



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102011901928596
Data Deposito	24/03/2011
Data Pubblicazione	24/09/2012

Classifiche IPC

Titolo

INIBITORI MULTITIRO SINCHINASI UTILI PER LE PATOLOGIE CORRELATE: MODELLI FARMACOFORICI, COMPOSTI IDENTIFICATI TRAMITE QUESTI MODELLI, METODI PER LA LORO PREPARAZIONE, LA LORO FORMULAZIONE E IL LORO IMPIEGO TERAPEUTICO.



PD2011A000091

TITOLO: Inibitori multitirosinchinasi utili per le patologie correlate: modelli farmacoforici, composti identificati tramite questi modelli, metodi per la loro preparazione, la loro formulazione e il loro impiego terapeutico.

Invenzione depositata a nome di

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA, Via 8 febbraio 2 - 35122 Padova

Inventore/i designato/i: CHILIN ADRIANA, MARZARO GIOVANNI, GUIOTTO ADRIANO, CONCONI MARIA TERESA, CASTAGLIUOLO IGNAZIO

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è relativa: alla scoperta e alla generazione di un farmacoforo tridimensionale per l'individuazione di inibitori multipli di tirosinchinasi; alla sintesi dei composti individuabili mediante tale farmacoforo; alle applicazioni in ambito farmaceutico e/o clinico degli stessi composti individuati. La presente invenzione è quindi relativa anche alla preparazione di sali farmaceuticamente accettabili delle molecole oggetto dell'invenzione e alle preparazioni farmaceutiche contenenti almeno una delle molecole oggetto dell'invenzione.

STATO DELL'ARTE:

Ciascun riferimento bibliografico qui citato va inteso come insieme del riferimento stesso e di tutti i riferimenti bibliografici in esso citato.

Le alterazioni a carico dei sistemi di regolazione del ciclo cellulare possono portare all'insorgenza di patologie iperproliferative come ad esempio il cancro [Evan G.I., Vousden K.H. "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer", Nature, 2001, 411, 342-348]. Fra le diverse proteine coinvolte nella ricezione, nella trasduzione e nell'amplificazione dei segnali cellulari, un ruolo di fondamentale importanza è svolto dalle tirosinchinasi, da qui in avanti indicate come TC. Tali proteine ad attività enzimatica catalizzano il trasferimento di un residuo fosfato da una molecola di adenosintrifosfato (ATP) a un residuo tirosinico presente nel loro bersaglio proteico. In questa maniera, la proteina fosforilata viene attivata e risulta a sua volta in grado di fosforilare un'ulteriore proteina bersaglio, o di attivare meccanismi di trascrizione dell'acido deossiribonucleico (DNA), portando a fenomeni di replicazione cellulare e arresto dei processi di morte cellulare programmata (o apoptosi) [Lenninger A.L.

h



et al, "Principi di biochimica", ed. Zanichelli]. Sono state individuate sia TC di membrana (o recettoriali, da qui in avanti indicati come TCR) che TC citoplasmatiche (da qui in avanti indicate come TCC). Fra le TCR, sono risultate particolarmente importanti il recettore per il fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 1 (Fibroblast Growth Factor Receptor-1, FGFR-1), il recettore per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare di tipo 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2, VEGFR-2) e il recettore per il fattore di crescita derivante dalle piastrine di tipo beta (Platelet-Derived Growth Factor Receptor-beta, PDGFR β). Fra le TCC, sono risultate particolarmente importanti abl e src. Le TCR sono recettori transmembrana la cui attivazione avviene a seguito di legame con specifiche strutture proteiche, denominate fattori di crescita [Hubbard S.R., Miller W.T, "Receptor tyrosine kinases: mechanism of activation and signaling", Curr. Opin. Cell Biol. 2007, 19, 117-123]. L'attivazione delle TCR causa la dimerizzazione delle TCR stesse e la loro autofosforilazione. A seguito dell'autofosforilazione le TCR dimerizzate sono in grado di trasdurre il segnale proliferativo, principalmente mediante la fosforilazione di una TCC. Nelle cellule in condizioni fisiologiche (ovvero non soggette a mutazioni genetiche aberranti o in condizioni non patologiche), l'attivazione delle TCR è strettamente e finemente regolata. In questa maniera si ha il mantenimento del corretto equilibrio fra proliferazione cellulare e apoptosi. Al contrario, in quasi tutte le forme tumorali, sia solide che liquide, è stata riscontrata una sovraespressione o una iperattività di diverse TC [Baselga J., Arribas J., "Treating cancer's kinase 'addiction'", Nat. Med., 2004, 10, 786-787]. Nel corso degli ultimi anni, quindi, si è assistito allo studio e allo sviluppo di diverse tecniche per l'inibizione delle TC. In particolare, sono state individuate tre diverse strategie terapeutiche potenzialmente applicabili nella cura di quelle patologie che coinvolgono una iperattività tirosinchinasica, come il cancro, i fenomeni metastatici, le malattie associate all'ipervascolarizzazione, l'artrite reumatoide, e altre patologie [Mendelsohn J., "Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor for cancer therapy", J. Clin. Oncol., 2002, 20, 1s-13s]:

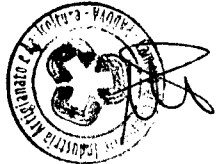
- a. uso di oligonucleotidi antisenso e ribozimi, diretti all'inibizione della produzione di nuove TC da parte della cellula;
- b. uso di anticorpi monoclonali, diretti all'inibizione del legame fra il fattore di crescita e la TCR relativa;
- c. uso di piccole molecole organiche ATP-mimetiche (inibitori di TC, da qui in poi indicati come ITC), dirette all'inibizione dell'attività catalitica delle TC.

La notevole attenzione posta nei confronti degli ITC è dimostrata dal notevole numero di brevetti depositati e riguardanti l'utilizzo degli stessi ITC. A titolo di esempio, EP0795556 descrive pirrolopirimidine come ITC; WO97/34876 descrive cinnoline come inibitori di VEGFR nelle sue varie isoforme; US5747498 descrive derivati 4-anilinochinazolinici come inibitori di EGFR; WO01/00207 descrive pirimidine come ITC; WO01/55114 descrive



amminonicotinammidi come inibitori di VEGFR nelle sue varie isoforme; WO02/22598 descrive derivati chinolinici come inibitori di VEGFR nelle sue varie isoforme; WO04/005281 descrive pirimidinilamminobenzammidi come ITC; WO08/016192 descrive derivati eterociclici condensati come ITC.

Poiché nello sviluppo delle malattie tumorali sono normalmente coinvolte l'attivazione di più vie oncogeniche, l'utilizzo di farmaci ad alta selettività d'azione (anticorpi monoclonali e ITC ad alta selettività), può portare alla rapida insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza e di selezione di ceppi cellulari mutati [Petrelli A. e Giordano S., "From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage", *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15, 422-432]. Conseguentemente, pertanto, viene meno l'efficacia dell'agente chemioterapico utilizzato. L'insorgenza della farmacoresistenza porta ad una notevole riduzione delle aspettative di vita del paziente. Un considerevole aumento dell'efficacia del protocollo terapeutico anticancro può, quindi, essere raggiunta solo mediante l'utilizzo in terapia di associazioni di farmaci con meccanismi di azione diversi o mediante inibitori multipli, cioè agenti chemioterapici in grado di inibire contemporaneamente l'azione di più strutture proteiche o nucleiche coinvolte nell'iperproliferazione cellulare. Rispetto alla terapia combinata con più farmaci ad azione specifica, lo stesso risultato potrebbe essere conseguito con l'utilizzo di inibitori multipli, ma con una minor incidenza di effetti collaterali. A causa del loro meccanismo intrinseco di azione, gli anticorpi monoclonali non possono agire da farmaci multi-target, e quindi possono essere utilizzati solo in terapie di associazione. Inoltre, possono essere individuati solo anticorpi monoclonali attivi contro le TCR, ma non contro le TCC. Infine, essendo farmaci di natura proteica, gli anticorpi monoclonali non sono assumibili per via orale, e pertanto attualmente questi vengono somministrati solamente mediante iniezione in ambito ospedaliero, con notevole diminuzione della compliance da parte del paziente. Per questo è evidente l'importanza di individuare ITC ad azione multipla (da qui in avanti indicati come IMTC), cioè molecole in grado di inibire contemporaneamente ed efficacemente più TC, sia RTC che TCC, somministrabili, a seconda del caso, sia per via orale che per via parenterale. Ad oggi, sono stati individuati alcuni inibitori ad azione duale, come Vandetanib [Wedge S.R. et al, "ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration", *Cancer Res.*, 2002, 62, 4645-4655], Imatinib [Buchdunger E. et al, "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI517 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, 295, 139-145] e Sunitinib [Abrams T.J. et al, "SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer", *Mol. Cancer. Ther.*, 2003, 2, 471-478]. Tali molecole hanno mostrato un'efficacia terapeutica marcatamente più elevata rispetto a ITC selettivi (cioè in grado di inibire una sola TC), come Erlotinib e Gefitinib.



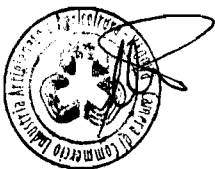
Inibitori multipli di chinasi sono riportati, ad esempio, nei brevetti WO2007/018137, che presenta derivati diarilureidici in grado di inibire Raf e/o una TC coinvolta nell'angiogenesi, e WO2009/015368, che presenta derivati macrolidici come inibitori di src e MEK, ma in entrambi i casi si tratta di inibitori che agiscono solo su due chinasi. Tuttavia, il numero di IMTC fino ad ora sviluppati è sensibilmente inferiore al numero di ITC selettivi. Ciò è dovuto principalmente al fatto che solo la casualità ha portato fino ad ora alla scoperta di molecole dotate di attività inibitoria multitirosinchinasica.

Il problema tecnico sostanziale è, quindi, ad oggi la mancanza di uno strumento adeguato che permetta di progettare razionalmente inibitori multitirosinchinasici. La comunità scientifica e la collettività tutta avvertono il bisogno della messa a disposizione di composizioni farmaceutiche sempre più efficaci per il trattamento terapeutico di tutti gli stati patologici o dei disturbi trattabili con le molecole aventi attività inibitoria nei confronti di più tirosinchinasi, che non presentino altresì gli effetti negativi degli inibitori tirosinchinasici selettivi attualmente in uso in terapia.

Un primo scopo della presente invenzione è quello di fornire uno strumento adeguato (ovvero un farmacoforo tridimensionale) che descriva le caratteristiche steriche ed elettroniche delle diverse parti di una molecola e le loro posizioni relative nello spazio necessarie affinché la molecola stessa possa inibire in maniera efficiente più di una tirosinchinasi coinvolta nella patologia tumorale, scelta preferibilmente fra le seguenti: EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR β , abl e src. Un altro scopo della presente invenzione è di individuare strutture chimiche riconducibili a questo farmacoforo tridimensionale, e pertanto dotate di attività IMTC, e di descriverne la sintesi. È un ulteriore scopo della seguente invenzione descrivere per alcuni composti oggetto della presente invenzione, presi come esempio, la capacità inibitoria nei confronti di un pannello di TC. È un altro scopo della presente invenzione descrivere per i composti, presi come esempio, l'efficacia come inibitori dell'angiogenesi. Infine, un ulteriore scopo della presente invenzione è mettere a disposizione nuovi agenti chemioterapici, loro sali farmacologicamente accettabili e le forme farmaceutiche da essi ottenibili, per l'utilizzo nelle patologie associate ad alterazioni dell'attività tirosinchinasica, come preferenzialmente ma non esclusivamente il cancro.

DEFINIZIONI:

Farmacoforo: insieme di zone dello spazio e distanze relative tra le zone stesse, caratterizzate da determinate proprietà steriche ed elettroniche, necessarie per una interazione ottimale con uno specifico target biologico, tale da evocare una risposta biologica.



IC50: concentrazione di inibitore alla quale si ha la riduzione del 50% dell'attività enzimatica rispetto alla massima attività del sistema enzimatico stesso, posto nelle medesime condizioni ma in assenza di inibitori.

EC50: concentrazione di inibitore alla quale si ha la riduzione del 50% della vitalità cellulare rispetto alla massima attività del sistema cellulare stesso, posto nelle medesime condizioni ma in assenza di inibitori.

Inibitori multipli: composti in grado di inibire contemporaneamente target biologici diversi per funzione, e/o localizzazione, e/o struttura. L'inibizione, indicata mediante il valore di IC50, deve verificarsi a concentrazioni inferiori o uguali a 1 μ M.

Inibitori multitirosinchinasici: composti in grado di inibire contemporaneamente diversi tipi di tirosinchinasi. In particolare si considerano inibitori multitirosinchinasici i composti in grado di inibire almeno 4 tirosinchinasi fra: EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR β , src e abl. L'inibizione, indicata mediante il valore di IC50, deve verificarsi a concentrazioni inferiori o uguali a 1 μ M.

Virtual screening: qualunque processo o insieme di processi chemoinformatici in grado di selezionare composti con specifica attività biologica a partire da database molecolari.

Progettazione razionale: qualunque tecnica non fondata sulla casualità che consenta di individuare molecole con requisiti strutturali fondamentali per impartire una specifica attività biologica.

OGGETTO DELL'INVENZIONE:

In un primo aspetto, la presente invenzione è relativa ad un metodo per la generazione di un farmaco e al suo utilizzo per l'identificazione di inibitori multitirosinchinasici, definiti in accordo con quanto riportato nella sezione "definizioni" alla voce corrispondente. Tale scoperta risponde al bisogno, sempre più pressante, della messa a disposizione della collettività di un metodo efficace per l'individuazione di nuovi composti in grado di inibire contemporaneamente ed efficacemente più tirosinchinasi. Grazie, infatti, all'uso dei composti secondo l'invenzione, sarà possibile la preparazione di composizioni farmaceutiche utili nel trattamento delle patologie associate ad alterazioni dell'attività tirosinchinasica, fra cui preferenzialmente ma non esclusivamente le patologie tumorali, con ridotta probabilità di incorrere in fenomeni di farmacoresistenza nel corso del trattamento.

Il farmaco descritto nella presente invenzione è stato inaspettatamente generato dagli inventori mediante un processo chemoinformatico costituito da due step sequenziali, utilizzando i software UCSF Chimera versione 1.5.2 e AutoDock versione 4.2, individuando l'insieme delle caratteristiche steriche ed elettroniche che una molecola deve possedere per essere in grado di inserirsi in maniera efficiente all'interno della tasca per l'ATP di

13



tirosinchinasi come EGFR, VEGFR-2, PDGFR β , FGFR-1, abl e src, contemporaneamente in almeno quattro di esse.

Il farmacoforo, rappresentato in Figura 1, risulta costituito da:

- a. una zona destinata ad allocare una porzione aromatica, non sostituita o variamente sostituita, e denominata Ar1;
- b. una zona destinata ad allocare una porzione aromatica, non sostituita o variamente sostituita, e denominata Ar2, il cui centro si trovi ad una distanza dal centro di Ar1 compresa fra 4.5 e 6.5 Å;
- c. una zona destinata ad allocare un anello carbociclico o eterociclico, non sostituito o variamente sostituito, e denominata Ar3, il cui centro si trovi ad una distanza dal centro di Ar1 compresa fra 6.5 e 8.5 Å e che contemporaneamente si trovi ad una distanza dal centro di Ar2 compresa fra 4.0 e 5.0 Å;
- d. una zona per atomi di azoto accettori di ponti a idrogeno, che costituisce parte strutturale di Ar1, e indicata come NA;
- e. uno spaziatore, indicato come linker, che unisce Ar1 e Ar2 e che determina la distanza sopra riportata fra Ar1 e Ar2;
- f. una zona X per gruppi funzionali contenenti almeno un atomo elettronrico, il cui centro si trovi ad una distanza dal centro di Ar1 compresa fra 4.5 e 6.5 Å e che contemporaneamente si trovi ad una distanza dal centro di Ar2 compresa fra 6.5 e 8.5 Å e che contemporaneamente si trovi ad una distanza dal centro di Ar3 compresa fra 10.5 e 12.5 Å.

In un aspetto preferenziale dell'invenzione, Ar1 è rappresentato da un anello esatomico aromatico non sostituito o variamente sostituito, contenente almeno un atomo di azoto accettore di ponti idrogeno.

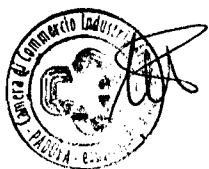
In un altro aspetto preferenziale dell'invenzione, Ar2 è costituito da un anello pentatomico o esatomico aromatico carbociclico o eterociclico, non sostituito o variamente sostituito.

In un ulteriore aspetto preferenziale dell'invenzione, il linker è costituito da una catena di 1 o 2 atomi a scelta tra azoto, ossigeno, zolfo, selenio, silicio, fosforo o carbonio o loro combinazioni.

In un altro aspetto preferenziale dell'invenzione X contiene almeno un atomo elettronrico scelto tra ossigeno, zolfo e azoto.

In un ulteriore aspetto preferenziale dell'invenzione, Ar3 è costituito da un anello pentatomico o esatomico carbociclico o eterociclico, non sostituito o variamente sostituito.

Una volta generato il farmacoforo, esso potrà venir utilizzato come input per l'interrogazione di un database molecolare tridimensionale, in cui ciascun composto sia contenuto come insieme di plausibili conformeri, le cui energie siano comprese fra il minimo valore energetico e 20 Kcal/mole in più rispetto al minimo energetico stesso [Smellie G. et al. "Analysis of Conformational Coverage. 1. Validation and Estimation of Coverage",

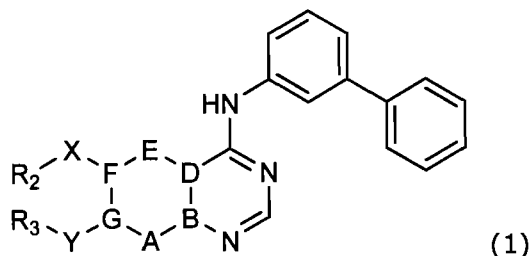


J.Chem.Inf.Comput.Sci., **1995**, 35, 285-294; Smellie G. et al. "Analysis of Conformational Coverage. 2. Application of Conformational Models", *J.Chem.Inf.Comput.Sci.*, **1995**, 35, 295-304]. Per lo screening del database, e quindi per l'individuazione delle molecole che rispecchiano le caratteristiche descritte dal farmacoforo, sarà possibile utilizzare qualunque software disponibile in commercio o appositamente creato in grado di supportare la ricerca farmacoforica e lo screening di database molecolari.

Alternativamente l'analisi di coincidenza con il farmacoforo può venir eseguita con semplici software per il disegno molecolare seguendo la seguente procedura:

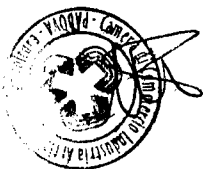
- i. La struttura molecolare di interesse viene disegnata e viene generata la sua struttura molecolare tridimensionale al minimo energetico;
- ii. Per ciascuna molecola viene generato un numero di conformeri sufficiente da garantire l'esplorazione dello spazio conformazionale, la cui energia sia compresa fra quella della struttura al minimo energetico e 20 Kcal/mole in più rispetto al minimo energetico stesso;
- iii. In ciascun conformero vengono individuate le potenziali caratteristiche in comune con il farmacoforo;
- iv. Vengono misurate le distanze fra le aree evidenziate al punto iii), mediante gli strumenti di misura messi a disposizione dal software stesso.

Un ulteriore oggetto preferenziale della presente invenzione sono i composti individuati mediante l'uso del farmacoforo, i quali risultano riassumibili nella formula generale (1),



in cui:

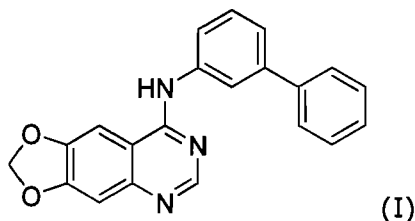
- A è indipendentemente scelto tra un gruppo CH o un atomo di ossigeno o un atomo di zolfo o un atomo di selenio o un atomo di azoto o un gruppo NH o un gruppo NR₁, dove R₁ è indipendentemente scelto tra un residuo alchilico o cicloalchilico o acilico o aromatico o eteroaromatico, in cui l'eteroatomo è un altro atomo di azoto;
- B e D sono indipendentemente scelti tra un atomo di carbonio o un atomo di azoto;
- E può essere assente e, se presente, ha lo stesso significato definito per A;
- F e G hanno lo stesso significato definito per B e D;
- X e Y sono indipendentemente scelti tra un atomo elettronrico come un atomo di ossigeno o un atomo di zolfo o un atomo di azoto;
- R₂ e R₃ hanno lo stesso significato definito per R₁ e possono essere uniti tra loro formando un ulteriore anello che ricomprenda gli elementi strutturali indicati con X-F-G-Y.



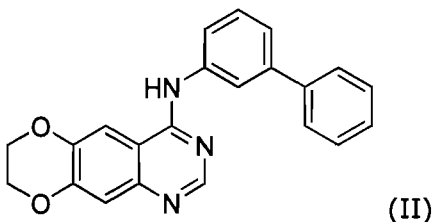
- Tutti i legami tra gli atomi o gruppi A, B, D, E, F, G, X, Y, R₂, R₃ possono essere indipendentemente singoli o doppi.

Alcuni tra i possibili composti rispondenti ai requisiti della formula generale (1) sono specificati preferenzialmente nella seguente lista, e possono venir indipendentemente intesi sia come basi libere che come corrispondenti sali farmaceuticamente accettabili:

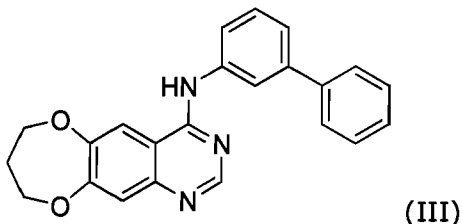
([1,3]diossolo[4,5-*g*]chinazolin-8-il)-(*m*-bifenil-3'-il)ammina (I).



(7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il) ammina (II).



(8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il) ammina (III).



In un altro aspetto, la presente invenzione riguarda la sintesi delle strutture derivanti dall'uso del farmacoforo per individuare inibitori multipli di tirosinchinasi. I composti individuati possono venir sintetizzati mediante le metodiche generali riportate in letteratura. In particolare, i derivati a struttura chinazolinica possono essere sintetizzati preferibilmente secondo la strategia riportata da Marzaro G. et al. ["A novel approach to quinazolin-4(3H)-one via quinazoline oxidation: an improved synthesis of 4-anilinoquinazolines", *Tetrahedron*, **2010**, 66, 962-968].

Per verificare la capacità inibitoria sull'attività tirosinchinasica da parte dei composti individuati nella presente invenzione, è stata effettuata una loro valutazione biologica su:

- un pannello di 6 chinasi isolate (EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR β , src e abl), determinando la capacità di contrastare la fosforilazione di un peptide sintetico politirosinico;
- due linee cellulari, A431 (sovraesprimente EGFR) e NIH3T3 (non esprimente EGFR), determinando l'attività citotossica e la reversibilità dell'effetto citotossico;
- cellule endoteliali di vena di cordone ombelicale umano (HUVEC) verificando l'effetto antiangiogenico *in vitro*;

3



iv) plug di Matrigel iniettati in topi C57/BL6, verificando l'effetto antiangiogenico *in vivo*.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che i composti **I**, **II** e **III** sono in grado di inibire contemporaneamente l'attività di diverse tirosinchinasi isolate, valutata come inibizione della fosforilazione.

Essi inoltre dimostrano una significativa citotossicità, nell'ordine del sub-micromolare, su linee cellulari specifiche come A431, che sovraesprimono EGFR, e NHI3T3, che non esprimono EGFR; mediante l'utilizzo del kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche) è stato inoltre possibile evidenziare che l'effetto antiproliferativo è legato ad un'azione pro-apoptotica.

Vantaggiosamente, oltre all'effetto citotossico, i composti presentano un notevole effetto antiangiogenico, inibendo *in vitro* la proliferazione delle HUVEC, il rilascio di FGF-2 e la formazione di strutture capillaro-simili su Matrigel.

L'attività antiangiogenica viene mantenuta anche *in vivo*: infatti, l'analisi istologica dei plug di Matrigel impiantati nei topi, ha rivelato una riduzione del contenuto di emoglobina e del numero e delle dimensioni dei neo-vasi, rispetto al campione di controllo, nei tessuti trattati con i composti **I**, **II** e **III** sotto forma di cloridrati.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione riguarda l'utilizzo dei composti ottenibili mediante l'invenzione stessa per il trattamento delle patologie associate ad alterazioni dell'attività tirosinchinasica, come ad esempio: cancro al cervello, del polmone, delle cellule squamose, del pancreas, del rene, della milza, dello stomaco, del fegato, dell'esofago, della prostata, del colon retto, del collo, della testa, della tiroide, dell'ovaio, del seno, dell'utero, dei testicoli, di linfomi e leucemie e loro combinazioni; nella cura delle patologie correlate all'angiogenesi.

In accordo con quanto fin a qui riportato, la presente invenzione va intesa come riguardante anche tutte le composizioni farmaceutiche contenenti almeno uno dei composti oggetto dell'invenzione e loro sali farmaceuticamente accettabili, per il trattamento dei disordini sopra elencati. Le composizioni farmaceutiche potranno essere utilizzate tali e quali o in associazione con farmaci o preparati farmaceutici atti alla cura delle patologie suddette. Le composizioni farmaceutiche ottenibili potranno essere adatte alla somministrazione orale, sublinguale, intramuscolare, sottocutanea, endovenosa, peridurale, topica, transdermica, rettale, intranasale. Le composizioni farmaceutiche ottenibili potranno essere a rilascio immediato, a rilascio modificato, a deposito, a rilascio ritardato.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. La figura descrive la struttura schematica del farmacoforo tridimensionale oggetto della presente invenzione.

Figura 2. La figura mostra le distanze rilevate nel composto (I) fra le diverse zone di coincidenza con quelle descritte nel farmacoforo.

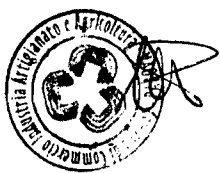


Figura 3. La figura mostra l'effetto pro-apoptotico dei cloridrati di I, II, III su cellule A431. Dopo 24 ore di trattamento con i composti ($10 \mu\text{M}$), le cellule sono state lisate e la quantità di oligo- e mono-nucleosomi è stata determinata utilizzando un saggio immunoenzimatico. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come variazione percentuale dalle colture di controllo non trattate (considerate come 0), sono riportati come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo (colture non trattate); t-test di Student.

Figura 4. La figura mostra gli effetti dei cloridrati di I, II, III sul rilascio di FGF-2 nel mezzo di coltura mediante saggio immuno-enzimatico. Dopo 72 ore di trattamento delle cellule HUVEC con i composti alla concentrazione di $0.1 \mu\text{M}$, il terreno di coltura è stato prelevato ed è stata determinata la concentrazione della citochina. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come pg/mL di FGF-2 $\ast = p < 0.05$ vs controllo; t-test di Student.

Figura 5. La figura descrive la morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti a concentrazione non citotossica ($0.1 \mu\text{M}$) in analisi. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Figura 6. La figura descrive la morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Figura 7. La figura descrive la morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione $0.1 \mu\text{M}$ e 50 ng/mL di FGF-2. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Figura 8. La figura descrive la morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con 50 ng/mL di VEGF. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Figura 9. La figura descrive la morfogenesi su Matrigel di HUVEC trattate per 18 h con i composti in analisi in concentrazione $0.1 \mu\text{M}$ e 20 ng/mL di VEGF. I risultati, media di 3 esperimenti, sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs controllo t test di Student.

Figura 10. La figura mostra la determinazione della concentrazione di emoglobina presente nei plug di Matrigel contenenti 200 ng/mL di FGF-2 e in presenza o meno dei composti **I**, **II** e **III** in concentrazione pari a $1 \mu\text{M}$. I plug sono stati rimossi a sette giorni dall'impianto ed è stata determinata la concentrazione di emoglobina attraverso un saggio colorimetrico con l'impiego del kit Drabkin's Reagent. I risultati, media di 3 esperimenti ed espressi come mg/mL di emoglobina, sono riportati come media $\pm$ deviazione standard. $\ast = p < 0.05$ vs FGF-2; t-test di Student.

Figura 11. La figura mostra le sezioni istologiche dei plug di Matrigel dopo espianto, colorate con ematossillina ed eosina: solo Matrigel (A), Matrigel addizionato di: 200 ng/mL



FGF-2 (B), FGF-2 e **I** 1.0 μM (C), FGF-2 e **II** 1.0 μM (D), FGF-2 e **III** 1.0 μM (E).
Ingrandimento x200.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DI ALCUNE FORME PREFERENZIALI DI REALIZZAZIONE DELL'INVENZIONE

A titolo puramente esemplificativo, gli inventori ritengono utile riportare un numero di esempi sufficienti a dimostrare utilità, applicabilità e vantaggi dell'invenzione stessa. Tali esempi vanno intesi solamente come specificazioni dell'invenzione, senza di fatto limitare solo ad essi l'invenzione stessa. Il tecnico esperto del settore può riprodurre in toto l'invenzione alla luce di quanto descritto nelle seguenti sezioni, illustrato a mero scopo esemplificativo e non limitativo dell'invenzione stessa.

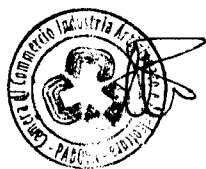
Naturalmente l'invenzione è suscettibile di modifiche e varianti, tutte rientranti nel concetto inventivo espresso nelle rivendicazioni allegate. Tutte le fasi, le caratteristiche, i composti e le composizioni potranno essere sostituiti in modo equivalente, ed i materiali impiegati potranno essere diversi a seconda delle esigenze, senza uscire dall'ambito di tutela dell'invenzione stessa.

Anche se l'invenzione è descritta con particolare riferimento alla presente descrizione dettagliata di alcune forme di realizzazione preferite, ciò va inteso a solo scopo di migliorare la comprensione dell'invenzione stessa e non deve costituire alcuna limitazione all'ambito di tutela rivendicato.

METODI

Esempio 1. Generazione del farmacoforo

Le strutture tridimensionali utilizzate per il primo step della generazione del farmacoforo e relative a 57 ligandi non covalenti cocristallizzati con forme non mutate di EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, src e abl sono risultate disponibili nel Protein Data Bank (codici identificativi delle strutture: 1FPU, 1IEP, 1M52, 1OPJ, 2GQG, 2HIW, 2HYY, 2HZN, 2QOH, 3CS9, 3GVU, 3HMI, 3IK3, 1M17, 1XKK, 2ITW, 2ITY, 2RGP, 3BEL, 3C4F, 1Y57, 2BDF, 2BDJ, 2H8H, 2OIQ, 3EL7, 3EL8, 3EN4, 3EN5, 3EN6, 3EN7, 3F3T, 3F3U, 3F3V, 3F6X, 3G6G, 1Y6A, 1Y6B, 1YWN, 2OH4, 2P2H, 2P2I, 2QU5, 2QU6, 2RL5, 3B8Q, 3B8R, 3BE2, 3C7Q, 3CJF, 3CJG, 3CP9, 3CPB, 3CPC, 3DTW, 3EFL, 3EWH), all'indirizzo internet: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Dalle strutture cristallografiche contenenti più catene uguali sono state eliminate tutte le catene tranne una, scelta indipendentemente tra tutte le catene contenenti la struttura molecolare dell'inibitore riportato nel riferimento bibliografico relativo alla struttura cristallografica stessa. A tale scopo è stato utilizzato il software UCSF Chimera versione 1.5.2. Con il medesimo software, tutte le strutture cristallografiche sono state sovrapposte, seguendo le indicazioni riportate nel manuale di uso del software stesso. In particolare, l'allineamento è



stato ottenuto applicando le seguenti opzioni disponibili nel menù "Tools", sottomenù "StructureComparison", sottomenù "MatchMaker":

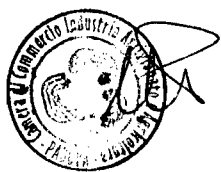
- Reference structure: una qualunque delle strutture di cui sopra;
- Structure(s) to match: tutte le strutture di cui sopra, ad esclusione della struttura utilizzata come riferimento;
- Chain pairing: "Best-aligning pair of chains between reference and match structure";
- Alignment algorithm: "Needleman-Wunsch";
- Matrix: "BLOSUM-62";
- Gap extension penalty: 1;
- Include secondary structure score: opzione attivata;
- compute secondary structure assignments: opzione attivata;
- show pairwise alignment(s): opzione disattivata;
- iterate by pruning long atom pairs until no pair exceeds: 2.0 Å.

Dopo la superimposizione delle strutture di riferimento, sono stati selezionati tutti gli atomi con carica parziale formale compresa fra -0.1 e -0.6 comuni almeno all'80% delle strutture dei ligandi, con una tolleranza di 2.0 Å. Tale operazione di selezione è stata eseguita mediante il menù "Select", sottomenù "Render/Select by Attribute", utilizzando le seguenti opzioni:

- Models: tutte le strutture di cui sopra;
- choose attribute: formal charge;
- value: valori indicati nella descrizione di cui sopra.

Quindi, sono stati selezionati e aggiunti alla selezione precedente tutti gli atomi di carbonio comuni almeno all'80% delle strutture dei ligandi, con una tolleranza di 2.0 Å. Tale operazione di selezione è stata eseguita mediante il menù "Select", sottomenù "Chemistry", sottomenù "Element", opzione "C", avendo cura che l'opzione "Selection Mode" del menù "Select" fosse settata su "append". Attraverso ispezione visiva sono state individuate le zone farmacoforiche indicate in Figura 1 come Ar1, Ar2, NA e linker. In un secondo step, mediante il software AutoDock versione 4.2 sono stati ripredetti i posizionamenti dei ligandi contenuti nelle strutture cristallografiche di cui sopra, seguendo la metodologia generale riportata nel tutorial del programma stesso, disponibile presso il sito internet [http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2 UserGuide.pdf](http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2%20UserGuide.pdf). In particolare, per ogni coppia ligando-tirosinchinasi è stata generata una griglia di docking di dimensioni di 20 Å in ogni direzione dello spazio e centrata sul ligando stesso. Il valore di grid spacing è stato quindi impostato a 0.375 Å. Alla componente "AutoGrid" del software sono state quindi fatte calcolare le griglie relative di default e le griglie relative ai seguenti atom type: carbonio, carbonio aromatico, azoto, azoto accettore di ponti idrogeno, ossigeno. Come protocollo di docking utilizzato dalla componente "AutoDock" è stato impostato l'algoritmo Lemarkian Genetic Algorithm con le

3



opzioni di default selezionate. Una volta eseguito il docking molecolare, le griglie di affinità per carbonio, carbonio aromatico, azoto accettore di ponti idrogeno e ossigeno sono state visualizzate mediante la sequenza di operazioni descritta nel manuale del programma stesso nel capitolo "STEP 4: Evaluating the Results of a Docking". Tutte le griglie calcolate con energie comprese fra -0.4 e -0.8 Kcal/mole all'interno delle tasche catalitiche di EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, src ed abl precedentemente utilizzate sono state caricate all'interno della stessa sezione di lavoro, evidenziando le zone di interazione di un potenziale ligando in comune a tutte le chinasi. Mediante analisi visiva sono state quindi individuate le due ulteriori zone farmacoforiche indicate in Figura 1 come X e Ar3.

Esempio 2. Identificazione di inibitori multitirosinchinasici attraverso il farmacoforo, senza l'ausilio di software appositi per la ricerca farmacoforica

La struttura molecolare di ([1,3]diossolo[4,5-*g*]chinazolin-8-il)-(*m*-bifenil-3'-il)ammina (I) è stata disegnata utilizzando l'interfaccia grafica del software MarvinSketch versione 5.3.5. La struttura al minimo energetico assoluto è stata ottenuta mediante l'opzione "Calculate lowest Energy conformer", disponibile nel menù "Tools", sottomenù "Conformation", sottomenù "Conformers". Quindi, sono stati determinati tutti i conformeri aventi energia compresa fra quella della struttura al minimo energetico e 20 Kcal/mole in più, mediante il menù "Tools", sottomenù "Conformation", sottomenù "Conformers", utilizzando le seguenti opzioni:

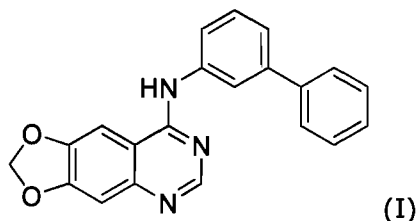
- Store conformer information in property field: opzione attivata;
- Calculate lowest energy conformer: opzione disattivata;
- Maximum number of conformers: 1000;
- Diversity limit: 0.1;
- Timelimit (s): 900;
- Prehydrogenize: opzione attivata;
- Hyperfine: opzione attivata.

Tutti i conformeri aventi energia compresa fra quella della struttura al minimo energetico e 20 Kcal/mole in più sono stati selezionati e introdotti all'interno di un database molecolare, salvato quindi in formato ".mol2", ordinando le strutture molecolari in ordine crescente di energia, espressa in Kcal/mole. Ciascuna struttura molecolare, quindi, è stata indipendentemente caricata nel software MarvinSpace versione 5.3.5. Mediante analisi visiva, sono state individuate le zone della molecola potenzialmente coincidenti con quelle descritte nel farmacoforo. Quindi, mediante l'opzione "Place a pharmacophoric point on a selected atom", alla struttura molecolare sono state aggiunte delle sfere virtuali, rappresentanti il centro geometrico delle zone della molecola potenzialmente coincidenti con quelle descritte nel farmacoforo. Nel caso delle zone denominate Ar1, Ar2 e Ar3, dopo aver selezionato la sfera corrispondente, il posizionamento della sfera stessa è stato corretto mediante l'opzione "translate a ligand in the space", in maniera tale che la sfera si venisse a

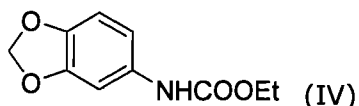


trovare nel centro geometrico dell'anello aromatico. Mediante l'opzione "Measure distance of two atoms" e selezionando di volta in volta la coppia di caratteristiche farmacoforiche, sono state determinate le distanze relative fra esse (Figura 2). Poiché le distanze evidenziate già nel conformero a più bassa energia sono risultate coerenti con quanto riportato nel farmacoforo oggetto dell'invenzione, la molecola (I) è stata selezionata come inibitore multitirosinchinasi.

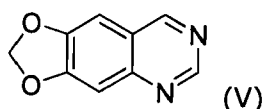
Esempio 3. Sintesi di ([1,3]diossolo[4,5-g]chinazolin-8-il)-(m-bifenil-3'-il)ammina (I), in forma di cloridrato.



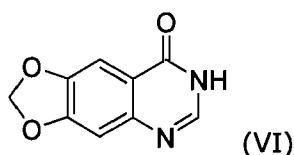
Ad una soluzione di 5-amminobenzo[1,3]diossolano (5.0 g, 36.5 mmoli) in tetraidrofurano anidro (440 ml) e trietilammina (10.2 ml, 72.9 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (6.9 ml, 72.9 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Il cloridrato di trietilammina formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'etile (benzo[1,3]diossolan-5-il)carbammato (IV) (resa quantitativa) di consistenza oleosa. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 9.47 (s all, 1 H, NH); 7.11 (s, 1 H, 4-H); 6.87-6.78 (m, 2 H, 6-H e 7-H); 5.95 (s, 2 H, OCH_2O); 4.09 (q, $J = 7.1$, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 1.22 (t, $J = 7.1$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).



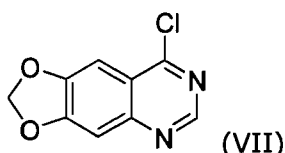
Una soluzione di etile (benzo[1,3]diossolan-5-il)carbammato (IV) (7.2 g, 34.0 mmoli) e urotropina (4.2 g, 34.0 mmoli) in acido trifluoroacetico (90 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di potassio idrossido 10% in etanolo/acqua 1/1 (1200 ml). Alla miscela ($\text{pH} \geq 10$) è stato aggiunto potassio esacianoferrato(III) (89.5 g, 272.0 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in acqua (1200 ml) ed estratta a fondo con etile acetato (3 x 700 ml). La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la [1,3]diossolo[4,5-g]chinazolina (V) (5.0 g, resa 83%) con p.f. 158 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 9.12 (s, 1 H, 8-H); 9.10 (s, 1 H, 6-H); 7.29 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 7.12 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 6.17 (s, 2 H, OCH_2O).



Ad una soluzione di [1,3]diossolo[4,5-g]chinazolina (V) (0.5 g, 2.9 mmoli) in acido acetico (1 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di cerio(IV) ammonio nitrato (6.4 g, 11.6 mmoli) in acqua (13 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con acido acetico, portando all'ottenimento del **[1,3]diossolo[4,5-g]chinazolin-8(7H)-one (VI)** (0.4 g, resa 68%), con p.f. > 300 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 7.97 (s, 1 H, 6-H); 7.41 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 7.12 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 6.20 (s, 2 H, OCH_2O).

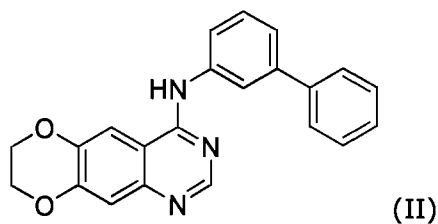
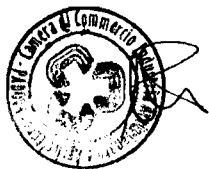


Ad una sospensione di [1,3]diossolo[4,5-g]chinazolin-8(7H)-one (VI) (0.8 g, 4.3 mmoli) in fosforo ossicloruro (9.0 ml, 96.5 mmoli) è stata aggiunta trietilammina (3 ml). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con etile acetato (100 ml) e lavato con una soluzione satura di sodio bicarbonato (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la **8-cloro-([1,3]diossolo[4,5-g]chinazolina (VII))** (0.6 g, resa 72%) con p.f. 168 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8.85 (s, 1 H, 6-H); 7.49 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 7.32 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 6.21 (s, 2 H, OCH_2O).

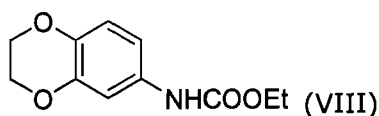


Ad una soluzione di 8-cloro-([1,3]diossolo[4,5-g]chinazolina (VII)) (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilalanina (81 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **([1,3]diossolo[4,5-g]chinazolin-8-il)-(m-bifenil-3'-il)ammina cloridrato (I)** (0.2 g, resa 85%) con p.f. > di 300 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 10.66 (s, 1 H, NH); 8.77 (s, 1 H, 6-H); 8.18 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 8.03 (s, 1 H, H_{arom}); 7.78-7.67 (m, 3 H, H_{arom}); 7.60-7.47 (m, 4 H, H_{arom}); 7.45-7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.30 (s, 1 H, 4-H o 9-H); 6.37 (s, 2 H, OCH_2O).

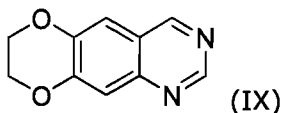
Esempio 4. Sintesi di (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il)ammina (II), in forma di cloridrato.



Ad una soluzione di 6-amminobenzo[1,4]diossano (1.9 g, 12.5 mmoli) in tetraidrofurano anidro (150 ml) e trietilammina (3.5 ml, 25.0 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.4 ml, 25.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Il cloridrato di trietilammina formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza. Il residuo solido è stato ripreso con etile acetato e filtrato a caldo. Il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (benzo[1,4]diossano-6-il)carbammato (VIII)** (2.2 g, resa 77%) con p.f. 117 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.38 (s all, 1 H, NH); 7.03 (d, $J=2.1$, 1 H, 5-H); 6.85 (dd, $J=8.7$, $J=2.1$, 1 H, 7-H); 6.74 (d, $J=8.7$, 1 H, 8-H); 4.22-4.14 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4.08 (q, $J=7.1$, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 1.21 (t, $J=7.1$, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).



Una soluzione di etile (benzo[1,4]diossano-6-il)carbammato (VIII) (5.0 g, 22.4 mmoli) e urotropina (3.1 g, 22.4 mmoli) in acido trifluoroacetico (70 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di potassio idrossido 10% in etanolo/acqua 1:1 (800 ml). Alla miscela ($\text{pH} \geq 10$) è stato aggiunto potassio esacianoferrato(III) (59.0 g, 179.2 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 4 ore (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in acqua (800 ml) ed estratta a fondo con etile acetato. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la **7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina (IX)** (3.6 g, resa 86%) con p.f. 109 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.30 (s, 1 H, 4-H); 9.03 (s, 1 H, 2-H); 7.55 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.36 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.47-4.38 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

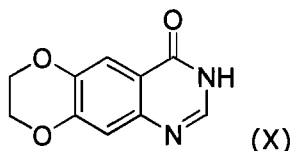


Ad una soluzione di 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolina (IX) (1.7 g, 9.1 mmoli) in acido acetico (4 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di cerio(IV) ammonio nitrato (20.0 g, 36.4 mmoli) in acqua (48 ml). Al termine dell'aggiunta (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1), il precipitato formatosi è stato

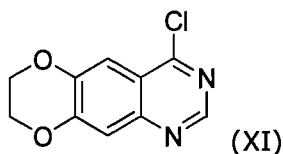
3



raccolto per filtrazione e lavato con acido acetico, portando all'ottenimento del **7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4(3*H*)-one (X)** (1.1 g, resa 65%), con p.f. 282 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 12.01 (s all, 1 H, NH); 7.92 (s, 1 H, 2-H); 7.45 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.08 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.39-4.30 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

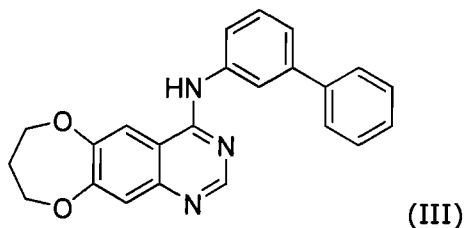


Una sospensione di 7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4(3*H*)-one (X) (0.2 g, 1.0 mmoli) in fosforo ossicloruro (1.4 ml, 10.6 mmoli) è stata irradiata con microonde a 50W, raggiungendo la temperatura di 65°C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 5 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento, è stata aggiunto ulteriore fosforo ossicloruro (0.5 ml, 5.4 mmoli) sottoponendo la miscela di reazione ad un altro ciclo di irraggiamento per 5 minuti (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione satura di sodio bicarbonato ed estratta a fondo con etile acetato. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolina (XI)** (0.2 g, resa 70%) con p.f. 216 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): 8.86 (s, 1 H, 2-H); 7.66 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 7.50 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.47-4.39 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

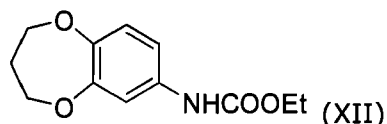


Ad una soluzione di 4-cloro-7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolina (XI) (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilanilina (76 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata, ottenendo la **(7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-(*m*-bifenil-3'-il)ammina cloridrato (II)** (0.2 g, resa 88%) con p.f. > di 300 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.01 (s, 1 H, NH); 8.82 (s, 1 H, 2-H); 8.34 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 8.03 (s, 1 H, H_{arom}); 7.7-7.66 (m, 3 H, H_{arom}); 7.64-7.47 (m, 4 H, H_{arom}); 7.44-7.37 (m, 1 H, H_{arom}); 7.31 (s, 1 H, 5-H o 10-H); 4.55-4.41 (m, 4 H, OCH₂CH₂O).

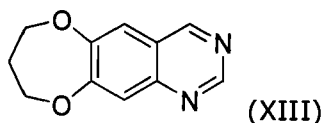
Esempio 5. Sintesi di (8,9-diidro-7*H*-[1,4]diossepino[2,3-*g*]chinazolin-4-il)-(*m*-bifenil-3'-il) ammina (III), in forma di cloridrato.



Ad una soluzione di 7-ammino-3,4-diidro-2*H*-1,5-benzodiossepina (2.3 g, 13.9 mmoli) in tetraidrofurano anidro (150 ml) e trietilammina (3.9 ml, 27.8 mmoli) è stato aggiunto etile cloroformiato (2.7 ml, 27.8 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Il cloridrato di trietilammina formatosi è stato allontanato per filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secchezza, ottenendo l'**etile (3,4-diidro-2*H*-1,5-benzodiossepin-7-il)carbammato (XII)** (3.3 g, resa quantitativa), di consistenza oleosa. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.48 (s all., 1 H, NH); 7.12 (d, $J=2.4$, 1 H, 6-H); 7.00 (dd, $J=8.7$, $J=2.4$, 1 H, 8-H); 6.86 (d, $J=8.7$, 1 H, 9-H); 4.13-4.01 (m, 6 H, 2'-CH₂, 4'-CH₂ e COOCH₂CH₃); 2.05 (quint, $J=5.3$, 2 H, 3'-CH₂); 1.22 (t, $J=7.1$, 3 H, COOCH₂CH₃).



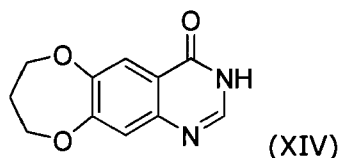
Una soluzione di etile (3,4-diidro-2*H*-1,5-benzodiossepin-7-il)carbammato (XII) (3.3 g, 13.9 mmoli) e urotropina (1.9 g, 13.9 mmoli) in acido trifluoroacetico (42 ml) è stata irradiata con microonde a 80 W, raggiungendo la temperatura di 110 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 10 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata ripresa con una soluzione di potassio idrossido 10% in etanolo/acqua 1/1 (420 ml). Alla miscela (pH ≥ 10) è stato aggiunto potassio esacianoferrato(III) (41.2 g, 125.1 mmoli) e la sospensione è stata posta a riflusso per 20 ore (TLC: etile acetato). La miscela di reazione è stata raffreddata, versata in acqua (450 ml) ed estratta a fondo con etile acetato (800 ml). La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la **8,9-diidro-7*H*-[1,4]diossepino[2,3-*g*]chinazolina (XIII)** (2.5 g, resa 89%) di consistenza oleosa. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 9.37 (s, 1 H, 4-H); 9.11 (s, 1 H, 2-H); 7.68 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 7.46 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 4.37 (t, $J=5.7$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 4.31 (t, $J=5.7$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 2.23 (quint, $J=5.7$, 2 H, 8'-CH₂).



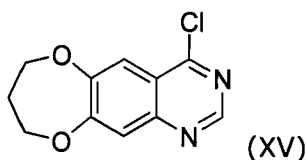
Ad una soluzione di 8,9-diidro-7*H*-[1,4]diossepino[2,3-*g*]chinazolina (XIII) (2.5 g, 12.3 mmoli) in acido acetico (5 ml) è stata aggiunta lentamente e sotto agitazione a temperatura ambiente una soluzione di cerio(IV) ammonio nitrato (27.0 g, 49.2 mmoli) in acqua (60 ml).



Al termine dell'aggiunta (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1), il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con acido acetico, portando all'ottenimento di **8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolin-4(3H)-one (XIV)** (2.0 g, resa 73%), con p.f. 180 °C. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 7.97 (s, 1 H, 2-H); 7.56 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 7.16 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 4.28 (t, $J=5.6$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 4.22 (t, $J=5.6$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 2.17 (quint, $J=5.6$, 2 H, 8'-CH₂).

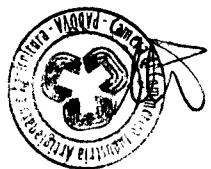


Ad una sospensione di 8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolin-4(3H)-one (XIV) (0.8 g, 3.7 mmoli) in fosforo ossicloruro (7 ml) è stata aggiunta trietilammina (1.9 ml). La miscela è stata posta a riflusso per 3 ore (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la soluzione è stata concentrata a secchezza e il residuo solido è stato ripreso con etile acetato (100 ml) e lavato prima con una soluzione satura di sodio bicarbonato (100 ml) e poi con acqua (100 ml). La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-cloro-8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolina (XV)** (0.8 g, resa 93%), con p.f. 194 °C. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 8.92 (s, 1 H, 2-H); 7.68 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 7.56 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 4.42 (t, $J=5.8$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 4.36 (t, $J=5.8$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 2.26 (quint, $J=5.8$, 2 H, 8'-CH₂).



Ad una soluzione di 4-cloro-8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolina (XV) (0.1 g, 0.5 mmoli) in isopropanolo (5 ml) è stata aggiunta 3-fenilanilina (71 mg, 0.5 mmoli). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde a 60 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C in 30 secondi. Tale temperatura è stata mantenuta costante per 15 minuti mediante regolazione automatica della potenza e del raffreddamento (TLC: cloroformio/metanolo, 9/1). Dopo raffreddamento la miscela di reazione è stata filtrata ottenendo la **(8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il)ammina cloridrato (III)** (0.2 g, resa 89%) con p.f. > di 300 °C. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 10.73 (s, 1 H, NH); 8.78 (s, 1 H, 2-H); 8.39 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 8.06 (s, 1 H, H_{arom}); 7.82-7.66 (m, 3 H, H_{arom}); 7.59-7.46 (m, 4 H, H_{arom}); 7.4-7.37 m, 1 H, H_{arom}); 7.35 (s, 1 H, 5-H o 11-H); 4.42 (t, $J=5.9$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 4.35 (t, $J=5.9$, 2 H, 7'-CH₂ o 9'-CH₂); 2.27 (quint, $J=5.4$, 8'-CH₂).

Esempio 6. Determinazione dell'inibizione della fosforilazione su tirosinchinasi solate



L'inibizione *in vitro* dell'attività chinasi dei cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** alla concentrazione di 0.1 μM è stata valutata su sei diverse tirosinchinasi (EGFR, FGFR-1, VEGFR-2, PDGFR β , src e abl). I domini catalitici intracellulari delle chinasi sono stati disciolti in un buffer di diluizione (5mM MOPS pH 7.2, 2.5 mM glicerolo 2-fosfato, 5 mM MgCl_2 , 0.4 mM EGTA, 0.4 mM EDTA, 0.05 mM DTT, 0.5 mM BSA). Le reazioni sono state condotte in tubi da microcentrifuga preventivamente raffreddati. Alle diverse chinasi (concentrazione finale di 200 ng/ml), oltre ai cloridrati dei composti **I**, **II** e **III**, sono stati aggiunti 0.2 mg/mL di substrato (Myelin Basic Protein, *Sigma*), 0.05 mM ATP and 0.25 μCi of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (*PerkinElmer, Monza, MI*) (volume finale 25 μL). Nel controllo negativo il substrato fosforilabile è stato sostituito con acqua. Nel controllo positivo l'acqua sostituiva i composti in esame. Le reazioni sono state condotte a 30° C per 20 minuti, e successivamente bloccate con un *loading buffer* contenente 0.25 mM β -mercaptoetanol. I campioni sono stati poi analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10% p/v. Il substrato fosforilato è stato identificato mediante autoradiografia. Per l'analisi densitometrica è stato utilizzato il software *VersaDoc Quantity One (BioRad)*. I dati sono raccolti nella Tabella 1.

Composto	Saggi su tirosinchinasi isolate ^a					
	EGFR	FGFR-1	VEGFR-2	PDGFR β	src	abl
I	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
II	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
III	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

Tabella 1. Capacità inibitoria dei cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** su tirosinchinasi isolate.

^a (+) = IC50 uguale o minore a 1.0 μM ; (-) = IC50 superiore a 1.0 μM

Esempio 7. Effetti sulla proliferazione cellulare

Il saggio di vitalità cellulare è stato condotto verificando l'attività metabolica delle cellule in coltura attraverso un saggio colorimetrico che utilizza il 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolobromuro, noto come MTT [Denizot F., Lang R., "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *J. Immunol. Methods*, **1986**, 89, 271-277; Wemme H. et al., "Measurement of lymphocyte proliferation: critical analysis of radioactive and photometric methods", *Immunobiology*, **1992**, 185, 78-89].

Le cellule A431 o NIH3T3 sono state seminate ad una densità di 5 x 10³ cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti (*Becton Dickinson Falcon*) in presenza di terreno completo (150 μL per pozzetto). Le cellule HUVEC sono state seminate ad una densità di 3.5 x 10³ cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti (*Becton Dickinson Falcon*) in presenza di terreno completo (150 μL per pozzetto). Dopo 24 ore di incubazione a 37°C è stato effettuato un

h



lavaggio con PBS, per eliminare eventuali cellule morte e residui di terreno, e sono stati aggiunti i cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** disciolti in terreno completo (volume finale 200 μ L) a varie concentrazioni (da 0.01 a 10 μ M). Il controllo era costituito da cellule in terreno completo non trattate. Trascorse 68 ore di incubazione a 37°C con le sostanze, nei pozzetti sono stati aggiunti 20 μ L di MTT (*Sigma*) (5 mg/mL in PBS) e si è atteso un periodo di altre 4 ore per permettere alle cellule di metabolizzare il composto. I cristalli di formazano formati sono stati solubilizzati con 75 μ L di isopropanolo acido (*Carlo Erba*) e le piastre sono state poste sotto blanda agitazione meccanica per 20 minuti al buio. La lettura dei valori di assorbanza è stata eseguita con *Microplate autoreader* EL 13 a 570 nm. I risultati sono stati espressi come EC50, concentrazione del composto in grado di ridurre del 50% la vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato, e riportati nella Tabella 2.

Composto	Saggi su linee cellulari		
	A431	NIH3T3	HUVEC
I	0.81 ± 0.06	0.60 ± 0.02	0.75 ± 0.01
II	0.08 ± 0.01	0.60 ± 0.20	0.08 ± 0.17
III	0.66 ± 0.08	0.90 ± 0.06	0.91 ± 0.06

Tabella 2. Citotossicità dei cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** misurata sulle linee cellulari A431, NIH3T3 e HUVEC. I valori sono espressi come EC50 (μ M) $\pm$ S.D.

Esempio 8. Determinazione del tasso di apoptosi nella linea cellulare A431

Per valutare il tasso di apoptosi nelle colture trattate con i cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** alla concentrazione di 10 μ M, è stato utilizzato il kit *Cell Death Detection* ELISA^{PLUS} (*Roche*). Il saggio è stato condotto secondo le indicazioni riportate dalla ditta fornitrice. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al controllo. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student. I dati ottenuti sono riportati in Figura 3.

Esempio 9. Determinazione della quantità di FGF-2 rilasciato nel terreno di coltura da parte di cellule HUVEC

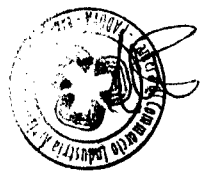
L'inibizione del rilascio di FGF-2 da parte dei cloridrati di **I**, **II** e **III** alla concentrazione di 0.1 μ M, è stata valutata su cellule HUVEC con il kit *Human FGF basic Immunoassay* (*Quantikine*), secondo le indicazioni riportate dalla ditta fornitrice. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come pg/mL di FGF-2. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

I dati ottenuti sono riportati in Figura 4.

Esempio 10. Valutazione delle variazioni della morfogenesi su Matrigel.

Ciascun pozzetto di una piastra da 24 pz (*Falcon*) è stato condizionato con uno strato di Matrigel Normale (50 μ L/pz) (*B&D Biosciences*), precedentemente scongelato overnight a

ly



4°C in ghiaccio, con l'accortezza di utilizzare materiale (puntali, pipette, piastre) pre-raffreddato in *freezer* e che il supporto di plastica per la coltura cellulare rimanesse in ghiaccio durante tutta la procedura di condizionamento. La piastra è poi stata incubata a 37°C per almeno 1 h per indurre la gelificazione della matrice glicoproteica. In ciascun pozzetto condizionato sono state seminate $7,5 \times 10^4$ cellule sospese in 1 mL di terreno MV₂ base contenente l'1% di FCS (*Promocell*) e i composti **I**, **II**, **III** a concentrazione 0,1 µM, dimostrata essere non citotossica dal saggio di vitalità cellulare. Dopo 18 h di incubazione a 37°C e un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate con una soluzione al 2% di glutaraldeide (*Merck*) in tampone sodio cacodilato 0.1 M (*Sigma*) [Albini A. et al, "The 'chemoinvasion assay': a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes", *Int. J. Dev. Biol.*, 2004, 48, 563-571]. Per ogni pozzetto sono poi stati fotografati 5 campi (ingrandimento x50), seguendo uno schema a croce. Le immagini così ottenute sono state analizzate grazie all'impiego del *Software ImageJ-Matrigel Assay*, valutando sia parametri dimensionali, come la percentuale dell'area coperta dalle cellule, la lunghezza totale della rete formata dalle HUVEC per ogni campo e l'area percentuale racchiusa all'interno delle maglie, sia parametri topologici, quali il numero di maglie chiuse e di punti di ramificazione per campo. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto al campione non trattato. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student. Il saggio è stato condotto anche con Matrigel ridotto di fattori di crescita seminando le cellule in 1 mL di terreno base contenente l'1% di FCS, 50 ng/mL FGF-2 o 20 ng/mL VEGF da soli o con i composti **I**, **II**, **III**, a concentrazione non citotossica. I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto al campione non trattato. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student.

Effetto sulla morfogenesi in vitro. Per valutare *in vitro* l'effetto dei derivati 4-aminochinazolinici sulla morfogenesi, le HUVEC sono state seminate su Matrigel. Le colture sono state trattate per 18 h con i composti utilizzati a concentrazione non citotossica pari a 0.1 µM, come dimostrato dai risultati del saggio dell'MTT (Figura 5) effettuato in seguito ad esposizione per 18 h.

Effetti sulla morfogenesi in vitro indotta da citochine esogene. Il saggio è stato condotto utilizzando Matrigel ridotto di fattori di crescita seminando le cellule in 1 mL di terreno base contenente l'1% di FCS, FGF-2 alla concentrazione di 50 ng/mL o VEGF alla concentrazione di 20 ng/mL da soli (Figure 6 e 8) o con i composti in analisi a concentrazione non citotossica (Figure 7 e 9). I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazioni percentuali rispetto alle colture di controllo trattate rispettivamente con FGF-2 e VEGF. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student. La concentrazione non citotossica dei composti era stata precedentemente identificata con un saggio di determinazione di vitalità cellulare con MTT (dati non mostrati) lasciando incubare



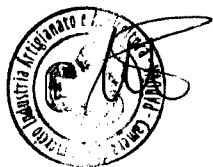
le cellule per 18 h con i composti in analisi da soli o con 50 ng/mL di FGF-2 o 20 ng/mL di VEGF.

Esempio 11. Valutazione dell'effetto antiangiogenico in vivo

Impianto dei plug di matrigel. Per ogni animale (topi CD57/BL6), sono stati usati 500 μ L di Matrigel (B&D Biosciences), precedentemente scongelato a 4°C per una notte. Il materiale da utilizzare per la procedura (puntali, eppendorf) è stato pre-raffreddato in freezer. Sono stati quindi miscelati con il Matrigel 200 ng/mL di FGF-2 (Sigma) e 12 U.I./plug di eparina (Vister); successivamente sono stati aggiunti i cloridrati dei composti **I**, **II** e **III** a concentrazione pari a 1 μ M. I topi sono stati anestetizzati con isoflurano e al momento dell'iniezione sottocutanea sono stati utilizzati aghi e siringhe preventivamente raffreddati in freezer. I topi trattati con Matrigel contenente solo eparina rappresentano i controlli negativi, mentre quelli con Matrigel contenente eparina ed FGF-2 i controlli positivi.

Determinazione del contenuto di emoglobina. Dopo sette giorni dall'iniezione gli animali sono stati sacrificati tramite inalazione di anidride carbonica. I plug sono stati rimossi, immersi in un buffer costituito da 300 μ L di Brij-35 0.1% in PBS per plug, e posti a 4°C per una notte. Successivamente sono stati centrifugati per 5 minuti a 13500 g/min e nel surnatante è stato determinato il contenuto di emoglobina, usando il Drabkin's Reagent, contenente sodio bicarbonato, potassio ferricianuro e potassio cianuro. Per calcolare la concentrazione di emoglobina estratta dal plug è stata costruita una retta di taratura, preparando una soluzione standard di emoglobina (10 mg/mL) in Drabkin's Solution (1 vial di Drabkin's Reagent in 1 L di acqua distillata addizionato di 0.5 mL di Brij-35 Solution 30%). Con questa soluzione madre sono stati preparati sette standard di cianometemoglobina diluiti con Drabkin's Solution a concentrazione nota in un intervallo compreso tra 0 e 10 mg/mL (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10 mg/ml). L'assorbanza degli standard è stata letta a 540 nm. Con la retta ottenuta sono state calcolate le concentrazioni di cianometemoglobina (mg/ml) relative ai campioni trattati con i composti **I**, **II** e **III**. I risultati, media di almeno 3 animali, sono stati espressi come mg/mL di emoglobina. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test di Student. I dati ottenuti sono riportati in Figura 10.

Analisi istologica. Alcuni plug sono stati fissati per 24 ore in PBS contenente formalina al 4% (Sigma) e successivamente sono stati disidratati mediante la scala ascendente di soluzioni di alcool etilico nel seguente modo: 2 ore in alcool etilico al 70%, 2 ore in alcool etilico al 80%, 2 ore in alcool etilico al 90%, una notte in alcool etilico al 95%, 2 ore in alcool etilico al 100%, 2 ore in xilolo/alcool etilico al 100% (1:1, v/v) e quindi in xilolo per altre 2 ore. E' seguito quindi un passaggio in paraffina a 60°C per 2 ore per l'impregnazione e quindi l'inclusione in vaschette metalliche. Al microtomo (HistoSlide 2000, Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni dello spessore di 5 μ m, che sono state fatte aderire su vetrini



portaoggetti *SuperFrost Plus* (Menzel-Glaser). Quindi è stata eseguita colorazione con ematossilina-eosina (*Merck*). Le sezioni sono state preventivamente sparaffinate tramite due passaggi in *Histochoice Clearing Agent 1X*, ciascuno di 5 minuti, e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in scala discendente di alcool etilico: alcool etilico al 100%, alcool etilico al 95%, alcool etilico al 80%, alcool etilico al 70%, alcool etilico al 50%, alcool etilico al 30%, alcool etilico al 10%, per finire con un passaggio di 5 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con ematossilina per 2,5 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e contrastata per 2 minuti in acqua di fonte, quindi è stata trattata con eosina per 10 secondi e lavata ancora velocemente in acqua distillata. Dopo la colorazione i preparati sono stati disidratati tramite passaggi veloci in alcool 95% e alcool assoluto, trattati con *Histochoice Clearing Agent 1X* e montati con *Histochoice Mounting Media*. Le osservazioni sono state effettuate con microscopio ottico DM2000 (*Leica*). I risultati ottenuti sono riportati in Figura 11.

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO
Giuseppe Barbieri



TITOLO: Inibitori multitirosinchinasi utili per le patologie correlate: modelli farmacoforici, composti identificati tramite questi modelli, metodi per la loro preparazione, la loro formulazione e il loro impiego terapeutico

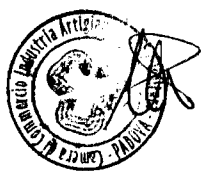
Invenzione depositata a nome di

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA, Via 8 febbraio 2 – 35122 Padova

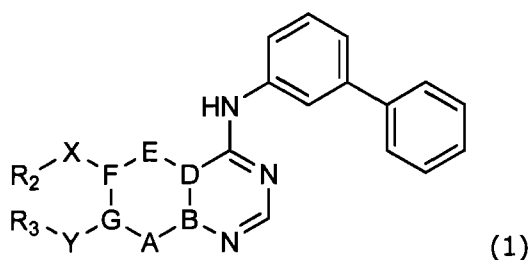
Inventore/i designato/i: CHILIN ADRIANA, MARZARO GIOVANNI, GUIOTTO ADRIANO, CONCONI MARIA TERESA, CASTAGLIUOLO IGNAZIO

RIVENDICAZIONI:

1. Metodo per la generazione del farmacoforo tridimensionale, rappresentato nella figura 1, utilizzabile per l'individuazione di composti attivi come inibitori multitirosinchinasici ad azione inibitoria contemporaneamente su almeno 4 chinasi tra EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR β , src e abl.
2. Farmacoforo tridimensionale generato secondo la rivendicazione 1 costituito da:
 - tre zone per porzioni aromatiche, non sostituite o variamente sostituite (denominate Ar1, Ar2 e Ar3);
 - una zona per atomi di azoto (denominata NA) che costituisce parte strutturale di Ar1;
 - uno spaziatore (denominato linker) che unisce Ar1 e Ar2;
 - una zona X per gruppi funzionali contenenti almeno un atomo elettronrico.
3. Farmacoforo tridimensionale secondo la rivendicazione 2, in cui
 - la zona Ar1 è un anello esatomico aromatico non sostituito o variamente sostituito, contenente almeno un atomo di azoto accettore di ponti idrogeno;
 - le zone Ar2 e Ar3 sono anelli pentatomici o esatomici, carbociclici o eterociclici, non sostituiti o variamente sostituiti;
 - un linker costituito da una catena di 1 o 2 atomi a scelta tra azoto, ossigeno, zolfo, selenio, silicio, fosforo, carbonio o loro combinazioni;
 - la zona X contiene almeno un atomo elettronrico scelto tra ossigeno, zolfo e azoto;
 - la distanza tra il centro di Ar1 e il centro di Ar2 è compresa tra 4.5 e 6.5 Å;
 - la distanza tra il centro di Ar1 e il centro di Ar3 è compresa tra 6.5 e 8.5 Å;
 - la distanza tra il centro di Ar2 e il centro di Ar3 è compresa tra 4.0 e 5.0 Å;
 - la distanza tra il centro di X e il centro di Ar1 è compresa tra 4.5 e 6.5 Å;



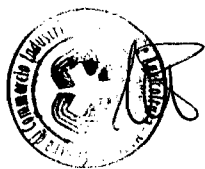
- la distanza tra il centro di X e il centro di Ar2 è compresa tra 6.5 e 8.5 Å;
 - la distanza tra il centro di X e il centro di Ar3 è compresa tra 10.5 e 12.5 Å.
4. Uso del farmacoforo tridimensionale secondo le rivendicazioni 2-3 mediante qualunque software o strategia al fine di individuare nuovi inibitori multitirosinchinasici ad azione inibitoria contemporaneamente su almeno 4 chinasi tra EGFR, VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR β , src e abl, preferenzialmente tramite tecniche chemoinformatiche di virtual screening o progettazione razionale, come ad esempio, ma non solo, interrogazione di database molecolari tridimensionali, in cui il farmacoforo costituisce la chiave di ricerca.
5. Composti individuati secondo la rivendicazione 4 aventi qualsiasi struttura che rispetti i requisiti strutturali descritti dal farmacoforo tridimensionale descritto nelle rivendicazioni 2-3.
6. Composti individuati secondo la rivendicazione 4, aventi i requisiti strutturali indicati nella rivendicazione 5 ed aventi preferenzialmente struttura rispondente alla formula generale (1)



in cui:

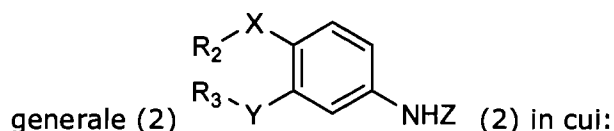
- A è indipendentemente scelto tra un gruppo CH o un atomo di ossigeno o un atomo di zolfo o un atomo di selenio o un atomo di azoto o un gruppo NH o un gruppo NR1, dove R1 è indipendentemente scelto tra un residuo alchilico o cicloalchilico o acilico o aromatico o eteroaromatico, in cui l'eteroatomo è un altro atomo di azoto;
- B e D sono indipendentemente scelti tra un atomo di carbonio o un atomo di azoto;
- E può essere assente e, se presente, ha lo stesso significato definito per A;
- F e G hanno lo stesso significato definito per B e D;
- X e Y sono indipendentemente scelti tra un atomo elettronrico come un atomo di ossigeno o un atomo di zolfo o un atomo di azoto;
- R2 e R3 hanno lo stesso significato definito per R1 e possono essere uniti tra loro formando un ulteriore anello che ricomprenda gli elementi strutturali indicati con X-F-G-Y.
- Tutti i legami tra gli atomi o gruppi A, B, D, E, F, G, X, Y, R2, R3 possono essere indipendentemente singoli o doppi.

h



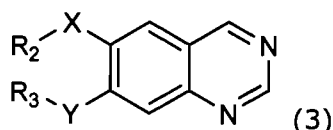
7. Composto individuato secondo la rivendicazione 4 caratterizzato dal fatto di essere costituito da ([1,3]diossolo[4,5-g]chinazolin-8-il)-(m-bifenil-3'-il)ammina (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.
8. Composto individuato secondo la rivendicazione 4 caratterizzato dal fatto di essere costituito da (7,8-diidro[1,4]diossino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il) ammina (II) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.
9. Composto individuato secondo la rivendicazione 4 caratterizzato dal fatto di essere costituito da (8,9-diidro-7H-[1,4]diossepino[2,3-g]chinazolin-4-il)-(m-bifenil-3'-il) ammina (III) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.
10. Metodo di preparazione di composti secondo le rivendicazioni 5-9 rappresentato dalla seguente via sintetica:

(A) ciclizzazione di un nucleo pirimidinico su un derivato anilidico di formula



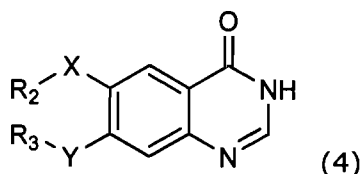
- X e Y sono indipendentemente scelti tra un atomo elettronrico come un atomo di ossigeno o un atomo di zolfo o un atomo di azoto;
- R2 e R3 sono indipendentemente scelti tra un residuo alchilico o cicloalchilico o acilico o aromatico o eteroaromatico e possono essere uniti tra loro formando con X e Y un ulteriore anello condensato sul nucleo benzenico;
- Z è indipendentemente scelto tra tutti i possibili gruppi protettori delle funzioni amminiche, in particolare i gruppi non facilmente idrolizzabili a pH acido come COOEt [altrimenti indicabile come C(=O)OCH2CH3].

(B) ossidazione della chinazolina di formula generale (3)



in cui X, Y, R2 e R3 hanno lo stesso significato definito al punto (A).

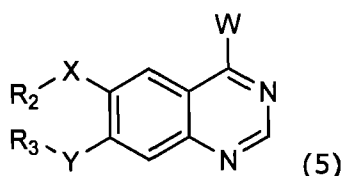
(C) alogenazione del chinazolinone di formula generale (4)



in cui X, Y, R2 e R3 hanno lo stesso significato definito al punto (A).

(D) sostituzione con 3-fenilanilina dell'atomo di alogeno dell'alochinazolina di formula generale (5)

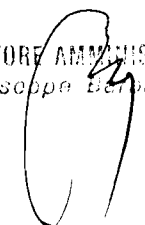
h



in cui X, Y, R₂ e R₃ hanno lo stesso significato definito al punto (A) e W è indipendentemente scelto tra un atomo di cloro o un atomo di bromo o un atomo di iodio o un atomo di fluoro.

11. Composti individuati secondo la rivendicazione 4 preparati mediante qualsiasi altro metodo sintetico noto o riportato in letteratura.
12. Composti secondo le rivendicazioni 5-9 impiegabili sia come inibitori multichinasici sia come inibitori di ciascuna chinasi singolarmente.
13. Uso dei composti secondo le rivendicazioni 5-9 per la preparazione di composizioni farmaceutiche utili nel trattamento delle patologie associate ad alterazioni dell'attività tirosinchinasica, quali ad esempio, ma non solo: cancro al cervello, del polmone, delle cellule squamose, del pancreas, del rene, della milza, dello stomaco, del fegato, dell'esofago, della prostata, del colon retto, del collo, della testa, della tiroide, dell'ovaio, del seno, dell'utero, dei testicoli, di linfomi e leucemie e loro combinazioni; nella cura delle patologie correlate all'angiogenesi; nel trattamento delle altre patologie correlate.
14. Composizioni farmaceutiche contenenti almeno uno dei composti secondo le rivendicazioni 5-9, o loro sali farmaceuticamente accettabili, e loro associazioni per il trattamento dei disordini di cui al punto 13, adatte alla somministrazione orale, sublinguale, intramuscolare, sottocutanea, endovenosa, peridurale, topica, transdermica, rettale, intranasale, sia a rilascio immediato, che a rilascio modificato, a deposito, a rilascio ritardato.
15. Uso delle composizioni secondo la rivendicazione 14 in associazione farmacologica con altri agenti terapeutici e loro forme farmaceutiche.

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO
Giuseppe Bernieri



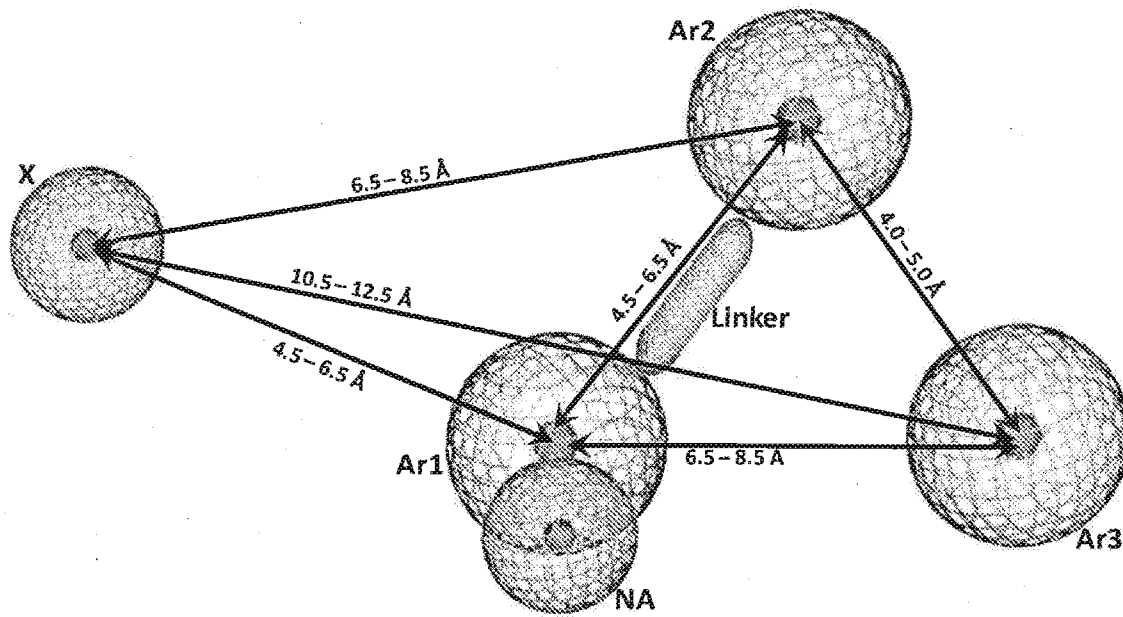
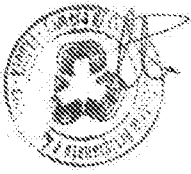


Figura 1

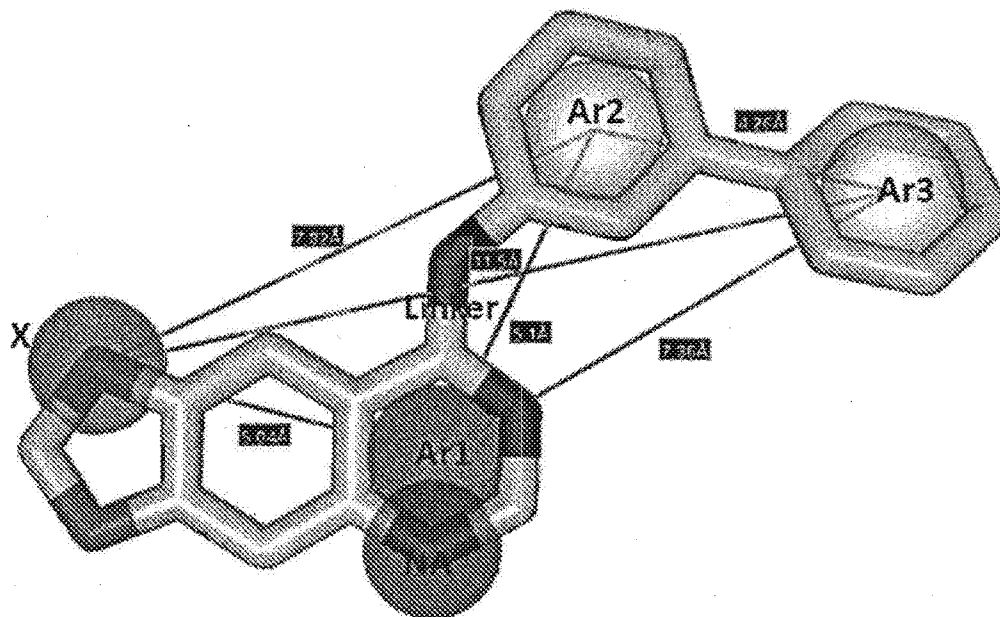


Figura 2

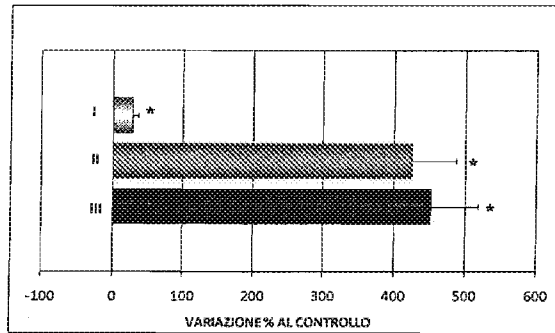
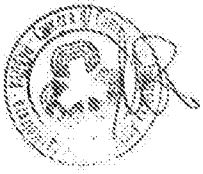


Figura 3

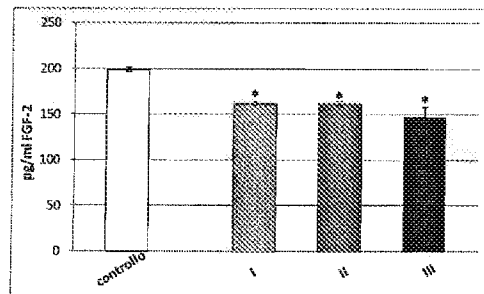


Figura 4

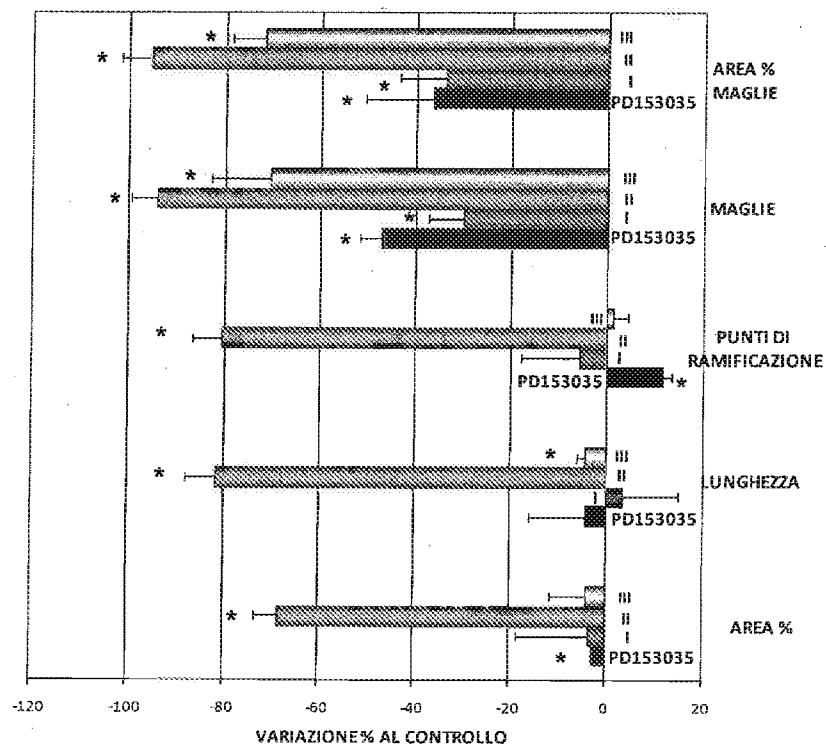


Figura 5

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO

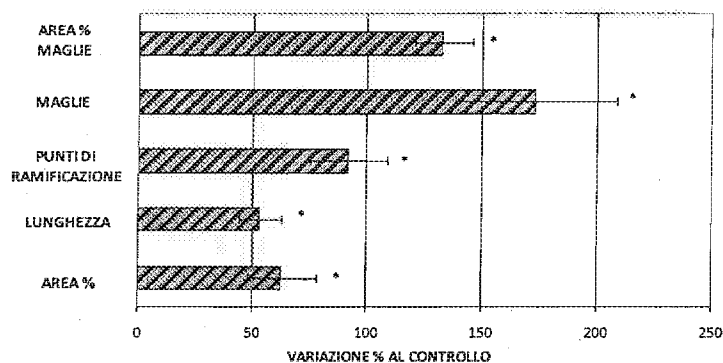
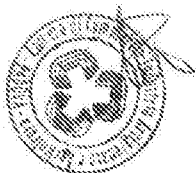


Figura 6

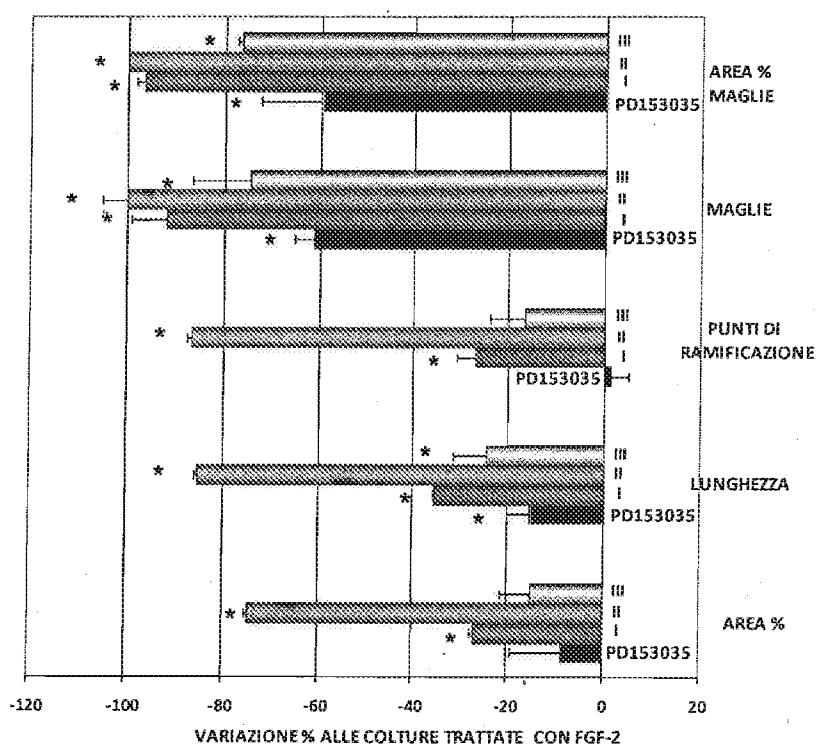


Figura 7

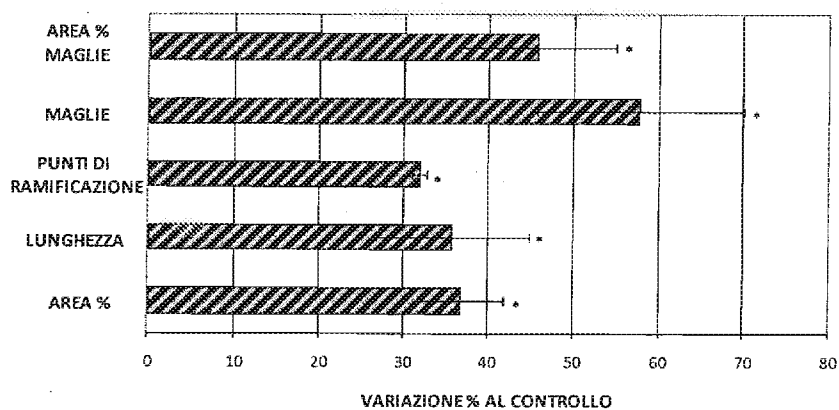


Figura 8

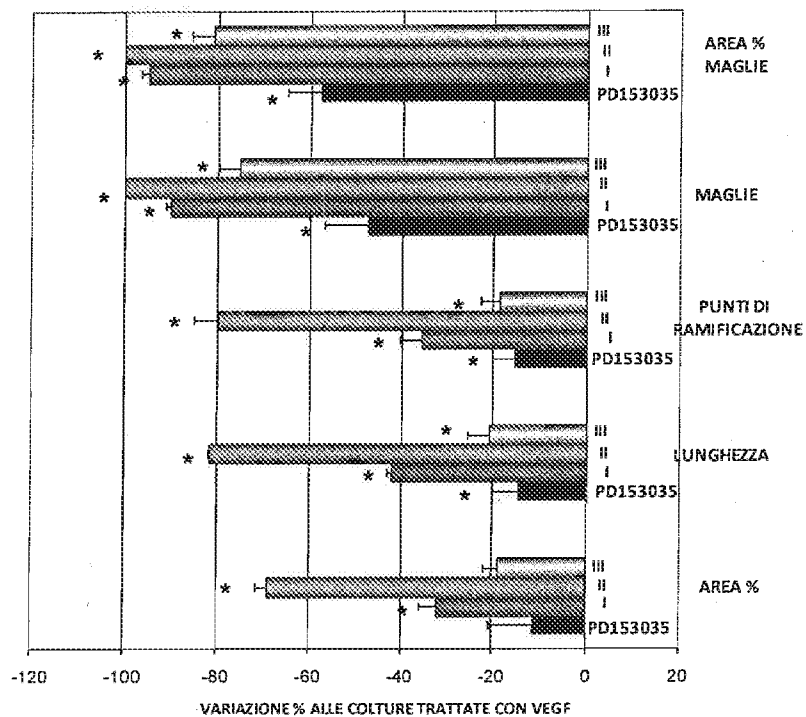
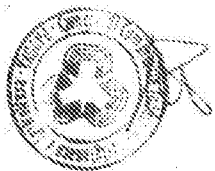


Figura 9

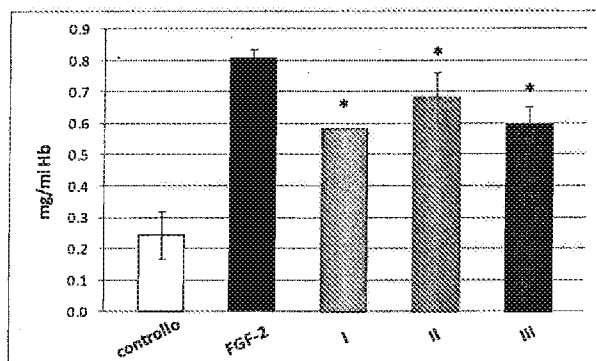
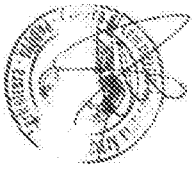


Figura 10



PD2011A000091

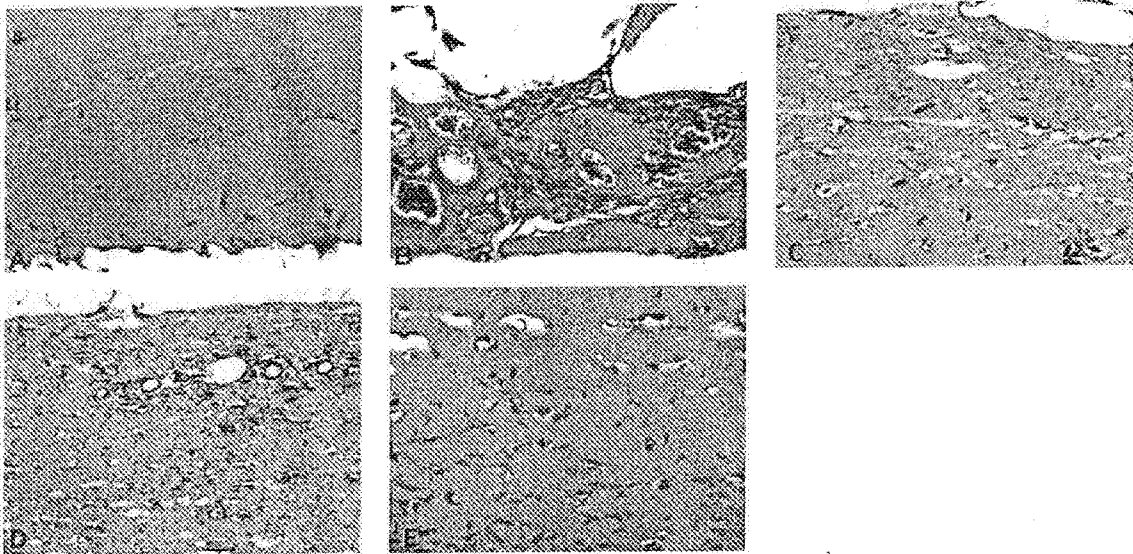


Figura 11