali della chinasi in condizioni normali. Infatti, l'attività di Abl normalmente è autoregolata dal legame dell'*N*-terminale miristoilato con la tasca del dominio SH1. Analogamente a quanto detto in precedenza, se è presente l'oncoproteina Bcr-Abl, Bcr sostituisce il cap *N*-terminale e perciò il dominio catalitico è costitutivamente attivo, a causa della perdita di questo meccanismo regolatorio [89]. L'asciminib si lega specificamente nella tasca miristoilica, inducendo un cambiamento conformazionale nella forma inattiva, inibendo quindi la chinasi (**Figura 20**). Rispetto agli inibitori convenzionali, asciminib ha meno effetti off-target poiché il dominio catalitico è ben conservato nelle TKs, mentre il dominio bersaglio di questa molecola è contenuto in un numero limitato di enzimi appartenenti a questa categoria. Studi su cellule umane tumorali hanno mostrato selettività verso le cellule Bcr-Abl positive, mentre un effetto minimo sulle cellule che non esprimono il gene [90].

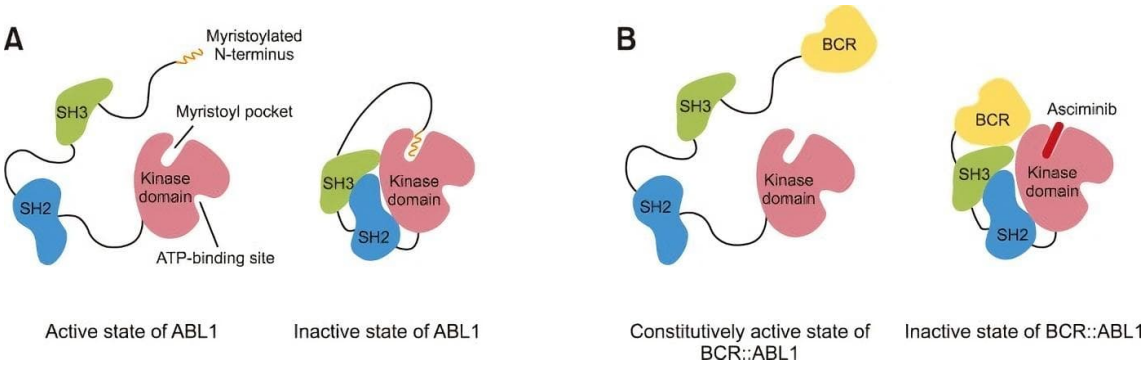


Figura 20. *Meccanismo di azione dell'asciminib [90].*

1.6. Inibitori di Bcr-Abl con scaffold purinico

Diversi inibitori di Bcr-Abl aventi uno *scaffold* purinico variamente sostituito e dotati di attività antiproliferativa sono stati descritti in letteratura (**Figura 21**).

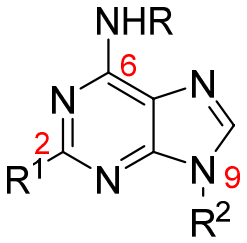


Figura 21. *Scaffold purinico di inibitori di Bcr-Abl.*

Analizzando strutture di farmaci già in commercio e focalizzandosi su librerie di composti purinici 2,6,9-trisostituiti, ARIAD Pharmaceuticals indentificò il composto purinico 2,6,9-trisostituito **AP23464** (**Figura 22**), che si mostrò un potente inibitore di Abl (IC_{50} $\leq$ 1 nM) ed anche di Scr. O'Hare et al. testarono il nuovo composto in cellule leucemiche umane K562 ed evidenziarono la sua selettività allo scopo di inibire la proliferazione, di bloccare il ciclo cellulare e di promuovere l'apoptosi con una potenza maggiore rispetto all'imatinib [91]. L'unica eccezione era la mutazione T315I: l'inibitore blocca efficacemente la proliferazione di cellule murine Ba/F3 che esprimono Bcr-Abl^{wt} (p210) oppure almeno cinque delle mutazioni resistenti all' imatinib, ad eccezione della T315I, che non risultò particolarmente inibita (IC_{50} > 5000 nM). L'IC_{50} si rivelò al di sotto di 30 nM per Bcr-Abl^{wt} e tutte le mutazioni, eccetto la mutazione E255K (IC_{50} 94 nM). Per questo motivo, l'**AP23464** venne considerato un promettente lead compound per lo studio di altri inibitori. Allo scopo di analizzare l'interazione del composto con il target, fu costruito un modello molecolare tridimensionale di **AP23464** complessato con la chinasi nella conformazione attiva (DFG-in) in corrispondenza del suo sito ATPasico. Si evidenziò che il gruppo 3-idrossifeniletilico sull'N-9 occupa una tasca idrofobica specifica per il legame con l'enzima che risultava essere importante anche per l'interazione con l'imatinib. Si confermò inoltre che il residuo mutato Ile315 blocca effettivamente l'accesso della molecola al sito di legame come nel caso dell'imatinib.

Contrariamente a quest'ultimo, **AP23464** è capace di legare solo la conformazione attiva della chinasi [91].

Azam et al. svilupparono una serie di analoghi di **AP23464** con modifiche al sostituente in N-9, allo scopo di inibire sia la variante nativa della chinasi, sia la forma mutata T315I [92]. A questo scopo, si rivelò particolarmente attivo il composto **AP23846** (**Figura 22**), mostrando un'elevata potenza rispetto agli analoghi sintetizzati della stessa libreria. La modifica decisiva rispetto al composto precedente fu la sostituzione del gruppo 3-idrossifeniletilico con un gruppo etile. **AP23846** si lega al sito attivo di Bcr-Abl nativa e anche a Bcr-Abl^{T315I}; test cellulari mostrano che è in grado di inibire la proliferazione di cellule Ba/F3 che presentano entrambe le forme della chinasi. Questo dimostrò che un inibitore ATP-competitivo può superare la mutazione interagendo limitatamente con la tasca idrofobica. Tuttavia, questo composto si mostrò più indicato per l'inibizione di Scr piuttosto che di Abl. Altri analoghi di questa serie, come l'**AP23848**, mostrarono invece un'importante diminuzione di potenza (**Figura 22**).

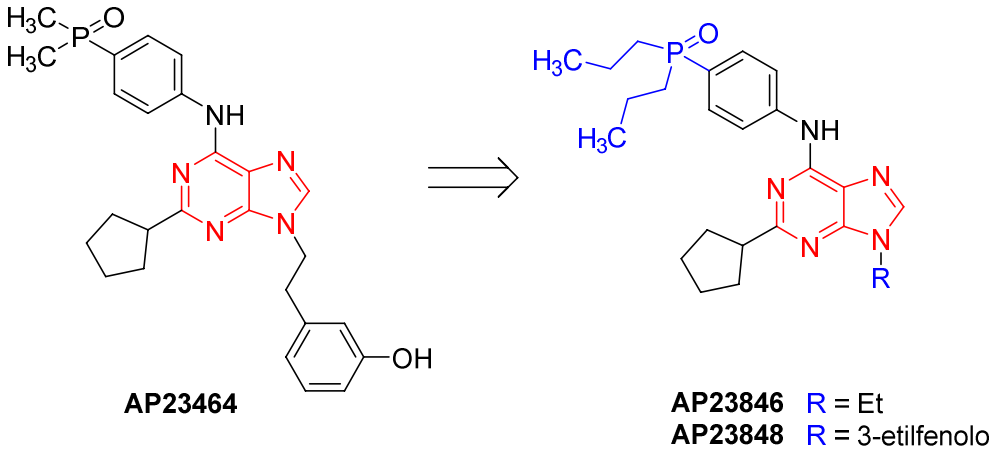


***Figura 22**. Inibitori purinici 2,6,9-trisostituiti: **AP23464** e suoi analoghi **AP23846** e **AP23848**.*

Bertrand et al. sintetizzarono nuovi inibitori purinici 2,6,9-trisostituiti in grado di inibire sia Bcr-Abl, sia Btk (un'altra tirosin-chinasi coinvolta nello sviluppo di leucemie) [93].

Due di questi composti **1a** ed **1b** (**Figura 23**) si rivelarono promettenti (IC_{50} nei confronti di Abl pari a 40 nM). Nei due composti sono stati inseriti atomi di fluoro sul gruppo anilinico e, prendendo come riferimento strutture di farmaci già in uso, è stato introdotto il gruppo *N*-metil-fenilpiperazinico in posizione 2. È stato evidenziato che la fluorurazione del fenile legato al nucleo piperazinico comporta una perdita notevole di attività, mentre la stessa sostituzione in *meta* e/o in *para* sull'anilina in N-6 porta ad un marcato aumento di potenza inibitoria. A partire dai composti precedenti, Bertrand et al. sintetizzarono diversi analoghi con vari sostituenti alchilici in N-9 e dimostrarono che il gruppo ciclopropilmetile è ottimale per l'interazione con la chinasi [93]. Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca sintetizzò degli analoghi sulla base dei precedenti risultati [94]. Alcuni composti mantengono la *N*-metil-fenilpiperazina, mentre in altri il gruppo metile è stato sostituito da una catena idrossietilica, che ricorda quella presente nel dasatinib. Inoltre, come l'imatinib, alcuni analoghi presentano un metilene tra l'anello piperazinico e l'anello aromatico (composti **2a** e **2b**, **Figura 23**). Il composto più interessante della serie risultò il composto **3** (IC_{50} di 15 nM nei confronti di Abl) (**Figura 23**). Il gruppo metilenico come linker provoca un aumento di flessibilità che risulta essere svantaggioso, diminuendo il potere inibitorio. Il gruppo idrossietile legato all'atomo di azoto della piperazina, invece, è responsabile di un ulteriore legame idrogeno con l'enzima e perciò dell'aumento della potenza del composto. Vengono inoltre mantenute le altre sostituzioni risultate efficaci nel legame con la chinasi. Studi su linee cellulari B8 KCL22 (cellule che esprimono $Bcr\text{-}Abl^{T315I}$) rivelano una maggiore efficacia rispetto a imatinib e nilotinib verso la mutazione T315I [94].

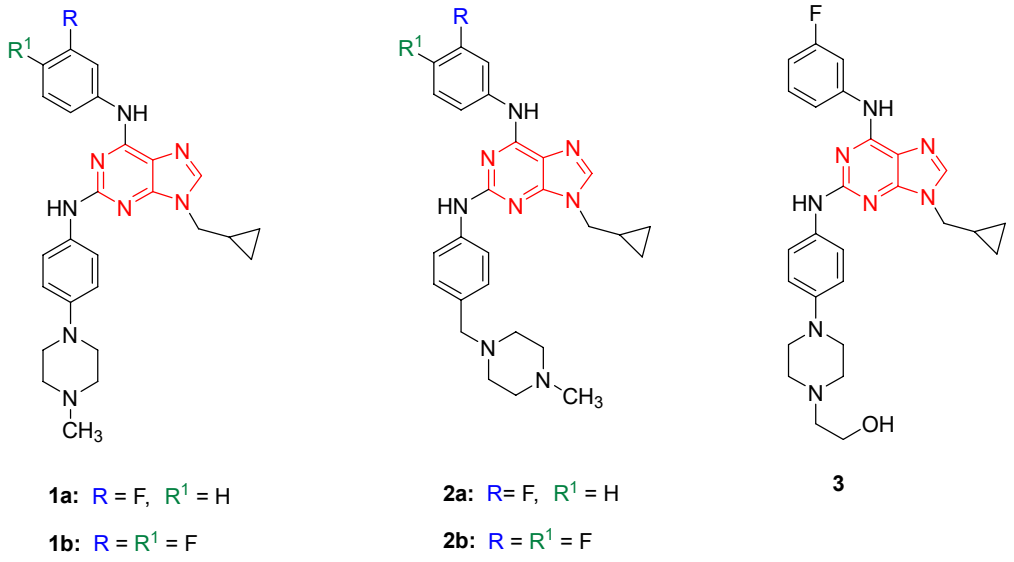


Figura 23. *Inibitori purinici 2,6,9-trisostituiti* ***1a,b, 2a,b*** *e* ***3****.*

Un interessante composto a core purinico 6,9-disostituito che si mostrò in grado di inibire Abl (IC_{50} < 0.5 nM) nella sua conformazione DFG-in è l'**AP24283** (**Figura 24**). L'**AP24283** presenta in posizione N-9 un metilindazolo legato al nucleo purinico tramite un linker vinilico, che svolge un ruolo importante nell'interazione con l'enzima. Il nucleo purinico forma interazioni idrogeno con il sito ATPasico, mentre i sostituenti aromatici occupano le tasche idrofobiche. Il metilindazolo si lega nella tasca di selettività idrofobica adiacente al residuo *gatekeeper* T315: il metilfenile di questo nucleo si lega in prossimità del lobo *N*, mentre il pirazolo si orienta verso il lobo *C*. In totale, la molecola forma quattro legami idrogeno con l'enzima ed in più un nuovo legame idrogeno (o meglio pseudo-idrogeno) con T315 attraverso il protone olefinico del linker vinilico (tra Oγ della treonina e il carbonio del doppio legame in α all'N-9) [95]. L'**AP24283** si rivelò molto più attivo di altri analoghi sintetizzati, tra i quali si citano **AP24149**, **AP24245** e **AP24247** (**Figura 24**).

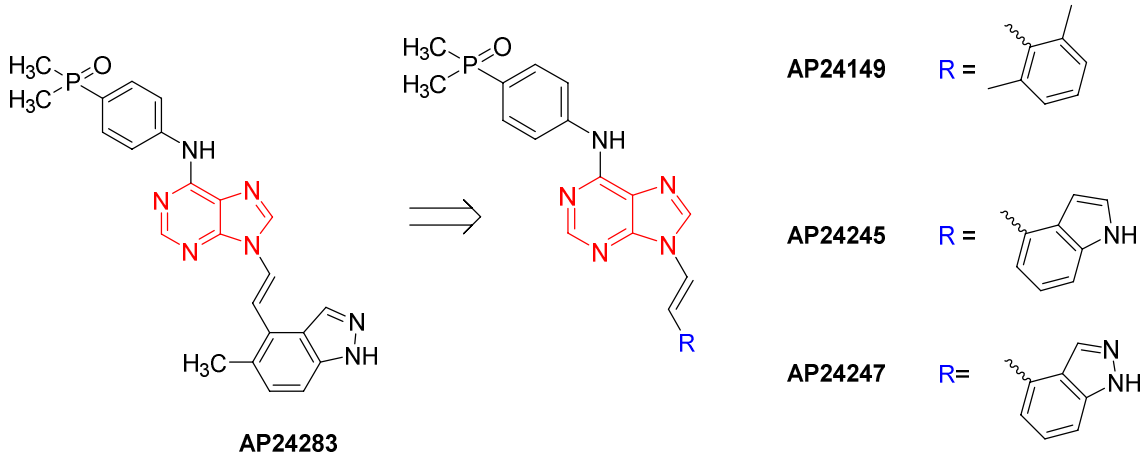


***Figura 24**. Inibitori purinici 6,9-disostituiti **AP24283**, **AP24149**, **AP24245**, **AP24247**.*

La perdita di potenza di **AP24247** (IC_{50} di 2.4 nM) è dovuta alla mancanza del sostituente metile e di conseguenza alla perdita di legame con la tasca idrofobica del lobo *N*. Inoltre, in assenza di entrambi gli atomi di azoto del metilindazolo (come in **AP24149**), o anche solo uno dei due (come in **AP24245**) non si ha la formazione di tutti i legami idrogeno. Questo porta a una perdita di potenza di 10-30 volte rispetto ad **AP24283**. È stato messo in evidenza come quest'ultimo composto ed il dasatinib (inibitore di seconda generazione che lega anch'esso la forma DFG-in) mostrino similarità nell'interazione con la tirosin-chinasi: entrambi condividono due legami idrogeno con *l'hinge region* della chinasi e il gruppo dimetilfosfinossido è circa equivalente alla (idrossietil)piperazina presente nel dasatinib. Nonostante le differenze tra i due inibitori, **AP24283** si è rivelato molto potente, anche grazie alle ulteriori interazioni che forma rispetto al dasatinib [95].

A partire da questi composti risultati attivi sulla forma DFG-in della chinasi, gli studi si concentrarono su inibitori della conformazione DFG-out. Infatti, essi sembrerebbero essere più selettivi nei confronti della chinasi, come avviene nel caso di imatinib e nilotinib, grazie ad un'ulteriore tasca di legame che si forma nella conformazione inattiva. In questo contesto, Huang et al. indirizzarono gli studi verso inibitori mirati alla conformazione DFG-out [71]. Partendo dal composto **AP23464** (**Figura 22**), vennero sintetizzati derivati purinici 6,9-disostituiti che presentavano una porzione diarilammidica legata all'N-9 tramite un linker vinilico che era risultato importante nel

composto **AP24283** (**Figura 24**) e che viene quindi mantenuto nella struttura dei successivi analoghi. L'ammide risulta essere cruciale per la formazione di legami idrogeno, mentre i due anelli aromatici sono importanti per la stabilizzazione di interazioni idrofobiche. L'introduzione di un fenile sostituito con un gruppo CF_3 si mostrò selettiva nei confronti della conformazione DFG-out, in quanto questa porzione occupa una tasca che è disponibile solo in questa conformazione della chinasi. Queste interazioni sono state evidenziate anche in altri inibitori della forma inattiva, come nilotinib. Questi derivati sono tutte purine sostituite in 6 e in 9, e non più tri-sostituite, in quanto un sostituente in posizione 2 sembrerebbe impedire la selettività nei confronti della forma inattiva. Composti interessanti risultarono l'**AP24163** e l'**AP24226** (**Figura 25**). In entrambi i composti, l'introduzione di un gruppo ciclopropile, metabolicamente più stabile, migliorò nettamente la biodisponibilità orale dei composti, mantenendo un'elevata potenza nei confronti del target [71].

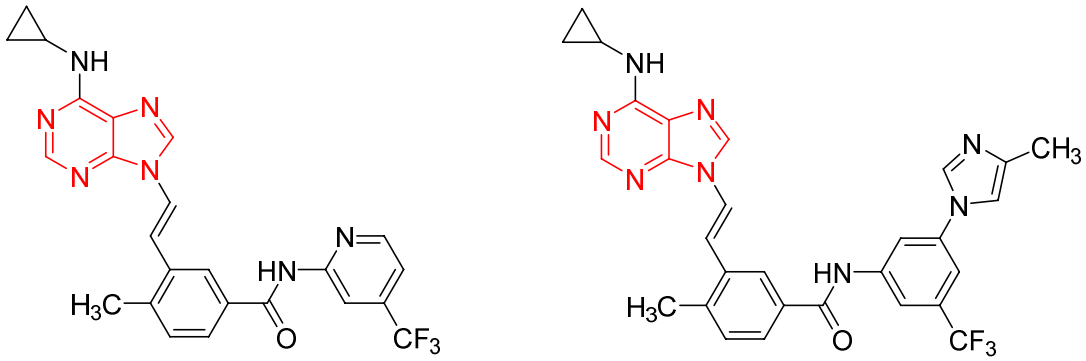


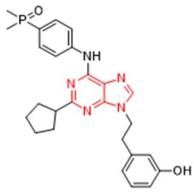
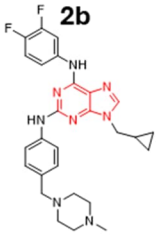
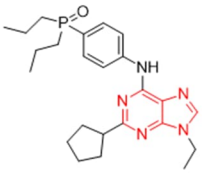
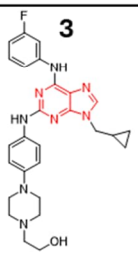
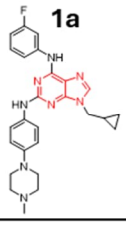
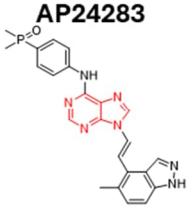
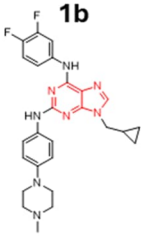
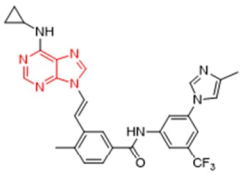
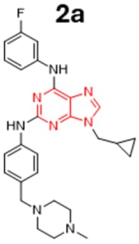
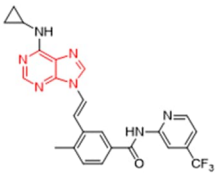
Figura 25. *Strutture chimiche di **AP24226** e **AP24163**.*

L'**AP24163** (**Figura 25**) forma in totale quattro legami idrogeni, come **AP24283** (**Figura 24**) [95]. **AP24163** presenta inoltre diverse similarità con nilotinib. In particolare, in entrambe le strutture il (trifluorometil)fenile occupa la tasca indotta dalla conformazione DFG-out. Le principali differenze di legame tra i due sono in corrispondenza della *hinge*

region, dove l'**AP24163** forma un'interazione aggiuntiva. Il legame a idrogeno tra l'ammino-linker di nilotinib e T315 è assente nel **AP24163**, che invece interagisce con il residuo *gatekeeper* attraverso il linker vinilico. L'**AP24163**, a differenza del nilotinib, riesce ad inibire Abl^{T315I} (IC_{50} 478 nM). Questo avviene poiché l'ingombro sterico causato dal residuo di Ile sembra essere evitato grazie alla presenza del doppio legame. Nel dettaglio il nilotinib, per via della sua struttura, forma un legame a idrogeno con il residuo T315. Quando però questo risulta mutato in un'isoleucina, si verifica un ingombro sterico che impedisce un'efficace interazione. È stato verificato che questa complicazione è ridotta se si utilizza un linker vinilico, stericamente meno ingombrante. Per questo motivo, l'**AP24163** risulta essere moderatamente attivo anche nei confronti della forma mutata. Tuttavia, come abbiamo visto nei precedenti derivati, l'introduzione di questo gruppo vinilico non è sufficiente per avere l'inibizione della forma mutata: infatti **AP24283** e altri inibitori della forma DFG-in sono privi di questa attività. È quindi necessario che la struttura presenti entrambe le caratteristiche: sia un opportuno linker vinilico sia il legame preferenziale verso la conformazione inattiva dell'enzima, come in questo caso [95].

L'analogo **AP24226** (**Figura 25**) mantiene un'elevata potenza comparabile a nilotinib ed ha anche dimostrato un'elevatissima biodisponibilità orale. Tuttavia, è stato dimostrato che analoghi strutturali di **AP24163** che legano o meno anelli diversi dall'imidazolo, come nel caso di **AP24226**, risultano meno efficaci contro la mutazione T315I [71].

Di seguito è riportata la **Tabella 1** contenente i valori di IC_{50} dei composti più rilevanti trattati in questo capitolo. I valori fanno riferimento a saggi enzimatici svolti sulla proteina Abl^{wt} e, dove disponibile, sulla proteina Abl^{T315I}.

AP23464 	IC_{50} Abl^{wt}: <0,1 nM IC_{50} Abl^{T315I}: NA	**2b** 	IC_{50} Abl^{wt}: 225 nM
AP23846 	IC_{50} Abl^{wt}: 21 nM	**3** 	IC_{50} Abl^{wt}: 15 nM
1a 	IC_{50} Abl^{wt}: 40 nM	**AP24283** 	IC_{50} Abl^{wt}: <0,5 nM IC_{50} Abl^{T315I}: NA
1b 	IC_{50} Abl^{wt}: 40 nM	**AP24163** 	IC_{50} Abl^{wt}: 25 nM IC_{50} Abl^{T315I}: 478 nM
2a 	IC_{50} Abl^{wt}: 180 nM	**AP24226** 	IC_{50} Abl^{wt}: 20 nM IC_{50} Abl^{T315I}: NA

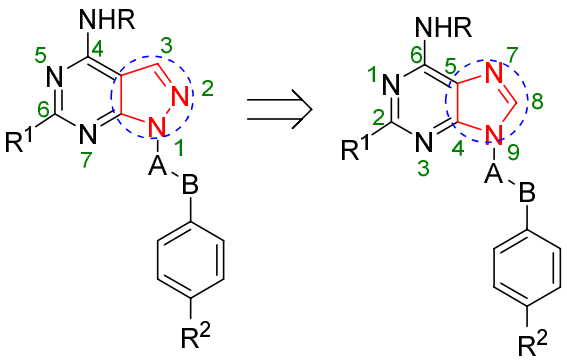
NA= non attivo

Tabella 1. *Confronto dei valori di IC_{50} nei confronti di Abl^{wt} e Abl^{T315I} dei composti trattati in questo capitolo.*

2. SCOPO DELLA TESI

Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di tesi da anni si occupa della sintesi di composti dotati sia di attività inibitoria nei confronti di diverse proteine chinasi sia di attività antitumorale. In particolare, è stata sintetizzata un'estesa libreria che comprende più di 400 derivati a struttura pirazolo[3,4-d]pirimidinica variamente sostituiti nelle posizioni N-1, C-4 e C-6 (**Figura 26**). Molti di questi composti sono risultati potenti inibitori ATP-competitivi di Abl e/o Src nel range micro-nanomolare di IC50 ed hanno mostrato una promettente attività antitumorale sia in vitro che in vivo in diversi modelli di tumore (e.g., glioblastoma, neuroblastoma, osteosarcoma, cancro al seno, LMC) in cui queste chinasi risultavano deregolate. Alcuni derivati della serie avevano inoltre mostrato un'interessante attività inibitoria nei confronti della forma mutata AblT315I [96–105].

Considerati gli ottimi risultati ottenuti con la precedente serie di composti pirazolo-pirimidinici e con l'idea di ottenere più informazioni riguardanti la relazione-struttura attività (SAR), si è pensato di sintetizzare nuovi analoghi come potenziali inibitori di Abl e/o Src caratterizzati da una struttura purinica, in cui l'anello pirazolico è sostituito con il suo isostero imidazolico (**Figura 26**).

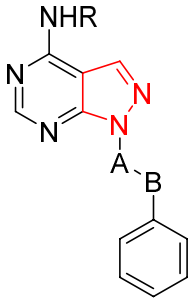


A-B = -CH=CH-,-CH_2CH(Cl)-, -CH_2CH(Br)-, -CH_2CH(CH_3)-, -CH_2CH(OH)-
R = fenil, benzil, fenetil, alchil, cicloalchil
R^1 = H, alchil, S-alchil, NHCH_2CH_2OH
R^2 = H, Br, F, Cl

***Figura 26**. Struttura generale dei derivati in-house pirazolo[3,4-d]pirimidinici e dei nuovi derivati purinici.*

Inizialmente si è deciso di sintetizzare soltanto gli analoghi purinici dei composti presenti nella libreria in-house che avevano mostrato una Ki per Abl e Src inferiore o uguale a 3μM e che presentavano amine variamente sostituite in C-4, la catena 2-cloro-2-feniletilica in N-1 e non erano sostituiti alla posizione C-6 (**Tabella 2, S2-SI404**). Questa scelta è stata anche avvalorata dal fatto che in letteratura sono riportati diversi derivati a struttura purinica 6,9-disostituiti come inibitori di Abl e/o Src. Inoltre, l'assenza del sostituente in posizione 2, analogamente a quanto descritto per altri inibitori purinici, potrebbe favorire la selettività nei confronti della forma inattiva di Abl (DFG-out) [71,95,92]. Oltre ai derivati **S2-SI404**, sono stati selezionati altri due composti pirazolo-pirimidinici della stessa serie (**SI3** ed **SI10**, **Tabella 2**) caratterizzati dalla presenza di un linker vinilico all'N-1 che avevano mostrato attività inibitoria esclusivamente verso Abl o Src, rispettivamente.

Lo scopo era studiare se la sostituzione del pirazolo con l'imidazolo fosse in grado di incrementare l'attività su una od entrambe le chinasi considerato che in letteratura erano stati riportati inibitori di Abl e/o Src a struttura purinica caratterizzati dalla presenza dello stesso gruppo vinilico in N-9 (**Figure 24**, **25**). Come già descritto, in alcuni casi il linker vinilico era stato in grado di incrementare l'affinità nei confronti di Abl grazie alla formazione di un particolare legame idrogeno con il residuo di T315. Inoltre, in composti come l'**AP24163** (**Figura 25**), che si legano alla conformazione DGF-out di Abl, il linker vinilico permetteva di superare l'ingombro sterico causato dal residuo di isoleucina, consentendo perciò l'inibizione anche della forma mutata Abl^{T315I} [95].



S2-SI10

Cmp	R	A-B	Abl K_i	Abl^{T315I} K_i	Src K_i
S2	$CH_2CH_2C_6H_5$	$CH_2CH(Cl)$	2.9	ND	1.8
S7	C_4H_9	$CH_2CH(Cl)$	1.3	ND	1.8
S13	$CH_2C_6H_5$	$CH_2CH(Cl)$	0.40	NA	3.0
S16	C_6H_5	$CH_2CH(Cl)$	0.89	37.5	0.11
S18	$CH_2C_6H_4$-*p*F	$CH_2CH(Cl)$	2.0	NA	0.52
S19	$CH_2C_6H_4$-*m*F	$CH_2CH(Cl)$	0.04	16.7	0.08
S20	$CH_2C_6H_4$-*o*F	$CH_2CH(Cl)$	0.73	NA	0.15
SI159	$CH_2CH_2C_6H_4$-*p*CH_3	$CH_2CH(Cl)$	0.505	ND	0.406
SI186	C_6H_4-*m*F	$CH_2CH(Cl)$	1.44	3.0	2.350
SI187	C_6H_4-*m*Br	$CH_2CH(Cl)$	0.26	1.280	0.395
SI404	C_6H_3-2OH-5Cl	$CH_2CH(Cl)$	0.0027	0.0906	0.017
SI3	C_4H_9	CH=CH	0.4	ND	NA
SI10	$CH_2C_6H_5$	CH=CH	NA	ND	2.4

NA = non attivo, ND = non determinato

***Tabella 2**. Composti pirazolo-pirimidinici (**S2-SI10**) e corrispondenti valori di K_i (μM) verso Abl, Abl^{T315I} e Src.*

Da precedenti studi di modellistica molecolare era inoltre emerso che i derivati pirazolo-pirimidinici disostituiti in C-4 ed N-1, indipendentemente dai sostituenti presenti al C-4, mostravano lo stesso tipo di interazioni sia nel sito attivo di Abl^{wt} che di Abl^{T315I}.

Prendendo come prototipo della serie il derivato **S13** (**Tabella 2**), era stato dimostrato che il nucleo pirazolo-pirimidinico era localizzato nella regione normalmente occupata dall'adenina dell'ATP, permettendo la formazione di 2 legami idrogeno con la M318 del sito attivo. In dettaglio, il gruppo amminico al C-4 e l'N-5 del ligando formavano legami ad idrogeno rispettivamente con l'ossigeno carbonilico e l'NH della M318. Inoltre, le catene laterali legati all'N-1 ed al C-4 si accomodavano all'interno di due distinte regioni di natura idrofobica (I e II) localizzate dalla parte opposta dell'anello eterociclico. In particolare, la catena all'N-1 interagiva mediante legami di van der Waals con i residui V256, L271, I313 M290 e V299 (regione idrofobica I). Mentre, la catena al C-4 formava interazioni di natura idrofobica con i residui di L248, G249 e G321 (regione idrofobica II) (**Figura 27**) [106,107].

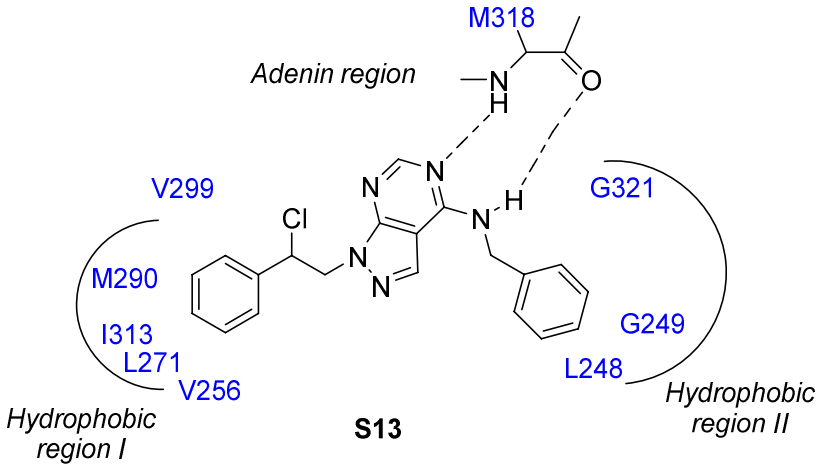
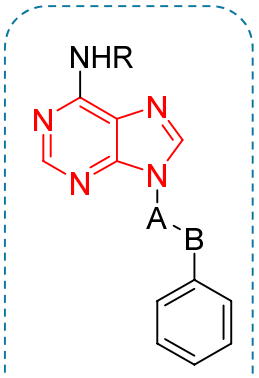


***Figura 27**. Binding mode del composto pirazolo-pirimidinico **S13** nel sito catalitico di Abl^{wt}.*

In base a quanto emerso da questi studi la sostituzione isosterica del pirazolo con l'imidazolo non avrebbe dovuto portare alla perdita delle caratteriste strutturali essenziali per l'interazione con Abl^{wt} e Abl^{T315I}.

In questo progetto si è inserito il mio lavoro di tesi durante il quale mi sono occupata della sintesi dei derivati purinici **4a-d** e **5a** (**Figura 28**), funzionalizzati al C-6 con la benzilamina o benzilamine variamente sostituite, quali analoghi dei composti pirazolo-pirimidinici **S13, S18, S19, S20** ed **SI10** (**Tabella 2**), con l'obiettivo di valutarne inizialmente la potenziale attività inibitoria nei confronti di Abl^{wt}.



4a-d, 5a

Cmp	R	A-B
4a	$CH_2C_6H_5$	$CH_2CH(Cl)$
4b	$CH_2C_6H_4$-*o*F	$CH_2CH(Cl)$
4c	$CH_2C_6H_4$-*m*F	$CH_2CH(Cl)$
4d	$CH_2C_6H_4$-*p*F	$CH_2CH(Cl)$
5a	$CH_2C_6H_5$	CH=CH

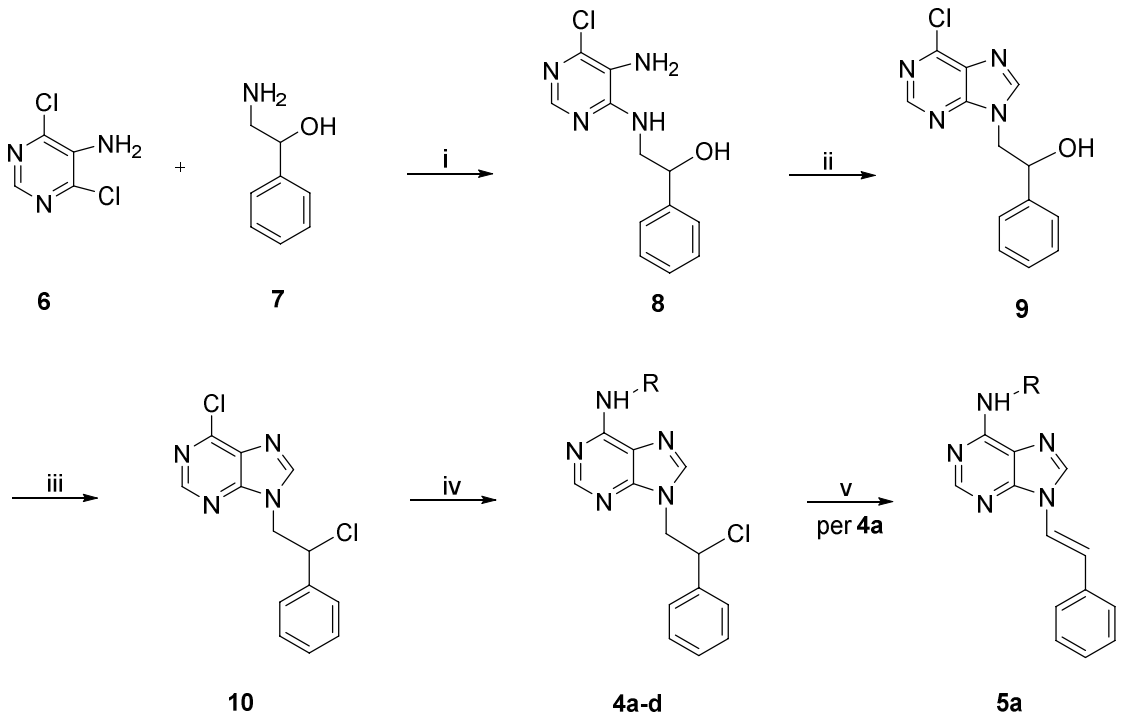
Figura 28. *Nuovi derivati purinici 6,9-disostituiti sintetizzati.*

Al fine di ottenere i composti **4a-d** e **5a** desiderati si è proceduto attraverso un approccio sintetico multi-steps (**Schema sintetico 1**). Nel primo passaggio sintetico si è fatto reagire la 4,6-dicloropirimidin-5-ammina **6** con il 2-amino-1-feniletan-1-olo **7** in presenza di trietilammina (TEA) come base in 1-propanolo a riflusso per 24 ore, ottenendo l'intermedio 2-((5-amino-6-cloropirimidin-4-il)amino)-1-feniletan-1-olo **8** con un'ottima resa (90%).

Nel successivo step di reazione il composto **8** è stato trattato con trietil-ortoformiato ed acido *p*-toluensolfonico a temperatura ambiente per 24 ore. Questa reazione ha portato alla formazione dell'anello purinico, permettendo l'isolamento del composto 2-(6-cloro-

9*H*-purin-9-il)-1-feniletan-1-olo **9** (82%). Quest'ultimo è stato sottoposto ad una reazione di clorurazione in corrispondenza dell'ossidrile benzilico mediante l'utilizzo di ossicloruro di fosforo e dimetilformammide in cloroformio a riflusso per due ore. L'intermedio chiave desiderato **10** è stato ottenuto in resa quantitativa (99%) ed utilizzato nello step sintetico successivo senza necessità di ulteriore purificazione.

Infine, il trattamento del composto **10** con le opportune benzilamine in toluene a temperatura ambiente per 48 ore ha portato all'ottenimento dei derivati purinici **4a-d** desiderati. Il composto **5a** è stato ottenuto dal corrispondente derivato clorurato **4a** mediante reazione di dealogenazione, utilizzando una soluzione acquosa di idrossido di sodio in etanolo a riflusso per 5 ore (**Schema 1**).



Reagenti e condizioni di reazione: i) TEA, 1-propanolo, riflusso, 24 h, 90%; ii) Trietil-ortoformiato, *p*-TsOH, ta, 24 h, 82%; iii) $POCl_3$/DMF, CHCl3, ta-riflusso, 2 h, 99%; iv) opportuna benzilamina, toluene, ta, 48 h, 48-62%; v) NaOH, EtOH, riflusso, 5 h, 43%.

Schema sintetico 1**. Sintesi dei derivati purinici **4a-d, 5a.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I saggi di inibizione nei confronti di Abl^{wt} sono attualmente in corso presso il laboratorio di Spettrometria di massa del dipartimento di Medicina Sperimentale c/o CEBR dell'Università degli studi di Genova. Successivamente i composti risultati più interessanti verranno testati su linee cellulari umane di LMC che sovraesprimono Bcr-Abl e verrà inoltre testata l'eventuale attività inibitoria nei confronti della forma mutata Abl^{T315I}. Inoltre, i composti verranno sintetizzati nuovamente allo scopo di studiarne anche l'eventuale effetto inibitorio nei confronti di Src, in analogia con i derivati pirazolo-pirimidinici.

Risultati promettenti riguardanti l'interazione dei nuovi composti sintetizzati con la chinasi Abl sono emersi dallo studio computazionale concluso presso il laboratorio di ricerca del Prof. Mattia Mori dell'Università degli Studi di Siena. Per lo studio *in silico* è stata selezionata una struttura cristallografica in cui l'inibitore noto di Abl/Src **AP24283** (**Figura 24**) è cristallizzato nel sito catalitico di Abl (PDB code 3kf4) (**Figura 29**). Tale scelta è stata effettuata sia sulla base della risoluzione del cristallo, sia sulla base della similarità strutturale dell'inibitore cristallizzato con i composti oggetto di studio [95,99].

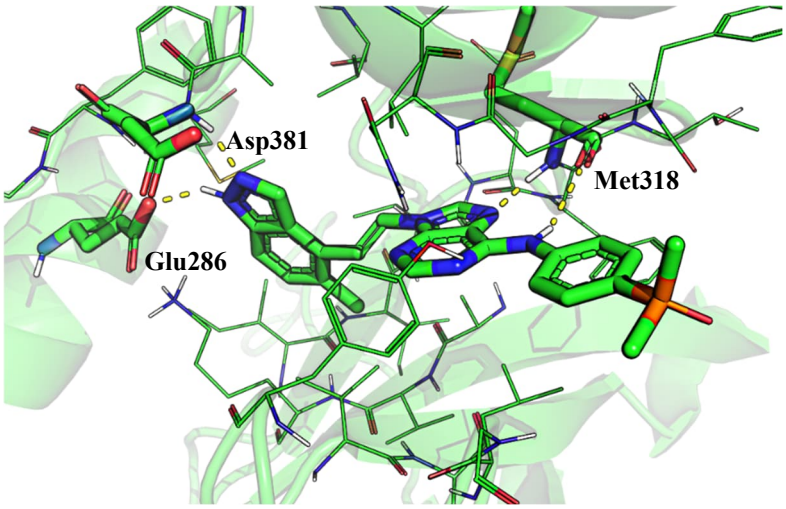


***Figura 29**. Binding mode del derivato purinico **AP24283** nel sito catalitico di Abl.*

Durante l'analisi, per ogni ligando sono state generate 30 pose diverse: di queste sono state considerate ottimali quelle che si sovrapponevano meglio con il core imidazo-pirimidinico di **AP24283** permettendo la formazione di due legami idrogeni essenziali per un'efficace interazione con l'enzima, ovvero tra il gruppo NH al C-6 e N-7 dell'inibitore rispettivamente con il gruppo carbonilico e l'NH del residuo di M318 (**Figura 29**). Nei composti con un carbonio chirale le pose sono state generate per i singoli enantiomeri R ed S.

Cmp	numero pose sovrapponibili (n) (%)
4a_R	1 (3,33%)
4a_S	10 (33,33%)
4b_R	2 (6,67%)
4b_S	9 (30,00%)
4c_R	3 (10,00%)
4c_S	9 (30,00%)
4d_R	4 (13,33%)
4d_S	12 (40,00%)
5a_E	4 (13,33%)

***Tabella 3**. Numero di pose sovrapponibili ad **AP24283** dei nuovi derivati purinici 6,9-disostituiti.*

Dall'analisi delle pose (**Tabella 3**) si evince che gli enantiomeri S hanno tutti un numero maggiore di pose sovrapponibili ad **AP24283** rispetto ai corrispondenti enantiomeri R; tuttavia, le pose di docking degli enantiomeri R ed S sono comparabili (**Figura 30**).

I composti più interessanti sono risultati il **4a**_S (33,33%) ed **4d**_S (40%).

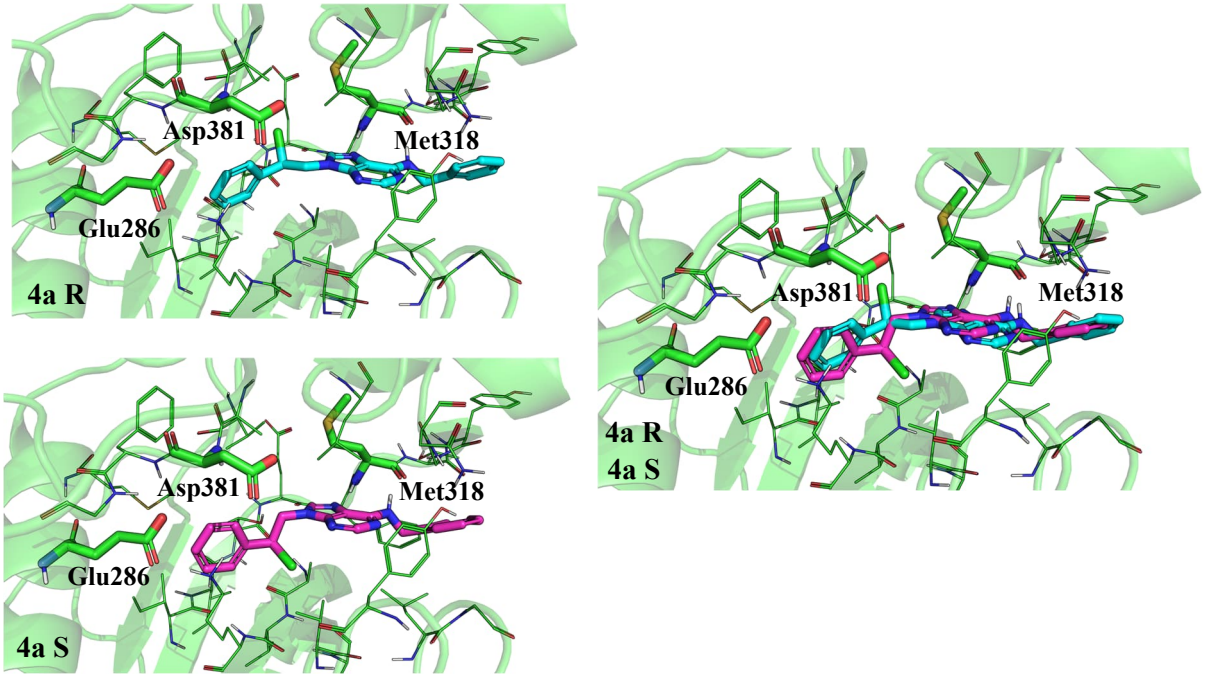


Figura 30. *Binding mode dei composti* ***4a_R*** *(in azzurro) e* ***4a_S*** *(in fucsia).*

Inoltre, il composto **4a_S** ed il suo corrispondente analogo vinilico **5a_E** mostrano pose sovrapponibili (**Figura 31**).

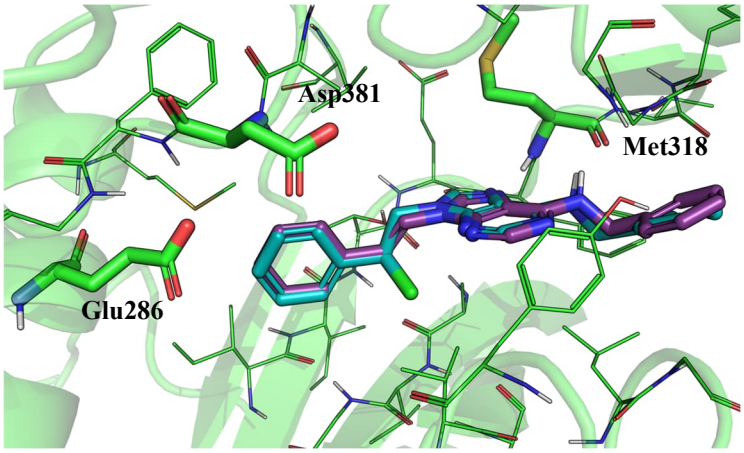


Figura 31. *Binding mode dei composti* ***4a_S*** *(in azzurro) e* ***5a_E*** *(in viola).*

Lo studio *in silico* ha inoltre evidenziato che i derivati purinici precedentemente sintetizzati che presentavano in C-6 l'anilina ed aniline variamente sostituite (**AC72 S, AC76 S, AC79 S**), così come i composti purinici ancora da sintetizzare analoghi delle pirazolo-pirimidine **S2** ed **SI159** (**Tabella 2)** caratterizzati dalla presenza della feniletilamina e feniletilamina *p*-metil sostituita, hanno percentuali di pose migliori rispetto alle purine con benzilamine nella medesima posizione (**Tabella 4**), nonostante tutti i composti riuscivano ad accomodarsi all'interno del sito catalitico dell'enzima (**Figura 32**).

Cmp	R	% pose	#CH_2
AC72_S	NHC_6H_5	60.0%	0
AC76_S	NHC_6H_4-*m*Br	73.3%	0
AC79_S	NHC_6H_4-*m*F	80.0%	0
4a_S	$NHCH_2C_6H_5$	33.3%	1
4d_S	$NHCH_2C_6H_4$-*p*F	40.0%	1
x_S	$NHCH_2CH_2C_6H_5$	53.3%	2
y_S	$NHCH_2CH_2C_6H_4$-*p*Me	73.3%	2

***Tabella 4**. Confronto delle pose sovrapponibili ad **AP24283** di derivati purinici sostituiti con aniline, feniletilamine e benzilamine in C-6.*

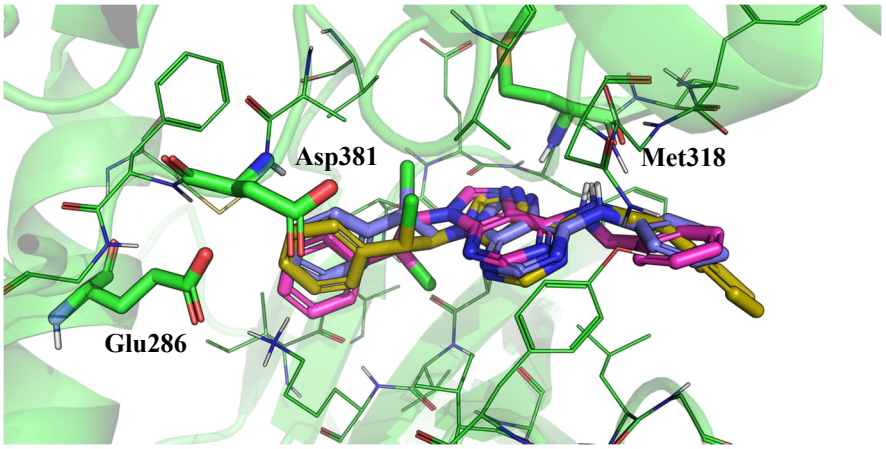


***Figura 32**. Binding mode dei composti **AC72_S** (in viola), **x_S** (in giallo) e **4a_S** (in fucsia).*

Lo studio di docking ha consentito di ottenere informazioni importanti sui requisiti strutturali necessari per l'ottimizzazione delle interazioni con il target, permettendo di indirizzare la sintesi futura verso nuovi analoghi imidazo-pirimidinici potenzialmente più attivi.

4. CONCLUSIONI

La LMC rappresenta la più grave forma di leucemia ed attualmente l'utilizzo di inibitori delle TKs rappresenta il trattamento di prima linea utilizzato. Nonostante i progressi ottenuti e lo sviluppo di diverse classi di inibitori si pone l'attenzione sulla necessità di trovare nuovi agenti in grado di superare lo sviluppo di resistenza che spesso si presenta durante la terapia. Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di tesi si occupa già da anni della sintesi di composti antitumorali quali inibitori ATP-competitivi delle tirosin-chinasi Abl e/o Src. In particolare, è stata sintetizzata una libreria di composti caratterizzati da uno *scaffold* pirazolo-pirimidinico variamente sostituito nelle posizioni N-1, C-4 e C-6. Molti di questi derivati hanno mostrato una potente attività inibitoria nei confronti di Abl e/o Src nel range micro-nanomolare di IC_{50} ed una promettente attività antitumorale sia *in vivo* che *in vitro* in diversi modelli tumorali in cui Abl e/o Src risultano deregolate. Inoltre, alcuni composti della serie avevano mostrato un'interessante attività inibitoria nei confronti della forma mutata Abl^{T315I}.

Sulla base degli ottimi risultati ottenuti dalla libreria *in-house* e con lo scopo di incrementare le informazioni di SAR, si è pensato di sintetizzare nuovi analoghi purinici mediante sostituzione isosterica del nucleo pirazolico con un nucleo imidazolico. In particolare, inizialmente ci si è focalizzati verso la sintesi solo degli analoghi purinici dei composti pirazolo-pirimidinici che avevano mostrato una Ki per Abl e Src inferiore o uguale a 3μM e caratterizzati dalla presenza di amine variamente sostituite in C-4, dalla catena 2-cloro-2-feniletilica in N-1 e non sostituiti in C-6. Questa scelta è stata anche avvalorata dal fatto che in letteratura sono riportati diversi derivati a struttura purinica 6,9-disostituiti come inibitori di Abl e/o Src. Inoltre, è stato dimostrato che l'assenza di un sostituente in posizione C-2 potrebbe favorire la selettività nei confronti della forma inattiva della chinasi Abl, ovvero la DFG-out, che è considerata la forma ottimale sulla quale agire. Dalla stessa libreria, sono stati inoltre selezionati composti pirazolo-pirimidinici con un linker vinilico in N-1 che avevano mostrato attività inibitoria esclusivamente verso Abl o Src. Lo scopo era studiare se la sostituzione del pirazolo con l'imidazolo fosse in grado di incrementare l'attività su una od entrambe le chinasi considerato che in letteratura erano stati riportati inibitori di Abl e/o Src a struttura purinica caratterizzati dalla presenza dello stesso gruppo vinilico in N-9. Inoltre, in

composti che si legavano alla conformazione DGF-out di Abl, il linker vinilico permetteva di superare l'ingombro sterico causato dal residuo di isoleucina, consentendo perciò l'inibizione anche della forma mutata Abl^{T315I}. Inoltre, tramite studi di molecular modelling era stata studiata l'interazione con Abl dei derivati pirazolo-pirimidinici non sostituiti in C-6 della libreria *in-house* ed in base ai risultati ottenuti la sostituzione isosterica del pirazolo con l'imidazolo non dovrebbe portare alla perdita delle caratteriste strutturali essenziali per l'interazione con la chinasi sia nella forma wild-type sia nella forma mutata T315I.

In questo contesto si è inserito il mio lavoro di tesi, che ha riguardato la sintesi degli analoghi purinici **4a-d** e **5a** non sostituiti alla posizione C-2, funzionalizzati al C-6 con benzilamina o benzilamine variamente sostituite ed all'N-9 rispettivamente con la catena 2-cloro-2-feniletilica o un linker vinilico, con l'obiettivo di valutarne inizialmente la potenziale attività inibitoria nei confronti di Abl^{wt}.

Sono attualmente in corso i saggi di inibizione nei confronti della chinasi a cui seguiranno, sui composti più attivi, test su cellule di LMC che esprimono l'oncogene *Bcr-Abl* e test enzimatici sulla forma mutata Abl^{T315I}. Inoltre, sono stati conclusi studi computazionali al fine di ottenere maggiori informazioni sul *binding mode* dei nuovi analoghi sintetizzati, utilizzando una struttura cristallografica in cui l'inibitore **AP24283**, già noto in letteratura come inibitore duale Abl/Src, è cristallizzato nel sito catalitico di Abl (PDB code 3kf4). Per ciascun enantiomero dei composti chirali sintetizzati **4a-d** e per il composto **5a**, sono state generate 30 pose diverse. Di queste sono state valutate positivamente quelle che si sovrapponevano in maniera ottimale con la struttura imidazo-pirimidinica dell'inibitore preso come riferimento, in modo tale da permettere la formazione dei legami ad idrogeno essenziali con il residuo di M318.

Analizzando le pose, si evince che gli enantiomeri S di ogni composto hanno un numero maggiore di pose sovrapponibili ad **AP24283** rispetto agli enantiomeri R. Nonostante questo, le pose di docking dei due enantiomeri sono risultati comparabili.

Gli analoghi più interessanti che sono emersi dallo studio *in silico* sono il **4a**_S (33,33%) e il **4d**_S (40%). Inoltre, il composto **4a**_S ed il suo corrispondente analogo vinilico **5a** mostrano pose comparabili. Infine, è stato evidenziato che i derivati purinici

precedentemente sintetizzati caratterizzati dalla presenza in C-6 dell'anilina o aniline variamente sostituite, così come gli analoghi da sintetizzare che presentano la feniletilamina e la feniletilamina *p*-metil sostituita, riportano percentuali di pose migliori rispetto ai derivati caratterizzati da benzilamine nella stessa posizione.

Lo studio di docking si è rivelato fondamentale nella previsione di un'ipotetica attività inibitoria dei composti sintetizzati verso Abl ed ha permesso l'acquisizione di informazioni fondamentali al fine di ottimizzare l'interazione di futuri analoghi con il target biologico.

5. PARTE SPERIMENTALE

I punti di fusione sono stati determinati con Buchi B-540. Gli spettri ^{1}H NMR (400 MHz) e ^{13}C NMR (101 MHz) sono stati registrati in dimetilsolfossido deuterato (DMSO-D_6) utilizzando un apparecchio JEOL JNM ECZ-400S/L1 FT, δ in ppm, *J* in Hz. Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N con un analizzatore elementare Thermo Scientific Flash 2000; i risultati analitici sono compresi nell'intervallo ± 0.4% rispetto ai valori teorici. La purificazione per cromatografia è stata eseguita in colonna impaccata con gel di silice 60 Å, con particelle delle dimensioni di 220-440 mesh.

Sintesi del 2-((5-amino-6-cloropirimidin-4-il)amino)-1-feniletan-1-olo (8) [108]

Ad una soluzione di 4,6-dicloropirimidin-5-ammina **6** (2.0 g, 12.2 mmol) in 1-propanolo (42 mL) si aggiungono trietilammina (1.8 mL, 13.0 mmol) ed il 2-amino-1-feniletan-1-olo **7** (2.4 g, 17.4 mmol). La miscela di reazione è posta a riflusso per 24 h. Successivamente, dopo raffreddamento, il solvente di reazione è evaporato a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice usando etilacetato (EtOAc) come solvente di eluizione, ottenendo il composto 2-((5-amino-6-cloropirimidin-4-il)amino)-1-feniletan-1-olo **8** desiderato.

Pf: 168-169 °C; resa: 90%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 7.71 (s, 1H, NH), 7.35-7.28 (m, 4H, Ar), 7.23-7.19 (m,1H, Ar), 6.96 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, Ar), 5.51 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, OH), 5.04 (bs, 2H, NH_2), 4.76 (dt, *J* = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 3.65-3.60 (m, 1H), 3.37-3.32 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 152.53, 146.09, 144.42, 137.26, 128.60, 127.57, 126.49, 124.20, 71.16, 49.64. Anal. Calcd. per $C_{12}H_{13}ClN_4O$; C, 54.45; H, 4.95; N, 21.17. Trovata: C, 54.25; H, 4.71; N, 21.01.

Sintesi del 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il)-1-feniletan-1-olo (9) [109]

Ad una soluzione di 2-((5-amino-6-cloropirimidin-4-il)amino)-1-feniletan-1-olo **8** (1.0 g, 3.8 mmol) si aggiungono trietil-ortoformiato (31.5 mL) ed acido *p*-toluensolfonico (0.78 g, 4.5 mmol). La miscela di reazione viene posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Si ottiene così un precipitato che viene filtrato e successivamente trattato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) (15 mL). Si procede con estrazione, utilizzando EtOAc (3 x 15 mL); la fase organica viene quindi essiccata con solfato di sodio (Na_2SO_4) anidro. Dopo filtrazione ed evaporazione del solvente a pressione ridotta si ottiene il composto 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il)-1-feniletan-1-olo **9** che viene utilizzato nello step di reazione successivo senza ulteriori purificazioni.

Pf: 142-144°C; resa: 82%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.72 (s, 1H, Ar), 8.56 (s, 1H, Ar), 7.34-7.27 (m, 4H, Ar), 7.25-7.21 (s, 1H, Ar), 5.79 (d, J = 4.5 Hz, 2H, OH), 5.01 (dt, J = 8.4, 4.1 Hz, 1H), 4.43 (dd, J = 13.9, 4.1 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 13.9, 8.4 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 152.69, 151.96, 149.33, 148.55, 142.36, 131.13, 128.81, 128.17, 126.47, 70.94, 51.53. Anal. Calcd. per $C_{13}H_{11}ClN_4O$; C, 56.84; H, 4.04; N, 20.40. Trovata: C, 56.60; H, 4.27; N, 20.19.

Sintesi della 6-cloro-9-(2-cloro-2-feniletil)-9*H*-purina (10)

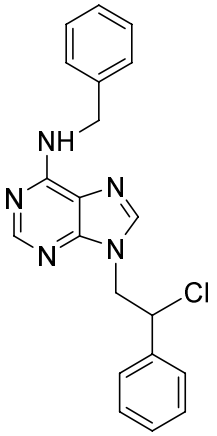
Nel pallone di reazione si mette la *N, N*-dimetilformammide (DMF) anidra (0.73 mL, 9.44 mmol) e si aggiunge ossicloruro di fosforo goccia a goccia (0.43 mL, 4.56 mmol). Il pallone di reazione è posto sotto agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti. Si aggiunge quindi una soluzione del 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il)-1-feniletan-1-olo **9** (0.30 g, 1.09 mmol) in cloroformio (30 mL) e si pone a riflusso per 2 ore. Dopo raffreddamento, si procede con un lavaggio con acqua (30 mL), si separa la fase organica e si essicca con Na_2SO_4 anidro. Dunque, si filtra e si evapora il solvente a pressione ridotta in modo tale da ottenere il composto 6-cloro-9-(2-cloro-2-feniletil)-9*H*-purina **10** desiderato con una resa del 99%. L'intermedio viene utilizzato nel prossimo step senza ulteriori purificazioni.

Pf: 114-115°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.76 (s, 1H, Ar), 8.65 (s, 1H, Ar), 7.48-7.46 (m, 2H, Ar), 7.39- 7.31 (m, 3H, Ar), 5.69 (dd, J = 8.9, 5.7 Hz, 1H), 4.95 (dd, J = 14.5, 8.9 Hz, 1H), 4.84 (dd, J = 14.5, 5.7 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 152.47, 152.31, 149.69, 148.01, 138.01, 131.06, 129.78, 129.42, 127.99, 60.86, 50.46. Anal. Calcd. per $C_{13}H_{10}Cl_2N_4$; C, 53.26; H, 3.44; N, 19.11. Trovata: C, 53.47; H, 3.23; N, 19.35.

Sintesi dei derivati purinici 4a-d

Ad una soluzione dell'intermedio chiave 6-cloro-9-(2-cloro-2-feniletil)-9*H*-purina **10** (0.1 g, 0.34 mmol) in toluene (5 mL) si aggiunge l'opportuna benzilamina (4 eq.) e la reazione si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 h. Il solvente di reazione viene evaporato a pressione ridotta ed il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice utilizzando EtOAc come solvente di eluizione per ottenere i derivati purinici **4a-d** desiderati.

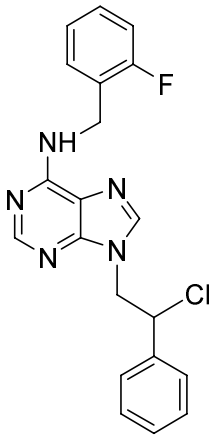
Sintesi della *N*-benzil-9-(2-cloro-2-feniletil)-9*H*-purin-6-amina (4a)



Pf: 199-200°C, resa: 49%; ammina: benzilamina (0.15 mL); ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.33 (bs, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, Ar), 8.07 (s, 1H, Ar), 7.48-7.47 (m, 2H, Ar), 7.38-7.33 (m, 3H, Ar), 7.30-7.23 (m, 4H, Ar), 7.18-7.14 (m, 1H, Ar), 5.63 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 14.3, 8.9 Hz, 1H), 4.71-4.65 (m, 3H, CH + CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 154.86, 153.11, 149.47, 141.37, 140.63, 138.38, 129.67, 129.40, 128.74,

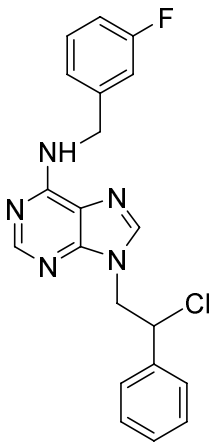
128.02, 127.71, 127.15, 119.34, 61.03, 49.87, 43.42. Anal. Calcd. per $C_{20}H_{18}ClN_5$; C, 66.02; H, 4.99; N, 19.25. Trovata: C, 65.90; H, 5.10; N, 19.41.

Sintesi della 9-(2-cloro-2-feniletil)-*N*-(2-fluorobenzil)-9*H*-purin-6-amina (4b)



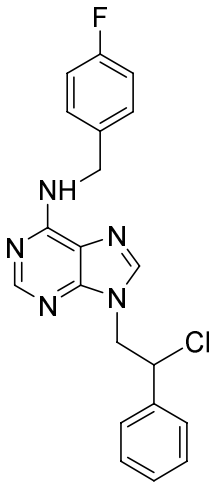
Pf: 156-157°C, resa: 62%; ammina: *o*-fluoro benzilamina (0.16 mL); ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.21 (bs, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, Ar), 8.09 (s, 1H, Ar), 7.49-7.47 (m, 2H, Ar), 7.39-7.33 (m, 3H, Ar), 7.31-7.20 (m, 2H, Ar), 7.15-7.05 (m, 2H, Ar), 5.64 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 4.80 (dd, J = 14.4, 8.9 Hz, 1H), 4.72-4.67 (m, 3H, CH + CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 160.54 (d, J = 243.8 Hz), 154.83, 153.08, 149.54, 141.55, 138.37, 129.67, 129.40, 129.10 (d, J = 8.1 Hz), 128.02, 127.22, 127.07, 124.77 (d, J = 3.4 Hz), 119.43, 115.53 (d, J = 21.1 Hz), 61.04, 49.89, 37.29. Anal. Calcd. per $C_{20}H_{17}ClFN_5$; C, 62.91; H, 4.49; N, 18.34. Trovata: C, 63.05; H, 4.33; N, 18.44.

Sintesi della 9-(2-cloro-2-feniletil)-*N*-(3-fluorobenzil)-9*H*-purin-6-amina (4c)



Pf: 182-183°C, resa: 48%; ammina: *m*-fluoro benzilamina (0.16 mL); ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.38 (bs, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, Ar), 8.09 (s, 1H, Ar), 7.49-7.46 (m, 2H, Ar), 7.39-7.27 (m, 4H, Ar), 7.15-7.08 (m, 2H, Ar), 7.00 (td, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 5.63 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 14.4, 8.9 Hz, 1H), 4.72-4.67 (m, 3H, CH + CH_2), ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 162.71 (d, J = 243.2 Hz), 154.76, 153.09, 149.54, 143.75, 141.53, 138.37, 130.70 (d, J = 8.2 Hz), 129.66, 129.39, 128.02, 123.68 (d, J = 2.6 Hz), 119.37, 114.32 (d, J = 21.4 Hz), 113.93 (d, J = 20.7 Hz), 61.03, 49.89, 43.03. Anal. Calcd. per $C_{20}H_{17}ClFN_5$; C, 62.91; H, 4.49; N, 18.34. Trovata: C, 62.75; H, 4.36; N, 18.23.

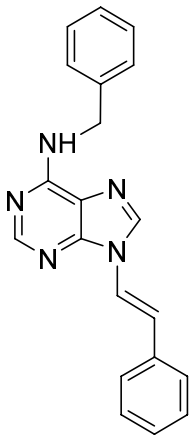
Sintesi della 9-(2-cloro-2-feniletil)-*N*-(4-fluorobenzil)-9*H*-purin-6-amina (4d)



Pf: 176-178°C, resa: 42%, ammina: *p*-fluoro benzilamina (0.16 mL); ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.32 (bs, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, Ar), 8.07 (s, 1H, Ar), 7.48-7.46 (m, 2H, Ar), 7.38-7.32 (m, 5H, Ar), 7.07 (t, J = 8.9 Hz, 2H, Ar), 5.63 (dd, J = 8.9, 5.8 Hz, 1H), 4.79 (dd, J = 14.3, 8.9 Hz, 1H), 4.72-4.63 (m, 3H, CH + CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 161.63 (d, J = 241.9 Hz), 154.75, 153.10, 149.52, 141.43, 138.37, 136.79, 129.71 (d, J = 8.1 Hz), 129.67, 129.39, 128.02, 119.35, 115.45 (d, J = 21.3 Hz), 61.03, 49.88, 42.76. Anal. Calcd. per $C_{20}H_{17}ClFN_5$; C, 62.91; H, 4.49; N, 18.34. Trovata: C, 62.75; H, 4.34; N, 18.11.

Sintesi della (E)-*N*-benzil-9-stiril-9*H*-purin-6-amina (5a)

Ad una soluzione di *N*-benzil-9-(2-cloro-2-feniletil)-9*H*-purin-6-amina **4a** (0.1 g, 0.3 mmol) in etanolo (3 mL) si aggiunge idrossido di sodio (0.3 g, 7.2 mmol) in acqua (3 mL) e si pone la reazione a riflusso per 5 h. Dopo raffreddamento, il solvente di reazione viene evaporato sottovuoto e il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su gel di silice utilizzando una miscela EP:EtOAc (1/1) come solvente di eluizione per ottenere il derivato purinico **5a** desiderato.



Pf: 183-184 °C, resa: 43%; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) δ 8.52-8.50 (m, 1H, NH + Ar), 8.29 (s, 1H, Ar), 7.87 (d, J = 14.8 Hz, 1H, CH=), 7.62 (d, J = 14.8 Hz, 1H, CH=), 7.55-7.52 (m, 2H, Ar), 7.37 (t, J = 7.7 Hz, 2H, Ar), 7.33-7.31 (m, 2H, Ar), 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 3H, Ar), 7.20-7.15 (m, 1H, Ar), 4.69 (bs, 2H, CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-D_6) δ 154.98, 153.69, 148.68, 140.49, 139.72, 135.55, 129.46, 128.77, 128.30, 127.70, 127.19, 126.68, 121.74, 120.19, 119.77, 43.44. Anal. Calcd. per. $C_{20}H_{17}N_5$; C, 73.37; H, 5.23; N, 21.39. Trovata: C, 73.21; H, 5.04; N, 21.23.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] E. Gunsilius, G. Gastl, A.L. Petzer, Hematopoietic stem cells, Biomed Pharmacother 55 (2001) 186–194. https://doi.org/10.1016/s0753-3322(01)00051-8.

[2] Leucemia: Sintomi, prevenzione, cause, diagnosi | AIRC, (n.d.). https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/leucemia (accessed April 24, 2025).

[3] T. Lightfoot, A. Smith, E. Roman, Leukemia, in: S.R. Quah (Ed.), International Encyclopedia of Public Health (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2017: pp. 410–418. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00253-8.

[4] A. Chennamadhavuni, V. Lyengar, S.K.R. Mukkamalla, A. Shimanovsky, Leukemia, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/ (accessed April 24, 2025).

[5] Chronic Myeloid Leukemia Treatment - NCI, (2025). https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cml-treatment-pdq (accessed April 24, 2025).

[6] P.R. Dharampuriya, G. Scapin, C. Wong, K. John Wagner, J.L. Cillis, D.I. Shah, Tracking the origin, development, and differentiation of hematopoietic stem cells, Current Opinion in Cell Biology 49 (2017) 108–115. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.002.

[7] T. Lightfoot, A. Smith, E. Roman, Leukemia, in: H.K. (Kris) Heggenhougen (Ed.), International Encyclopedia of Public Health, Academic Press, Oxford, 2008: pp. 74–83. https://doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00251-3.

[8] I numeri del cancro in Italia 2023 | Associazione Italiana Registri Tumori, (n.d.). https://www.registri-tumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2023 (accessed April 24, 2025).

[9] C. Rozman, E. Montserrat, Chronic lymphocytic leukemia, N Engl J Med 333 (1995) 1052–1057. https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331606.

[10] H. Zeeb, M. Blettner, Adult leukaemia: what is the role of currently known risk factors?, Radiat Environ Biophys 36 (1998) 217–228. https://doi.org/10.1007/s004110050075.

[11] A. Baruchel, J.-P. Bourquin, J. Crispino, S. Cuartero, H. Hasle, J. Hitzler, J.-H. Klusmann, S. Izraeli, A.A. Lane, S. Malinge, K.R. Rabin, I. Roberts, S. Ryeom, S.K. Tasian, E. Wagenblast, Down syndrome and leukemia: from basic mechanisms to clinical advances, Haematologica 108 (2023) 2570–2581. https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283225.

[12] L.L. Robison, Down syndrome and leukemia, Leukemia 6 Suppl 1 (1992) 5–7.

[13] A. Khalade, M.S. Jaakkola, E. Pukkala, J.J.K. Jaakkola, Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, Environ Health 9 (2010) 31. https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-31.

[14] F. Marino-Merlo, S. Grelli, A. Mastino, M. Lai, P. Ferrari, A. Nicolini, M. Pistello, B. Macchi, Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Oncogenesis between Active

Expression and Latency: A Possible Source for the Development of Therapeutic Targets, Int J Mol Sci 24 (2023) 14807. https://doi.org/10.3390/ijms241914807.

[15] E. Jabbour, H. Kantarjian, Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring, American Journal of Hematology 99 (2024) 2191–2212. https://doi.org/10.1002/ajh.27443.

[16] E. Jabbour, H. Kantarjian, Chronic Myeloid Leukemia: A Review, JAMA (2025). https://doi.org/10.1001/jama.2025.0220.

[17] J.E. Cortes, M. Talpaz, S. O'Brien, S. Faderl, G. Garcia-Manero, A. Ferrajoli, S. Verstovsek, M.B. Rios, J. Shan, H.M. Kantarjian, Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal, Cancer 106 (2006) 1306–1315. https://doi.org/10.1002/cncr.21756.

[18] E. Vuelta, I. García-Tuñón, P. Hernández-Carabias, L. Méndez, M. Sánchez-Martín, Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy, Biology (Basel) 10 (2021) 118. https://doi.org/10.3390/biology10020118.

[19] D. Cella, C.J. Nowinski, O. Frankfurt, The impact of symptom burden on patient quality of life in chronic myeloid leukemia, Oncology 87 (2014) 133–147. https://doi.org/10.1159/000362816.

[20] M. El-Tanani, H. Nsairat, I.I. Matalka, Y.F. Lee, M. Rizzo, A.A. Aljabali, V. Mishra, Y. Mishra, A. Hromić-Jahjefendić, M.M. Tambuwala, The impact of the BCR-ABL oncogene in the pathology and treatment of chronic myeloid leukemia, Pathol Res Pract 254 (2024) 155161. https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155161.

[21] D. Diekmann, S. Brill, M.D. Garrett, N. Totty, J. Hsuan, C. Monfries, C. Hall, L. Lim, A. Hall, Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac, Nature 351 (1991) 400–402. https://doi.org/10.1038/351400a0.

[22] BCR BCR activator of RhoGEF and GTPase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI, (n.d.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&list_uids=613#gene-expression (accessed April 24, 2025).

[23] J.Y.J. Wang, The capable ABL: what is its biological function?, Mol Cell Biol 34 (2014) 1188–1197. https://doi.org/10.1128/MCB.01454-13.

[24] Definition of Philadelphia chromosome - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI, (2011). https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome (accessed April 24, 2025).

[25] J.D. Rowley, Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, Nature 243 (1973) 290–293. https://doi.org/10.1038/243290a0.

[26] C.L. Sawyers, Chronic myeloid leukemia, N Engl J Med 340 (1999) 1330–1340. https://doi.org/10.1056/NEJM199904293401706.

[27] A.S. Advani, A.M. Pendergast, Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects, Leuk Res 26 (2002) 713–720. https://doi.org/10.1016/s0145-2126(01)00197-7.

[28] Z.-J. Kang, Y.-F. Liu, L.-Z. Xu, Z.-J. Long, D. Huang, Y. Yang, B. Liu, J.-X. Feng, Y.-J. Pan, J.-S. Yan, Q. Liu, The Philadelphia chromosome in leukemogenesis, Chin J Cancer 35 (2016) 48. https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0.

[29] Y. Liu, L.A. Witucki, K. Shah, A.C. Bishop, K.M. Shokat, Src-Abl tyrosine kinase chimeras: replacement of the adenine binding pocket of c-Abl with v-Src to swap nucleotide and inhibitor specificities, Biochemistry 39 (2000) 14400–14408. https://doi.org/10.1021/bi000437j.

[30] O. Hantschel, G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases, Nat Rev Mol Cell Biol 5 (2004) 33–44. https://doi.org/10.1038/nrm1280.

[31] N.M. Levinson, O. Kuchment, K. Shen, M.A. Young, M. Koldobskiy, M. Karplus, P.A. Cole, J. Kuriyan, A Src-like inactive conformation in the abl tyrosine kinase domain, PLoS Biol 4 (2006) e144. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040144.

[32] J.M. Goldman, J.V. Melo, BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work?, Acta Haematol 119 (2008) 212–217. https://doi.org/10.1159/000140633.

[33] K. Dorey, J.R. Engen, J. Kretzschmar, M. Wilm, G. Neubauer, T. Schindler, G. Superti-Furga, Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase, Oncogene 20 (2001) 8075–8084. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205017.

[34] A.A. Mian, M. Schüll, Z. Zhao, C. Oancea, A. Hundertmark, T. Beissert, O.G. Ottmann, M. Ruthardt, The gatekeeper mutation T315I confers resistance against small molecules by increasing or restoring the ABL-kinase activity accompanied by aberrant transphosphorylation of endogenous BCR, even in loss-of-function mutants of BCR/ABL, Leukemia 23 (2009) 1614–1621. https://doi.org/10.1038/leu.2009.69.

[35] K. Huang, Y.-H. Wang, A. Brown, G. Sun, Identification of N-terminal lobe motifs that determine the kinase activity of the catalytic domains and regulatory strategies of Src and Csk protein tyrosine kinases, J Mol Biol 386 (2009) 1066–1077. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.012.

[36] J.S. Tokarski, J.A. Newitt, C.Y.J. Chang, J.D. Cheng, M. Wittekind, S.E. Kiefer, K. Kish, F.Y.F. Lee, R. Borzillerri, L.J. Lombardo, D. Xie, Y. Zhang, H.E. Klei, The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants, Cancer Res 66 (2006) 5790–5797. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4187.

[37] S.S. Taylor, A.P. Kornev, Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, Trends Biochem Sci 36 (2011) 65–77. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006.

[38] S.T. Brady, L.-F. Lau, Chapter 26 - Tyrosine Phosphorylation, in: S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, D.L. Price (Eds.), Basic Neurochemistry (Eighth Edition), Academic Press, New York, 2012: pp. 493–513. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00026-2.

[39] P. Wu, T.E. Nielsen, M.H. Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, Trends Pharmacol Sci 36 (2015) 422–439. https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005.

[40] M. Tong, M.A. Seeliger, Targeting conformational plasticity of protein kinases, ACS Chem Biol 10 (2015) 190–200. https://doi.org/10.1021/cb500870a.

[41] F. Rossari, F. Minutolo, E. Orciuolo, Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy, J Hematol Oncol 11 (2018) 84. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0624-2.

[42] S.W. Cowan-Jacob, Structural biology of protein tyrosine kinases, Cell Mol Life Sci 63 (2006) 2608–2625. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6202-8.

[43] S. Soverini, M. Mancini, L. Bavaro, M. Cavo, G. Martinelli, Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy, Mol Cancer 17 (2018) 49. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0780-6.

[44] Y.-L. Pan, S.-X. Zeng, R.-R. Hao, M.-H. Liang, Z.-R. Shen, W.-H. Huang, The progress of small-molecules and degraders against BCR-ABL for the treatment of CML, Eur J Med Chem 238 (2022) 114442. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114442.

[45] C. Sillaber, F. Gesbert, D.A. Frank, M. Sattler, J.D. Griffin, STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells, Blood 95 (2000) 2118–2125.

[46] M. Sattler, J.D. Griffin, Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene, Semin Hematol 40 (2003) 4–10. https://doi.org/10.1053/shem.2003.50034.

[47] S. Chu, L. Li, H. Singh, R. Bhatia, BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia, Cancer Res 67 (2007) 7045–7053. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4312.

[48] D. Cilloni, G. Saglio, Molecular pathways: BCR-ABL, Clin Cancer Res 18 (2012) 930–937. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1613.

[49] F. Ravandi, P. Kebriaei, Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, Hematol Oncol Clin North Am 23 (2009) 1043–1063, vi. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.007.

[50] R. Hehlmann, U. Berger, A. Hochhaus, Chronic myeloid leukemia: a model for oncology, Ann Hematol 84 (2005) 487–497. https://doi.org/10.1007/s00277-005-1039-z.

[51] R. Hehlmann, Chronic Myeloid Leukemia in 2020, Hemasphere 4 (2020) e468. https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000468.

[52] D. Andorsky, V. Kota, K. Sweet, Exploring treatment decision-making in chronic myeloid leukemia in chronic phase, Front Oncol 14 (2024) 1369246. https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1369246.

[53] La sopravvivenza dei pazienti oncologici in italia, E&P 41 (2017) 1–244. https://doi.org/10.19191/EP17.2S1.P001.017.

[54] A. Hochhaus, S. Kreil, A.S. Corbin, P. La Rosée, M.C. Müller, T. Lahaye, B. Hanfstein, C. Schoch, N.C.P. Cross, U. Berger, H. Gschaidmeier, B.J. Druker, R.

Hehlmann, Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy, Leukemia 16 (2002) 2190–2196. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402741.

[55] M.E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P.N. Rao, C.L. Sawyers, Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, Science 293 (2001) 876–880. https://doi.org/10.1126/science.1062538.

[56] N.P. Shah, Loss of response to imatinib: mechanisms and management, Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2005) 183–187. https://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.183.

[57] E. Weisberg, J.D. Griffin, Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines, Blood 95 (2000) 3498–3505.

[58] S.W. Cowan-Jacob, V. Guez, G. Fendrich, J.D. Griffin, D. Fabbro, P. Furet, J. Liebetanz, J. Mestan, P.W. Manley, Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment, Mini Rev Med Chem 4 (2004) 285–299. https://doi.org/10.2174/1389557043487321.

[59] J.V. Melo, C. Chuah, Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia, Cancer Lett 249 (2007) 121–132. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.07.010.

[60] J.F. Apperley, Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia, Lancet Oncol 8 (2007) 1018–1029. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70342-X.

[61] J.F. Apperley, Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia, Lancet Oncol 8 (2007) 1116–1128. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70379-0.

[62] J. Cools, C. Maertens, P. Marynen, Resistance to tyrosine kinase inhibitors: calling on extra forces, Drug Resist Updat 8 (2005) 119–129. https://doi.org/10.1016/j.drup.2005.04.005.

[63] Y. Zhang, X. Wu, X. Sun, J. Yang, C. Liu, G. Tang, X. Lei, H. Huang, J. Peng, The Progress of Small Molecule Targeting BCR-ABL in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia, Mini Rev Med Chem 24 (2024) 642–663. https://doi.org/10.2174/0113895575218335230926070130.

[64] R.S.K. Vijayan, P. He, V. Modi, K.C. Duong-Ly, H. Ma, J.R. Peterson, R.L. Dunbrack, R.M. Levy, Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors, J Med Chem 58 (2015) 466–479. https://doi.org/10.1021/jm501603h.

[65] M. Henkes, H. van der Kuip, W.E. Aulitzky, Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec®, Gleevec™), Ther Clin Risk Manag 4 (2008) 163–187.

[66] T. Sacha, Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview, Mediterr J Hematol Infect Dis 6 (2014) e2014007. https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.007.

[67] F.W. Fraunfelder, J. Solomon, B.J. Druker, B. Esmaeli, J. Kuyl, Ocular side-effects associated with imatinib mesylate (Gleevec), J Ocul Pharmacol Ther 19 (2003) 371–375. https://doi.org/10.1089/108076803322279426.

[68] R. Capdeville, E. Buchdunger, J. Zimmermann, A. Matter, Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug, Nat Rev Drug Discov 1 (2002) 493–502. https://doi.org/10.1038/nrd839.

[69] Z. Gagic, D. Ruzic, N. Djokovic, T. Djikic, K. Nikolic, In silico Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs, Front Chem 7 (2019) 873. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00873.

[70] H. Kantarjian, N.P. Shah, A. Hochhaus, J. Cortes, S. Shah, M. Ayala, B. Moiraghi, Z. Shen, J. Mayer, R. Pasquini, H. Nakamae, F. Huguet, C. Boqué, C. Chuah, E. Bleickardt, M.B. Bradley-Garelik, C. Zhu, T. Szatrowski, D. Shapiro, M. Baccarani, Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, N Engl J Med 362 (2010) 2260–2270. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002315.

[71] W.-S. Huang, X. Zhu, Y. Wang, M. Azam, D. Wen, R. Sundaramoorthi, R.M. Thomas, S. Liu, G. Banda, S.P. Lentini, S. Das, Q. Xu, J. Keats, F. Wang, S. Wardwell, Y. Ning, J.T. Snodgrass, M.I. Broudy, K. Russian, G.Q. Daley, J. Iuliucci, D.C. Dalgarno, T. Clackson, T.K. Sawyer, W.C. Shakespeare, 9-(Arenethenyl)purines as dual Src/Abl kinase inhibitors targeting the inactive conformation: design, synthesis, and biological evaluation, J Med Chem 52 (2009) 4743–4756. https://doi.org/10.1021/jm900166t.

[72] L.J. Lombardo, F.Y. Lee, P. Chen, D. Norris, J.C. Barrish, K. Behnia, S. Castaneda, L.A.M. Cornelius, J. Das, A.M. Doweyko, C. Fairchild, J.T. Hunt, I. Inigo, K. Johnston, A. Kamath, D. Kan, H. Klei, P. Marathe, S. Pang, R. Peterson, S. Pitt, G.L. Schieven, R.J. Schmidt, J. Tokarski, M.-L. Wen, J. Wityak, R.M. Borzilleri, Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4- ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays, J Med Chem 47 (2004) 6658–6661. https://doi.org/10.1021/jm049486a.

[73] N.P. Shah, C. Tran, F.Y. Lee, P. Chen, D. Norris, C.L. Sawyers, Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor, Science 305 (2004) 399–401. https://doi.org/10.1126/science.1099480.

[74] M. Baccarani, M.W. Deininger, G. Rosti, A. Hochhaus, S. Soverini, J.F. Apperley, F. Cervantes, R.E. Clark, J.E. Cortes, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, T.P. Hughes, H.M. Kantarjian, D.-W. Kim, R.A. Larson, J.H. Lipton, F.-X. Mahon, G. Martinelli, J. Mayer, M.C. Müller, D. Niederwieser, F. Pane, J.P. Radich, P. Rousselot, G. Saglio, S. Saußele, C. Schiffer, R. Silver, B. Simonsson, J.-L. Steegmann, J.M. Goldman, R. Hehlmann, European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, Blood 122 (2013) 872–884. https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569.

[75] G. Wei, S. Rafiyath, D. Liu, First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib, Journal of Hematology & Oncology 3 (2010) 47. https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-47.

[76] T. Sacha, G. Saglio, Nilotinib in the treatment of chronic myeloid leukemia, Future Oncol 15 (2019) 953–965. https://doi.org/10.2217/fon-2018-0468.

[77] E. Weisberg, L. Catley, R.D. Wright, D. Moreno, L. Banerji, A. Ray, P.W. Manley, J. Mestan, D. Fabbro, J. Jiang, E. Hall-Meyers, L. Callahan, J.L. DellaGatta, A.L. Kung, J.D. Griffin, Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias, Blood 109 (2007) 2112–2120. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-026377.

[78] B. Biswas, Y.-H. Huang, D.J. Craik, C.K. Wang, The prospect of substrate-based kinase inhibitors to improve target selectivity and overcome drug resistance, Chem Sci 15 (2024) 13130–13147. https://doi.org/10.1039/d4sc01088d.

[79] S. Leak, G.A. Horne, M. Copland, Targeting BCR-ABL1-positive leukaemias: a review article, Camb Prism Precis Med 1 (2023) e21. https://doi.org/10.1017/pcm.2023.9.

[80] H. Haguet, J. Douxfils, C. Chatelain, C. Graux, F. Mullier, J.-M. Dogné, BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors: Which Mechanism(s) May Explain the Risk of Thrombosis?, TH Open 2 (2018) e68–e88. https://doi.org/10.1055/s-0038-1624566.

[81] M. Breccia, G. Alimena, Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors (Tki) as Salvage Therapy for Resistant or Intolerant Patients to Prior TKIs, Mediterr J Hematol Infect Dis 6 (2014) e2014003. https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.003.

[82] C. Gambacorti-Passerini, T.H. Brümmendorf, D.-W. Kim, A.G. Turkina, T. Masszi, S. Assouline, S. Durrant, H.M. Kantarjian, H.J. Khoury, A. Zaritskey, Z.-X. Shen, J. Jin, E. Vellenga, R. Pasquini, V. Mathews, F. Cervantes, N. Besson, K. Turnbull, E. Leip, V. Kelly, J.E. Cortes, Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24-month follow-up, Am J Hematol 89 (2014) 732–742. https://doi.org/10.1002/ajh.23728.

[83] J. Wehrle, H.L. Pahl, N. von Bubnoff, Ponatinib: a third-generation inhibitor for the treatment of CML, Recent Results Cancer Res 201 (2014) 99–107. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_5.

[84] Y. Gao, Y. Ding, X.-R. Tai, C. Zhang, D. Wang, Ponatinib: An update on its drug targets, therapeutic potential and safety, Biochim Biophys Acta Rev Cancer 1878 (2023) 188949. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188949.

[85] T. O'Hare, W.C. Shakespeare, X. Zhu, C.A. Eide, V.M. Rivera, F. Wang, L.T. Adrian, T. Zhou, W.-S. Huang, Q. Xu, C.A. Metcalf, J.W. Tyner, M.M. Loriaux, A.S. Corbin, S. Wardwell, Y. Ning, J.A. Keats, Y. Wang, R. Sundaramoorthi, M. Thomas, D. Zhou, J. Snodgrass, L. Commodore, T.K. Sawyer, D.C. Dalgarno, M.W.N. Deininger, B.J. Druker, T. Clackson, AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance, Cancer Cell 16 (2009) 401–412. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.028.

[86] Ariad suspends ponatinib sales, Cancer Discov 4 (2014) 6–7. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2013-163.

[87] N. Koo, E.J. Lee, M.J. Kim, M. Park, K.-R. Lee, Y.-J. Chae, Quality by design-based approach for the development of an analytical method for quantifying ponatinib in rat plasma, Heliyon 10 (2024) e38637. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38637.

[88] E.L. Atallah, M.J. Mauro, K. Sasaki, M.Y. Levy, P. Koller, D. Yang, D. Laine, J. Sabo, E. Gu, J.E. Cortes, Dose-escalation of second-line and first-line asciminib in chronic myeloid leukemia in chronic phase: the ASC2ESCALATE Phase II trial, Future Oncol 20 (2024) 3065–3075. https://doi.org/10.1080/14796694.2024.2402680.

[89] P.W. Manley, L. Barys, S.W. Cowan-Jacob, The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase, Leuk Res 98 (2020) 106458. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106458.

[90] E.-J. Choi, Asciminib: the first-in-class allosteric inhibitor of BCR::ABL1 kinase, Blood Res 58 (2023) S29–S36. https://doi.org/10.5045/br.2023.2023017.

[91] T. O'Hare, R. Pollock, E.P. Stoffregen, J.A. Keats, O.M. Abdullah, E.M. Moseson, V.M. Rivera, H. Tang, C.A. Metcalf, R.S. Bohacek, Y. Wang, R. Sundaramoorthi, W.C. Shakespeare, D. Dalgarno, T. Clackson, T.K. Sawyer, M.W. Deininger, B.J. Druker, Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML, Blood 104 (2004) 2532–2539. https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1851.

[92] M. Azam, V. Nardi, W.C. Shakespeare, C.A. Metcalf, R.S. Bohacek, Y. Wang, R. Sundaramoorthi, P. Sliz, D.R. Veach, W.G. Bornmann, B. Clarkson, D.C. Dalgarno, T.K. Sawyer, G.Q. Daley, Activity of dual SRC-ABL inhibitors highlights the role of BCR/ABL kinase dynamics in drug resistance, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 9244–9249. https://doi.org/10.1073/pnas.0600001103.

[93] J. Bertrand, H. Dostálová, V. Krystof, R. Jorda, A. Castro, J. Mella, C. Espinosa-Bustos, A. María Zarate, C.O. Salas, New 2,6,9-trisubstituted purine derivatives as Bcr-Abl and Btk inhibitors and as promising agents against leukemia, Bioorg Chem 94 (2020) 103361. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103361.

[94] T. Delgado, D. Veselá, H. Dostálová, V. Kryštof, V. Vojáčková, R. Jorda, A. Castro, J. Bertrand, G. Rivera, M. Faúndez, M. Strnad, C. Espinosa-Bustos, C.O. Salas, New Inhibitors of Bcr-Abl Based on 2,6,9-Trisubstituted Purine Scaffold Elicit Cytotoxicity in Chronic Myeloid Leukemia-Derived Cell Lines Sensitive and Resistant to TKIs, Pharmaceutics 16 (2024) 649. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050649.

[95] T. Zhou, L. Commodore, W.-S. Huang, Y. Wang, T.K. Sawyer, W.C. Shakespeare, T. Clackson, X. Zhu, D.C. Dalgarno, Structural analysis of DFG-in and DFG-out dual Src-Abl inhibitors sharing a common vinyl purine template, Chem Biol Drug Des 75 (2010) 18–28. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00905.x.

[96] C. Greco, V. Taresco, A.K. Pearce, C.E. Vasey, S. Smith, R. Rahman, C. Alexander, R.J. Cavanagh, F. Musumeci, S. Schenone, Development of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Kinase Inhibitors as Potential Clinical Candidates for Glioblastoma

Multiforme, ACS Medicinal Chemistry Letters 11 (2020) 657. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00530.

[97] A. Spreafico, S. Schenone, T. Serchi, M. Orlandini, A. Angelucci, D. Magrini, G. Bernardini, G. Collodel, A. Di Stefano, C. Tintori, M. Bologna, F. Manetti, M. Botta, A. Santucci, Antiproliferative and proapoptotic activities of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivative Src kinase inhibitors in human osteosarcoma cells, FASEB J 22 (2008) 1560–1571. https://doi.org/10.1096/fj.07-9873com.

[98] M. Radi, C. Tintori, F. Musumeci, C. Brullo, C. Zamperini, E. Dreassi, A.L. Fallacara, G. Vignaroli, E. Crespan, S. Zanoli, I. Laurenzana, I. Filippi, G. Maga, S. Schenone, A. Angelucci, M. Botta, Design, synthesis, and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines active in vivo on the Bcr-Abl T315I mutant, J Med Chem 56 (2013) 5382–5394. https://doi.org/10.1021/jm400233w.

[99] S. Di Maria, F. Picarazzi, M. Mori, A. Cianciusi, A. Carbone, E. Crespan, C. Perini, S. Sabetta, S. Deplano, F. Poggialini, A. Molinari, R. Aronne, E. Maccioni, G. Maga, A. Angelucci, S. Schenone, F. Musumeci, E. Dreassi, Novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as dual Src/Bcr-Abl kinase inhibitors: Synthesis and biological evaluation for chronic myeloid leukemia treatment, Bioorg Chem 128 (2022) 106071. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106071.

[100] F. Manetti, A. Santucci, G.A. Locatelli, G. Maga, A. Spreafico, T. Serchi, M. Orlandini, G. Bernardini, N.P. Caradonna, A. Spallarossa, C. Brullo, S. Schenone, O. Bruno, A. Ranise, F. Bondavalli, O. Hoffmann, M. Bologna, A. Angelucci, M. Botta, Identification of a novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine able to inhibit cell proliferation of a human osteogenic sarcoma in vitro and in a xenograft model in mice, J Med Chem 50 (2007) 5579–5588. https://doi.org/10.1021/jm061449r.

[101] C. Tintori, A.L. Fallacara, M. Radi, C. Zamperini, E. Dreassi, E. Crespan, G. Maga, S. Schenone, F. Musumeci, C. Brullo, A. Richters, F. Gasparrini, A. Angelucci, C. Festuccia, S. Delle Monache, D. Rauh, M. Botta, Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma, J Med Chem 58 (2015) 347–361. https://doi.org/10.1021/jm5013159.

[102] F. Carraro, A. Pucci, A. Naldini, S. Schenone, O. Bruno, A. Ranise, F. Bondavalli, C. Brullo, P. Fossa, G. Menozzi, L. Mosti, F. Manetti, M. Botta, Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines endowed with antiproliferative activity on ductal infiltrating carcinoma cells, J Med Chem 47 (2004) 1595–1598. https://doi.org/10.1021/jm034257u.

[103] G. Vignaroli, G. Iovenitti, C. Zamperini, F. Coniglio, P. Calandro, A. Molinari, A.L. Fallacara, A. Sartucci, A. Calgani, D. Colecchia, A. Mancini, C. Festuccia, E. Dreassi, M. Valoti, F. Musumeci, M. Chiariello, A. Angelucci, M. Botta, S. Schenone, Prodrugs of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: From Library Synthesis to Evaluation as Potential Anticancer Agents in an Orthotopic Glioblastoma Model, J Med Chem 60 (2017) 6305–6320. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00637.

[104] F. Poggialini, C. Vagaggini, A. Brai, C. Pasqualini, E. Crespan, G. Maga, C. Perini, N. Cabella, L. Botta, F. Musumeci, M. Frosini, S. Schenone, E. Dreassi, Biological Evaluation and In Vitro Characterization of ADME Profile of In-House Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as Dual Tyrosine Kinase Inhibitors Active against Glioblastoma

Multiforme, Pharmaceutics 15 (2023) 453. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020453.

[105] M. Radi, E. Dreassi, C. Brullo, E. Crespan, C. Tintori, V. Bernardo, M. Valoti, C. Zamperini, H. Daigl, F. Musumeci, F. Carraro, A. Naldini, I. Filippi, G. Maga, S. Schenone, M. Botta, Design, synthesis, biological activity, and ADME properties of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines active in hypoxic human leukemia cells: a lead optimization study, J Med Chem 54 (2011) 2610–2626. https://doi.org/10.1021/jm1012819.

[106] M.A. Santucci, V. Corradi, M. Mancini, F. Manetti, M. Radi, S. Schenone, M. Botta, C6-unsubstituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidines are dual Src/Abl inhibitors effective against imatinib mesylate resistant chronic myeloid leukemia cell lines, ChemMedChem 4 (2009) 118–126. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800320.

[107] F. Manetti, A. Pucci, M. Magnani, G.A. Locatelli, C. Brullo, A. Naldini, S. Schenone, G. Maga, F. Carraro, M. Botta, Inhibition of Bcr-Abl phosphorylation and induction of apoptosis by pyrazolo[3,4-d]pyrimidines in human leukemia cells, ChemMedChem 2 (2007) 343–353. https://doi.org/10.1002/cmdc.200600214.

[108] H.J. Schaeffer, R.N. Johnson, Enzyme inhibitors. XX. Studies on the hydrophobic and hydroxyl binding regions of adenosine deaminase. 9-(2-m-Bromoacetamidophenethyl)adenine, a new irreversible inhibitor of adenosine deaminase, J Med Chem 11 (1968) 21–26. https://doi.org/10.1021/jm00307a004.

[109] P. Quadrelli, M. Mella, L. Legnani, D. Al-Saad, From Cyclopentadiene to Isoxazoline-Carbocyclic Nucleosides; Synthesis of Highly Active Inhibitors of Influenza A Virus H1N1, European Journal of Organic Chemistry 2013 (2013) 4655–4665. https://doi.org/10.1002/ejoc.201300119.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va alla mia relatrice prof.ssa *Anna Carbone*, che con la sua pazienza, professionalità e dedizione mi ha accompagnato per tutto il corso del mio lavoro di tesi. Grazie per il suo continuo supporto, i preziosi consigli e la costante attenzione allo sviluppo del mio lavoro. In ultimo, ma non ultimo, le sono profondamente grata per il suo appoggio umano, la comprensione nei momenti di difficoltà e per ogni parola spesa a spronarmi ed incoraggiarmi.

Inoltre, grazie a tutti i collaboratori di laboratorio che ho incontrato e che mi hanno aiutata in questa esperienza di tesi.

Infine, vorrei ringraziare la mia compagna di studi e amica *Giorgia*, con la quale ho condiviso questo percorso. Grazie per essere stata sempre presente, per avermi offerto il tuo aiuto in ogni momento e per aver gioito insieme a me per ogni traguardo raggiunto. Senza di te non sarebbe stato lo stesso (e altrettanto divertente!).