

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Sintesi di PROTAC per ALDH1A3: una strategia indiretta per modulare il
fattore di trascrizione ZEB1 nel cancro*

Relatrice

Prof.ssa Tracey Pirali

Correlatrici

Dott.ssa Rita Maria Concetta Di Martino

Dott.ssa Laura Gioiello

Candidata

Debora Mazzoni

Anno Accademico 2023-2024

Sessione estiva

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Sintesi di PROTAC per ALDH1A3: una strategia indiretta per modulare il
fattore di trascrizione ZEB1 nel cancro*

Relatrice

Prof.ssa Tracey Pirali

Correlatrici

Dott.ssa Rita Maria Concetta Di Martino

Dott.ssa Laura Gioiello

Candidata

Debora Mazzoni

Anno Accademico 2023-2024

Sessione estiva

Indice

1. Introduzione	10
1.1 Struttura e meccanismo d'azione di ZEB1	11
1.2 Il ruolo di ZEB1 nel cancro	12
1.2.1 L'immunosoppressione generata da ZEB1	13
1.2.2 ZEB1 nella staminalità delle cellule tumorali.....	14
1.3 ALDH1A3: il ruolo fisiologico e patologico	15
1.4 Inibitori di ALDH1A3	16
1.4.1 La ricerca di nuovi inibitori per ALDH1A3.....	18
1.4.2 NR6: un derivato di GA11 promettente	19
1.5 La degradazione proteica indotta come nuova strategia antitumorale	20
1.5.1 Struttura e funzionamento dei PROTAC.....	21
1.6 Sviluppo di pro-PROTAC per l'attivazione specifica nel tumore	23
1.6.1 PROTAC attivabili grazie alla nitroreductasi	25
1.6.2 PROTAC attivati dai ROS	26
2. Scopo del lavoro	29
3. Risultati e discussione	32
3.1 Sintesi di PROTAC per ALDH1A3	33
3.2 Sintesi del <i>warhead</i>	36
3.3 Sintesi degli <i>anchor</i>: i ligandi per la ligasi VHL	37
3.4 La prima via sintetica per i PROTAC diretti contro ALDH1A3	38
3.5 La nuova via di sintesi per i PROTAC contro ALDH1A3	39
3.5.1 Sintesi dei <i>building blocks</i> 20-27 a partire dal ligando VH032	40
3.5.2 Reazione di Williamson per l'assemblaggio dei PROTAC.....	41
3.6 Risultati biologici dei PROTAC per ALDH1A3	42

3.7 Lo sviluppo di pro-PROTAC attivati dalla NTR	45
3.7.1 Attivazione del nitrobenzilalcol e funzionalizzazione dell' <i>anchor</i> protetto	45
3.7.2 Incorporazione del nitrobenzile nel PROTAC 32: Strategia A	47
3.7.3 Aggiunta del nitrobenzile al PROTAC 34: Strategia B.....	48
3.7.4 Incorporazione del nitrobenzile nel PROTAC 31: Strategia C	49
4. Conclusioni e sviluppi futuri	50
5. Parte sperimentale	52
6. Bibliografia	91
7. Ringraziamenti	98

Lista delle abbreviazioni

ABC	ATP-binding cassette
AKT	Proteina chinasi B
ALDH	Aldeide deidrogenasi
ATM	Atassia telangiectasia mutata
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	Brest cancer resistance protein
BRD3	Bromodomain – containing protein 3
CDI	di(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metanone
CHK1	Checkpoint kinase 1
CRBN	Cereblon
CRC	Cancro del colon retto
CSC	Cellule staminali tumorali
CtBP	C-terminal-binding protein
DEAB	Dimetilamminobenzaldeidi
DIMAP	4-dimetilamminopiridina
DIPEA	Diisopropilammina
DMA	Dimetilacetammide
DME	Dimetossietano
DMF	<i>N, N</i> -dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide
EGFR	Recettore del fattore di crescita dell'epidermide
EMT	Transizione epiteliale mesenchimale
EtOAc	Etil acetato

EtOH	Etanolo
FR	Fattore di trascrizione
FR-α	Recettore α del folato
GABA	Acido γ -amminobutirrico
HER2	Recettore 2 per il fattore di crescita epiteliale
IL-8	Interleuchina 8
LMA	Leucemia mieloide acuta
MCS	Sferomi multicellulari
MeOH	Metanolo
MHC-II	Complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II
mi-RNA	micro-RNA
MPM	Mesotelioma pleurico maligno
NAD⁺	Nicotinammide adenina dinucleotide
NADP⁺	Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato
NET	Trappole extracellulari dei neutrofilo
NMR	Risonanza magnetica nucleare
NTR	Nitroreduccasi
PE	Petroletere
P-gp	Glicoproteina-P
PI3K	Fosfatidilinositolo 3 fosfato
POI	Proteina di interesse
PROTAC	Proteolysis targeting chimera
RA	Acido retinoico
RARα	Recettore α dell'acido retinoico
R_f	Fattore di ritenzione
ROS	Specie reattive dell'ossigeno

SAR	Relazioni struttura attività
siRNA	Short interfering RNA
TAN	Neutrofili associati al tumore
TEA	Trietilammina
THF	Tetraidrofurano
TLC	Cromatografia su strato sottile
TPD	Targeted protein degradation
USP	Sistema ubiquitina-proteasoma
USP7	Ubiquitin-specific-processing protease 7
VHL	Von Hippel-Lindau
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1

1. Introduzione

1.1 Struttura e meccanismo di azione di ZEB1

ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1) è un fattore di trascrizione (FT) appartenente alla famiglia dei fattori ZEB, che svolge un ruolo cruciale nella proliferazione tumorale. Strutturalmente, le estremità *N*- e *C*-terminali di ZEB1 sono caratterizzate dalla presenza di due domini *zinc finger*, dotati della capacità di legare il DNA a livello di specifiche sequenze denominate E-box. La porzione centrale di ZEB1 presenta un omeodominio e tre domini di legame per l'interazione con le proteine Smad, CtBP e p300-P/CAF, importanti regolatori della sua attività trascrizionale (Fig. 1). Questi tre ultimi domini permettono, inoltre, il reclutamento di diversi regolatori epigenetici che, tramite processi di metilazione o acetilazione, modulano l'espressione di target a valle.¹

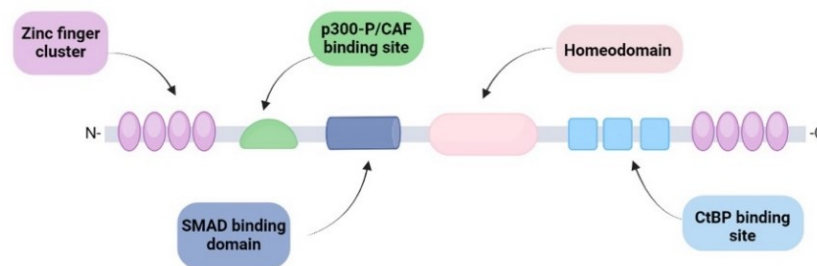


Figura 1: la struttura di ZEB1

Fisiologicamente, ZEB1 è coinvolto in tutti quei processi governati dalla transizione epitelio-mesenchimale (EMT), ovvero quel cambiamento morfologico a cui va incontro una cellula, e che porta alla transdifferenziazione delle cellule epiteliali stazionarie in cellule mesenchimali mobili. L'EMT è alla base dello sviluppo embrionale, della guarigione delle ferite e del mantenimento dell'omeostasi tissutale. Tuttavia, è un processo implicato anche nelle patologie oncologiche, dove contribuisce alla resistenza a radiazioni e chemioterapici, alla fuga immunitaria e alla metastatizzazione.² In tale processo, a causa di una riduzione dell'espressione di marcatori epiteliali e di un aumento di marcatori mesenchimali, le cellule vanno incontro a cambiamenti morfologici, tra cui l'acquisizione di una forma stellata, la perdita delle giunzioni cellulari e della polarità apicale-basale. Tutto ciò determina un aumento della motilità e capacità invasiva nei tessuti circostanti, oltre ad una maggior resistenza ai meccanismi di apoptosi (Fig. 2).³

L'acquisizione della capacità migratoria da parte delle cellule e l'instaurarsi della EMT deriva da quello che viene definito come "fenomeno di commutazione delle caderine", in cui

ZEB1 gioca un ruolo fondamentale. A caratterizzare le cellule epiteliali, infatti, è la presenza della E-caderina, o caderina epiteliale, una molecola di adesione che lega le cellule mediante interazioni omofile, a livello delle giunzioni di adesione cellulare.⁴ ZEB1 agisce legandosi alla sequenza E-box del promotore del gene che codifica per la E-caderina (CDH1) e ne reprime la trascrizione reclutando co-repressori trascrizionali o proteine di rimodellamento della cromatina.⁵ Inoltre, viene repressa la trascrizione di altre componenti delle giunzioni epiteliali come occludine, claudine e desmoplachine. Durante il fenomeno di transizione cellulare da fenotipo epiteliale a mesenchimale, la progressiva perdita delle E-caderine mediata da ZEB1 è accompagnata dall'aumento dell'espressione di geni che codificano per marcatori tipici delle cellule mesenchimali, tra cui la N-caderina, codificata dal gene CDH2, vimentina e differenti metalloproteasi della matrice.⁶

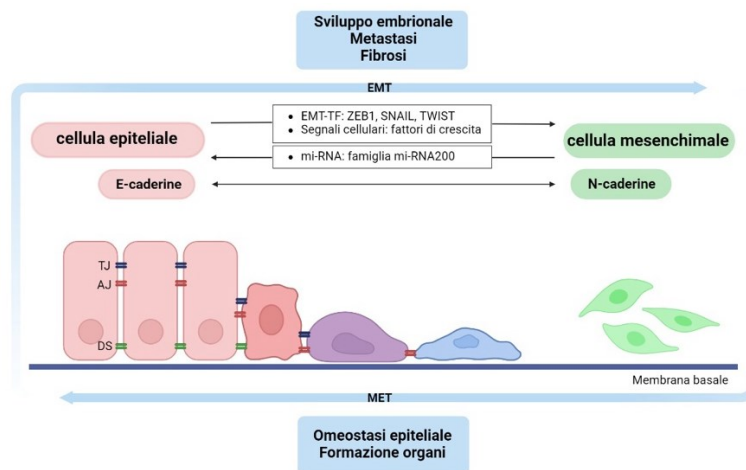


Figura 2: i meccanismi alla base della EMT

1.2 Il ruolo di ZEB1 nel cancro

Dato il ruolo chiave nell'induzione della EMT, ZEB1 è stato trovato overespresso in molte tipologie di tumore, come il glioma, il tumore al polmone, alla mammella e al pancreas.⁷ Una sovra-regolazione di ZEB1 porta allo sviluppo di cellule tumorali con un fenotipo particolarmente invasivo e determina una prognosi clinica peggiore nella maggior parte dei tumori in cui è iperespresso (Fig. 3A).

ZEB1 svolge anche un importante ruolo nella resistenza a chemioterapici e radiazioni. Nel tumore, la radioterapia causa danni a livello dei filamenti di DNA, i quali promuovono l'attivazione della serina-treonina chinasi atassia-telangectasia mutata (ATM). Quest'ultima

attiva ZEB1 mediante fosforilazione e ZEB1 attivato forma un complesso con la deubiquitinasi USP7 (ZEB1-USP). Questo complesso stabilizza la proteina CHK1 attraverso la rimozione delle catene di ubiquitina, permettendo a CHK1 di riparare i danni al DNA tramite la rimozione delle rotture nei filamenti e la ricombinazione omologa.⁸

1.2.1 L'immunosoppressione generata da ZEB1

Recenti studi sottolineano l'importanza di ZEB1 nel generare un ambiente immunosoppressivo, che consente l'*immune escape* delle cellule tumorali. Per esempio, ZEB1 è iperespresso anche da cellule immunitarie, come i neutrofili. È ormai noto il coinvolgimento dei neutrofili in patologie tumorali e nella progressione delle stesse. Queste cellule vengono comunemente mobilitate dal midollo osseo per raggiungere la sede della neoplasia grazie all'azione di citochine, come l'interleuchina 8 (IL-8). I segnali derivanti dal microambiente tumorale sono poi responsabili della polarizzazione dei neutrofili associati al tumore (TAN) verso fenotipi antitumorali, in grado di distruggere direttamente le cellule neoplastiche, o pro-tumorali, in grado di spegnere la risposta immunitaria.⁹ Secondo le attuali ricerche condotte dall'unità di immunologia dell'Istituto Nazionale dei Tumori (INT) di Milano coordinato dalla Dott.ssa Sangaletti, i TAN pro-tumorali presentano un'elevata espressione di ZEB1 e, attraverso il processo di NETosi, rilocalizzano ZEB1 all'interno delle trappole extracellulari dei neutrofili (NET), costituite da cromatina condensata e complessata ad enzimi citotossici. Nell'ambiente extracellulare, i complessi ZEB1-NET sono poi in grado di inibire l'espressione dei complessi maggiori di istocompatibilità di tipo II (MHC II) da parte delle cellule dendritiche, spegnendo così la risposta immunitaria contro le cellule tumorali.

A confermare ulteriormente il ruolo di ZEB1 nell'immuno-regolazione, il gruppo della Dott.ssa Sangaletti ha elucidato come questo FT sia in grado di determinare la progressione non solo di tumori solidi, ma anche di tumori del sangue, come la leucemia mieloide acuta (LMA). È stato dimostrato che ZEB1 espresso dalle cellule leucemiche è in grado di riprogrammare il midollo osseo, favorendo la formazione di una nicchia immunologica che sostiene un microambiente tumorale tollerogenico. Nel dettaglio, agendo direttamente sulle cellule staminali ematopoietiche, ZEB1 blocca il differenziamento dei linfociti T CD8 citotossici e determina l'espansione di cellule T regolatorie e di T-helper 17, ovvero cellule immunosoppressive altamente coinvolte nelle recidive e nella diffusione di metastasi.¹⁰

1.2.2 ZEB1 nella staminalità delle cellule tumorali

Recentemente, la ricerca di nuovi farmaci antitumorali si sta focalizzando sul bersagliare una particolare famiglia di cellule all'interno del tumore, potenzialmente in grado di perpetuare la proliferazione delle cellule cancerose: le cellule staminali tumorali (CSC). Queste ultime sono una sottopopolazione cellulare dotata di autorinnovamento, tumorigenicità, pluripotenza, plasticità e chemioresistenza.¹¹ Le CSC sono capaci di eludere la maggior parte dei trattamenti antineoplastici utilizzati e di differenziarsi in una grande eterogeneità di cellule tumorali.¹² La maggior parte di queste cellule si trova, infatti, in uno stato dormiente o di riposo, quindi in una fase G0 del ciclo cellulare. In questa fase, le CSC non sono bersaglio né di radiazioni né di farmaci chemioterapici, che colpiscono invece le cellule in rapida divisione.

La resistenza ai chemioterapici delle CSC è anche associata ad un'elevata espressione dei trasportatori di membrana *ATP-binding cassette* (ABC), come la glicoproteina P (P-gp /ABBC1) e la proteina di resistenza del cancro al seno (BCRP / ABCG2), le quali agiscono da trasportatori di xenobiotici.¹³

Un altro aspetto cruciale che contraddistingue le CSC dalle classiche cellule tumorali è l'elevata capacità invasiva. Varie ricerche hanno, infatti, dimostrato che i fattori coinvolti nella EMT, come ZEB1, sono altamente espressi all'interno di queste cellule e, di conseguenza, sono implicati nell'induzione della loro staminalità.¹⁴ Inoltre, all'interno di esse, ZEB1 è up-regolato da un altro biomarcatore chiave delle CSC, ovvero l'enzima aldeide deidrogenasi 1A3 (ALDH1A3), in grado di promuovere il fenotipo tumorale staminale principalmente attraverso la modulazione genetica.¹⁵ Recenti studi hanno confermato l'alto coinvolgimento di ALDH1A3 nella sovra-espressione di ZEB1, attraverso la soppressione del micro-RNA 200 (miR-200), un regolatore endogeno negativo di questo FT. Jiang-Jie Duan *et. al* hanno, infatti, evidenziato come l'inibizione di ALDH1A3 nel cancro al colon retto (CRC) da parte di YD1701 (Fig. 4A), un inibitore selettivo, porti ad una diminuzione dei livelli intracellulari di ZEB1, con un conseguente ristabilimento dell'espressione di E-caderine, il passaggio ad un fenotipo epiteliale ed una diminuzione della formazione di metastasi *in vivo*.¹⁶

ALDH1A3 rappresenta, quindi, un interessante bersaglio farmacologico per il targeting indiretto di ZEB1.

1.3 ALDH1A3: il ruolo fisiologico e patologico

I normali processi fisiologici che interessano sostanze come amminoacidi, carboidrati, lipidi e neurotrasmettitori causano un accumulo di aldeidi, le quali, se non propriamente eliminate, comportano citotossicità, infiammazione ed un aumento dello stress ossidativo. La famiglia delle aldeidi deidrogenasi (ALDH), costituita da 19 enzimi, ha come compito principale quello di detossificare l'organismo da tali aldeidi. In particolare, catalizza l'ossidazione irreversibile delle aldeidi nei corrispondenti acidi carbossilici, utilizzando come cofattore la nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺) o la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP⁺).¹⁷ In aggiunta, questi enzimi sono essenziali nella biosintesi di regolatori metabolici, che mantengono l'omeostasi cellulare, come l'acido γ -amminobutirrico (GABA), la dopamina, la betaina e l'acido retinoico (RA).

Le diverse isoforme della famiglia ALDH sono caratterizzate da un'elevata omologia strutturale e si presentano principalmente come omodimeri o omotetrameri. Ogni monomero è costituito da un dominio catalitico, un dominio legante il cofattore e un dominio di oligomerizzazione.¹⁸ Le isoforme 1A1, 1A2 e 1A3 sono principalmente implicate nell'ossidazione del *trans*-retinale, un metabolita della vitamina A, ad acido *trans*-retinoico (RA). Quest'ultimo, attraverso l'interazione con il proprio recettore (recettore dell'acido retinoico, RAR), induce importanti processi, come il differenziamento tissutale, la formazione di organi durante l'embriogenesi, lo sviluppo del sistema neurovascolare, il mantenimento dell'omeostasi intestinale e l'attivazione della risposta immunitaria.¹⁹ Elevati livelli di ALDH1A3 sono stati riscontrati nelle CSC, che popolano diverse tipologie di neoplasie, come il cancro al colon retto e alla mammella, il glioma ed il mesotelioma, determinando prognosi peggiori per i pazienti oncologici.

Oltre a garantire l'invasività delle cellule tumorali attraverso l'induzione di ZEB1, ALDH1A3 attiva il *pathway* PI3K/AKT, a seguito dell'attivazione di RAR α da parte di AR. Questa via di segnalazione è implicata in cambiamenti nella differenziazione e proliferazione cellulare, determinando una crescita cellulare incontrollata a livello della massa tumorale.²⁰ La segnalazione PI3K/AKT promuove, inoltre, l'attivazione di FT a valle coinvolti nella riprogrammazione metabolica cellulare e nella glicolisi, determinando un aumento della produzione di ATP nelle cellule neoplasiche, favorendone il mantenimento.²¹ Un'ultima funzione chiave svolta da ALDH1A3 nella crescita tumorale è la sua attività antiossidante.

Le cellule tumorali sono caratterizzate da elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) derivanti dal metabolismo aberrante. L'eliminazione di queste specie da parte di ALDH1A3 riduce lo stress ossidativo e previene l'innescò dei meccanismi di apoptosi, favorendo la crescita tumorale.²²

Il coinvolgimento di ALDH1A3 nella progressione tumorale lo rendono un valido bersaglio terapeutico per il trattamento di diverse forme di cancro (Fig. 3B).

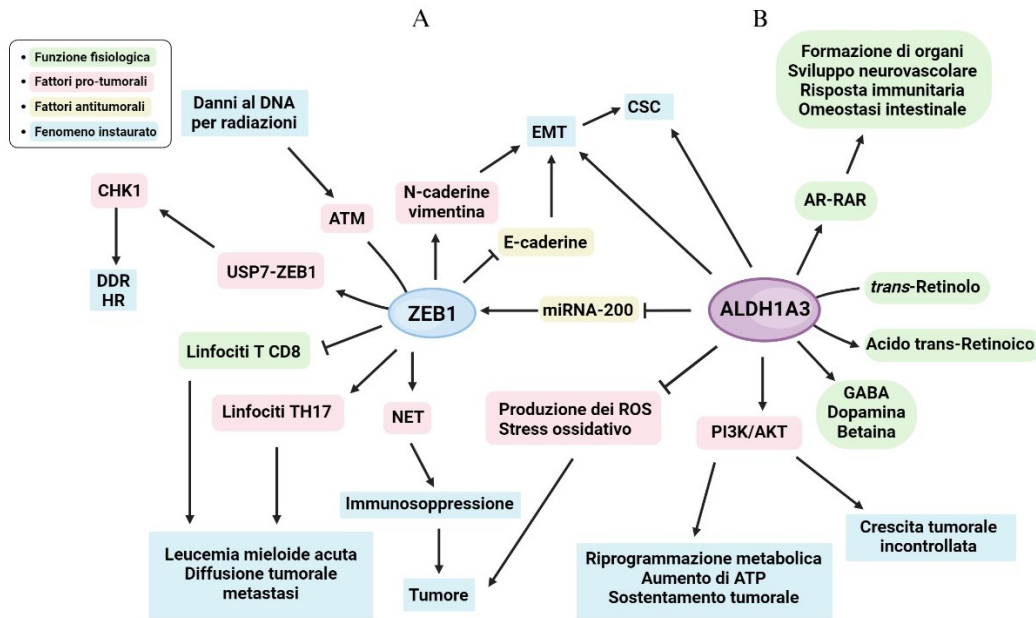


Figura 3: pathway di segnalazione e funzioni di ZEB1 e ALDH1A3

1.4 Inibitori di ALDH1A3

Una valida strategia per bersagliare un tumore ricco di CSC è, pertanto, quella di colpire selettivamente ALDH1A3. Il problema principale nello sviluppo di inibitori selettivi per questa classe di enzimi è l'elevata omologia strutturale tra le diverse isoforme della famiglia. In letteratura, infatti, molecole come disulfiram, cimetidina e dimetilamminobenzaldeidi (DEAB) sono riportate come inibitori di ALDH ma, poiché queste non sono in grado di inibire selettivamente un singolo membro della famiglia ALDH1, nessuna di esse è stata approvata per il trattamento del cancro.

Ci sono, invece tre inibitori di recente sviluppo che presentano una selettività più marcata verso l'isoforma 1A3: YD1701 (Fig. 4A), MCI-INI-3 (Fig. 4B), KOTX1 (Fig. 4C).

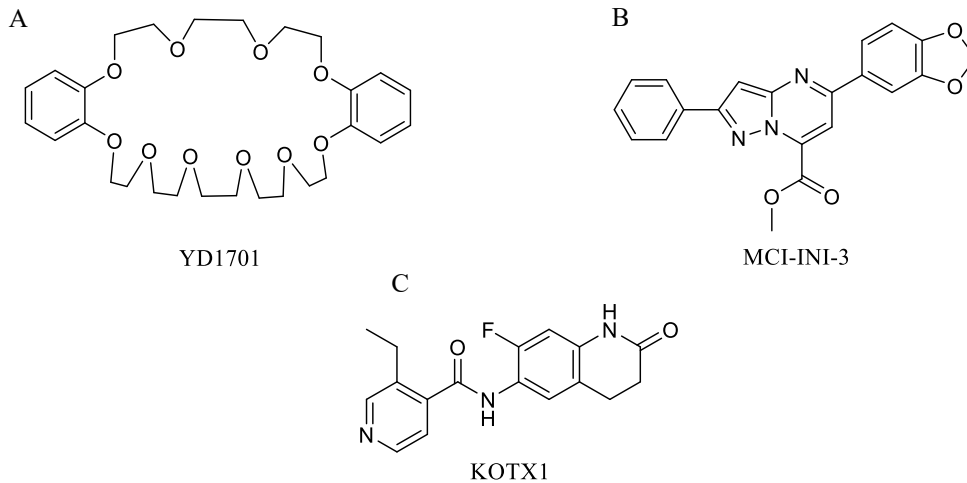


Figura 4: inibitori selettivi sviluppati per ALDH1A3

YD1701 (Fig. 4A), l'inibitore di ALDH1A3 citato precedentemente, è stato identificato come promettente agente terapeutico per il trattamento del CRC. In particolare, YD1701, attraverso inibizione indiretta di ZEB1, ha dimostrato di ridurre l'invasività e le metastasi di CRC in modelli murini, inducendo nelle cellule tumorali cambiamenti morfologici legati ad una transizione verso un fenotipo epiteliale. Ulteriori indagini sono necessarie per validarne l'efficacia su altri tipi di tumori.¹⁶

MCI-INI-3 (Fig. 4B) è un inibitore sviluppato grazie ad un virtual screening e che ha mostrato un valore di IC_{50} di 0.46 μ M nei confronti dell'ALDH1A3 ricombinante umana. Vista la buona attività inibitoria esibita nel saggio enzimatico, MCI-INI-3 è stato testato in due diverse linee cellulari staminali tumorali di glioma: una esprime ALDH1A3 e l'altra avente il gene codificante per l'enzima silenziato, allo scopo di valutarne la selettività per ALDH1A3. L'inibitore ha mostrato inaspettatamente un effetto citotossico in entrambe le linee cellulari, portando, quindi, alla conclusione che gli effetti mediati da MCI-INI-3 sulla vitalità cellulare delle CSC non fossero direttamente correlati ad ALDH1A3, ma potrebbero derivare da effetti *off-target*.²³

Un ultimo inibitore identificato per bloccare l'attività di ALDH1A3 è KOTX1 (Fig. 4C). ALDH1A3 è coinvolta nella disfunzione o nella mancata differenziazione delle cellule β

pancreatiche provocando una diminuzione del rilascio di insulina, che può condurre allo sviluppo del diabete. KOTX1 è un inibitore non citotossico e reversibile, che mostra una IC_{50} di 5.1 nM ed un'elevata selettività nei confronti dell'isoforma 1A3. Gli esperimenti *in vivo* condotti sui roditori con questo inibitore hanno mostrato una diminuzione dell'espressione e dell'attività di ALDH1A3 con conseguente aumento della secrezione di insulina, stimolata dal glucosio dal 50 al 150%.²⁴

1.4.1 La ricerca di nuovi inibitori per ALDH1A3

Recenti studi svolti dal gruppo della Prof.ssa La Motta hanno permesso di individuare una nuova classe di inibitori selettivi per l'isoforma 1A3, caratterizzati da una sottostruttura imidazo[1,2-*a*]piridinica e dotati di un'elevata attività citotossica nei confronti di diverse linee cellulari di glioblastoma. In particolare, a partire da modifiche strutturali sulla daidzeina,²⁵ di cui è nota la sua attività inibitoria su ALDH1, è stato sviluppato **GA11** (Fig. 5A), il quale però non ha dimostrato selettività tra le differenti isoforme ALDH.

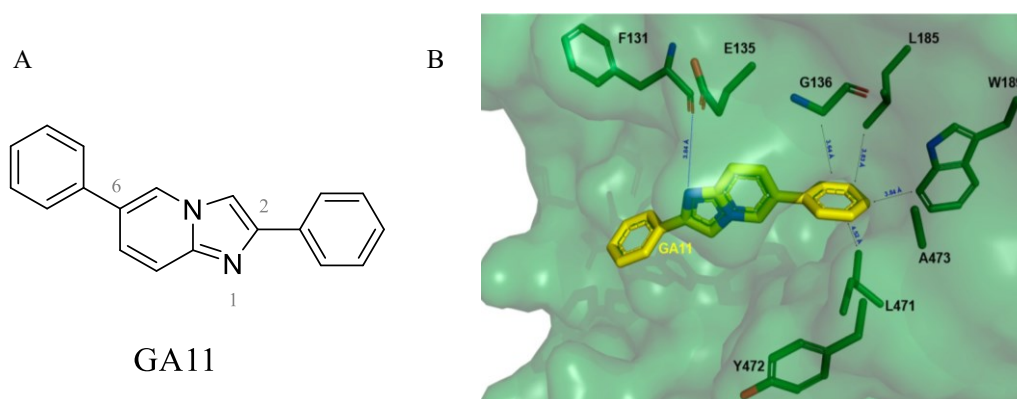


Figura 5: struttura di GA11 (5A) e ALDH1A3 cristallizzata con l'inibitore (5B)²⁶

Grazie ad uno studio cristallografico, è stata elucidata la sua posa di legame all'interno del sito attivo di ALDH1A3: l'inibitore si posiziona all'ingresso del tunnel catalitico del sito attivo, precludendo in questo modo l'accesso al substrato naturale, il retinale. Nel dettaglio, l'azoto in posizione 1 dello scaffold interagisce con il carbonile del residuo F131, mentre il nucleo eterociclico prende contatto con la tasca idrofobica presente all'interno del sito attivo (Fig. 5B).²⁶

Per poter aumentare la selettività dei composti verso l'isoforma 1A3, il gruppo della Prof.ssa La Motta ha condotto uno studio delle relazioni struttura-attività (SAR) su **GA11**, basato sulla diversa funzionalizzazione dei due anelli fenilici legati alle posizioni 2 e 6 del nucleo eterociclico (Fig. 5A). Lo studio SAR ha portato all'identificazione di un nuovo inibitore potente e selettivo: **NR6** (Fig. 6A).

1.4.2 NR6: un derivato di GA11 promettente

Nel saggio enzimatico, l'inibitore **NR6** (Fig. 6A) ha dimostrato un valore di IC_{50} di 5.3 ± 1.5 μ M e una K_i di 3.7 ± 0.4 μ M (Tab. 1), confermando un meccanismo di inibizione di tipo competitivo ed una discreta potenza. L'inibitore conserva la struttura eterociclica di **GA11**, con l'aggiunta di un nitrile nella posizione meta dell'anello fenilico della posizione 6, che permette alla molecola di inserirsi nella tasca di legame dell'enzima con una sola posa rigida e conservata, risultando altamente selettiva nei confronti di ALDH1A3 (Tab. 1). Nel dettaglio, l'anello piridinico stabilisce delle interazioni π - π con il residuo di tirosina (Y472), all'interno del sito attivo dell'isoforma 1A3 (Fig. 6B), e stabilizzate dalla formazione di un legame idrogeno tra il gruppo ossidrilico della stessa tirosina Y472 e l'azoto in posizione 1 dell'inibitore (Fig. 6A).²⁸ L'eccellente selettività di NR6 è legata al fatto che la tirosina Y472 non è conservata nelle tasche delle isoforme 1A1 e 1A2.

	ALDH1A1	ALDH1A2	ALDH1A3
IC₅₀ (μM)	57.6 \pm 2.2	123.6 \pm 2.2	5.3 \pm 1.5
K_i (μM)	262.2 \pm 76.4	257.6 \pm 26.4	3.7 \pm 0.4

Tabella 1: valori di IC_{50} e K_i di NR6 per le isoforme ALDH1²⁷

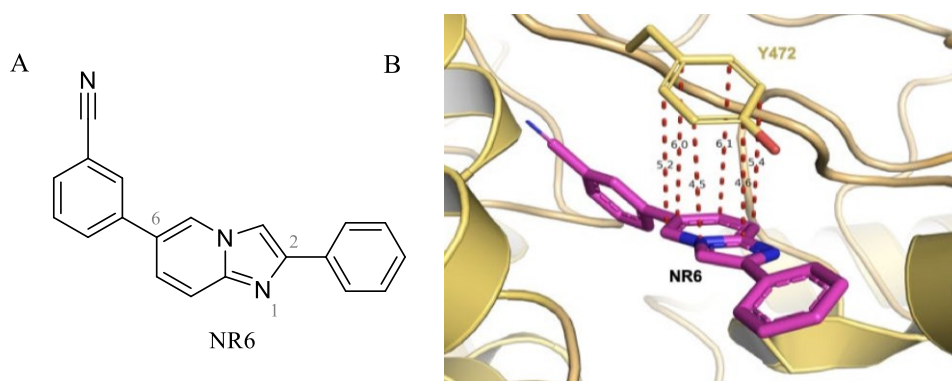


Figura 6: struttura di NR6 (6A) e struttura cristallografica del complesso NR6-ALDH1A3 (6B)²⁷

In aggiunta, **NR6** è grado di interferire oltre che con la crescita cellulare, anche con il potenziale migratorio e invasivo delle cellule neoplasiche di glioblastoma.²⁷ Questo inibitore è stato testato su cinque linee cellulari, ognuna caratterizzata da un diverso pattern di espressione delle isoforme della famiglia ALDH. Dopo 72 ore di incubazione, **NR6** ha mostrato nelle linee che esprimevano l'isoforma 1A3 una EC₅₀ picomolare (ad esempio di 0.378 nM nella linea cellulare U87 MG). Al contempo, le linee cellulari non aventi questi enzimi o esprimenti le isoforme 1A1 e 1A2 non sono risultate in alcun modo suscettibili all'azione di questo inibitore.

NR6 è stato, inoltre, testato su sferoidi multicellulari (MCS) di mesotelioma pleurico maligno (MPM) determinando un arresto della crescita anche di queste cellule neoplastiche. Sorprendentemente, la somministrazione dell'inibitore alle cellule tumorali di mesotelioma in co-cultura con neutrofili provenienti da un donatore sano, ha ridotto il rilascio di IL-8, bloccando, quindi, il reclutamento dei neutrofili e la conseguente formazione di NET.²⁸ I risultati ottenuti suggeriscono un coinvolgimento diretto di ALDH1A3 anche nella regolazione dei neutrofili associati al tumore, contribuendo in qualche modo all'immunosoppressione da questi generata.

1.5 La degradazione proteica indotta come nuova strategia antitumorale

Ad oggi, i trattamenti disponibili per la terapia oncologica includono l'utilizzo di chemioterapici, di anticorpi monoclonali e short interfering RNA (siRNA), accanto all'utilizzo della radioterapia. Tuttavia, i meccanismi di resistenza che si instaurano a causa di cambiamenti adattivi dell'oncoproteina e gli effetti collaterali derivanti dall'attività *off-target* dei suddetti trattamenti hanno portato alla necessità di sviluppare nuovi approcci basati non più sulla classica inibizione della proteina target, ma bensì sulla degradazione proteica mirata (targeted protein degradation – TPD).^{29,30} Quest'ultima rappresenta una tecnologia ampiamente sfruttata nell'ultimo ventennio per eliminare proteine *undruggable*, cioè non bersagliabili dai classici inibitori in diversi ambiti terapeutici, tra cui l'oncologia. Tra tutti i *degraders* sviluppati e noti, i *Proteolysis Targeting Chimeras* (PROTACs) rappresentano l'approccio più sfruttato.³¹ I PROTAC sono molecole eterobifunzionali che inducono la degradazione della proteina di interesse (POI) attraverso un sistema di degradazione proteica comune a tutte le cellule: il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). La degradazione proteolitica indotta dall'UPS è un fenomeno ATP dipendente avviato da una cascata

enzimatica che coinvolge tre distinti enzimi: la ligasi E1 in grado di attivare l'ubiquitina (una piccola proteina costituita da 76 amminoacidi), la ligasi E2, che è l'enzima coniugante l'ubiquitina e l'ubiquitina ligasi E3. Al termine di tale processo l'ubiquitina viene trasferita al substrato da degradare mediante la formazione di legami covalenti tra i residui di glicina C-terminale (Gly76) dell'ubiquitina stessa e i residui di lisina presenti sulla proteina *target*. Questo ciclo viene ripetuto più volte al fine di poli-ubiquitinare il substrato, rendendolo, quindi, riconoscibile dal proteasoma 26S e degradabile (Fig. 7).³²

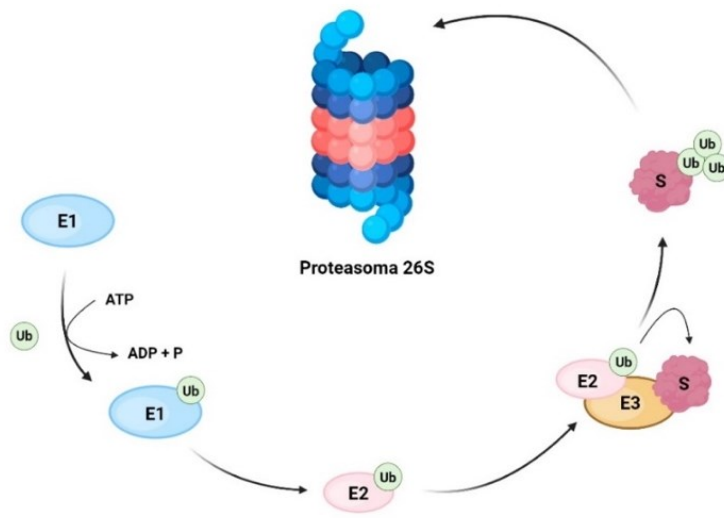


Figura 7: meccanismo di degradazione ubiquitina-proteasoma

1.5.1 Struttura e funzionamento dei PROTAC

I PROTAC sono molecole chimeriche eterobifunzionali costituite da un *warhead*, ovvero un ligando per la proteina *target*, e da un *anchor*, un ligando deputato al reclutamento della E3 ligasi, legati tra di loro tramite un *linker* di lunghezza variabile (Fig. 8). Queste molecole hanno il compito di indurre prossimità tra la E3 ligasi e la POI, generando un complesso ternario che promuove l'ubiquitinazione della POI e la sua successiva degradazione da parte del proteasoma.

Questo meccanismo d'azione degradativo differisce dalla classica inibizione esercitata da ligandi, che agiscono in modo stechiometrico ed il cui "effetto è guidato dall'occupazione" di specifici siti attivi o allosterici sulla POI, in modo da bloccare/antagonizzarne la/le funzione/i. I PROTAC esercitano, invece, un effetto "guidato dagli eventi" che non richiede la saturazione della proteina *target*, agendo a concentrazioni sub-stechiometriche e con meccanismo catalitico.³³

Un vantaggio della tecnologia PROTAC rispetto alla classica inibizione è rappresentato dal fatto che essa richiede la disponibilità di ligandi in grado di reclutare la POI, anche con affinità di legame non elevatissime, al fine di eliminare la proteina *target* associata alla patogenesi di una malattia. Ciò permette potenzialmente di bersagliare qualsiasi tipo di proteina, anche quelle definite *undruggable* caratterizzate da un sito attivo non ben definito. Inoltre, la degradazione della POI indotta dai PROTAC avviene solo se vengono soddisfatte diverse condizioni, tra cui: (i) il *warhead* deve poter legare in modo selettivo la POI e quest'ultima deve essere un substrato fisiologico della E3 ligasi reclutata dall'*anchor*; (ii) il *linker* deve essere dotato di caratteristiche tali da consentire la formazione di un complesso ternario stabile; (iii) la POI deve essere dotata di residui di lisina sulla superficie, oggetto di coniugazione con le catene di ubiquitina. Questi rappresentano importanti requisiti che, quando soddisfatti, rendono la tecnologia PROTAC un approccio molto più selettivo rispetto alla classica inibizione³⁴. Infine, un ultimo vantaggio nell'utilizzo dei PROTAC è dovuto al fatto che l'effetto farmacologico può essere prolungato poiché dipende dalla velocità di ri-sintesi della proteina *target* degradata.³⁵

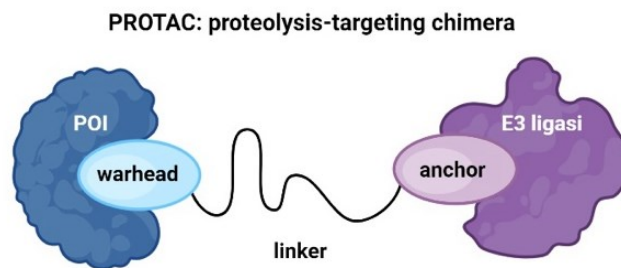


Figura 8: struttura di un PROTAC

La tecnologia PROTAC vanta di essere molto versatile, in quanto la variazione del *warhead* permette di sviluppare PROTAC diretti verso differenti POI. Ad oggi, i PROTAC sono stati applicati per indurre la degradazione di un'ampia gamma di *target* diversi, come proteine implicate in vari tipi di cancro, in patologie autoimmuni, infiammatorie, virali e nel morbo di Alzheimer.³⁶

Ad oggi nessun PROTAC ha ottenuto l'autorizzazione all'immissione sul mercato. Tuttavia, alcuni di essi sono correntemente valutati in studi clinici³⁷ (Tab. 2) e tra quelli in stadio più avanzato troviamo ARV-110 per il trattamento del cancro alla prostata e ARV-471 per il

trattamento del cancro alla mammella, attualmente in fase II e III, rispettivamente (Fig. 9A e B).^{38,39}

<i>PROTAC</i>	<i>Target</i>	<i>E3 ligasi</i>	<i>Indicazione clinica</i>	<i>Fase di sviluppo</i>
<i>ARV-471</i>	ER	CRBN	Cancro alla mammella	Fase III
<i>ARV-110</i>	AR	CRBN	Cancro prostatico	Fase II
<i>ARV-766</i>	AR	VHL	Cancro prostatico	Fase II
<i>AC682</i>	ER	CRBN	Cancro alla mammella	Fase I
<i>CFT8634</i>	BRD9	CRBN	Sarcoma sinoviale	Fase I / II
<i>FHD-609</i>	BRD9	-	Sarcoma sinoviale avanzato	Fase I (sospensione clinica parziale)
<i>KT-413</i>	IRAK4	CRBN	Linfoma diffuso a cellule B	Fase I
<i>KT-333</i>	STAT3	CRBN	Tumori liquidi e solidi	Fase I
<i>DT2216</i>	BCL-XL	VHL	Tumori liquidi e solidi	Designazione rapida dell'FDA
<i>GT-20029</i>	AR	CRBN	Cancro prostatico	Fase I

Tabella 2: PROTAC in fase clinica aventi target in ambito oncologico³⁷

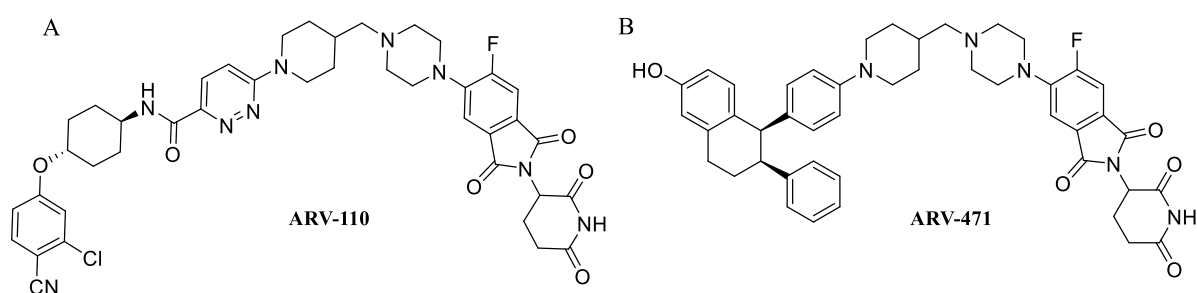


Figura 9: struttura di ARV-110 (9A) e ARV-471 (9B)

1.6 Sviluppo di pro-PROTAC per l'attivazione specifica nel tumore

Uno dei problemi che si possono riscontrare durante lo sviluppo dei PROTAC è la possibile tossicità *on-target* e *off-target*. Nel primo caso, la tossicità è correlata al fatto che la POI, oltre

a quelle legate al disordine patologico, può svolgere funzioni essenziali per la sopravvivenza cellulare. Di conseguenza, la degradazione della proteina *target* indotta dal PROTAC potrebbe risultare particolarmente dannosa a livello dei tessuti sani.⁴⁰

La tossicità *off-target*, invece, è data dalla degradazione non intenzionale di proteine diverse dal bersaglio desiderato. Questo effetto può essere dovuto in parte ad una degradazione *bystander*, ovvero quel fenomeno in cui la proteina degradata non è quella reclutata direttamente dal PROTAC, ma è un'altra proteina che, trovandosi in sua prossimità, va incontro all'ubiquitinazione da parte della E3 ligasi.⁴¹ In altri casi la tossicità *off-target* può essere in parte spiegata dall'*effetto hook*, un fenomeno che si verifica quando il PROTAC è somministrato ad alte concentrazioni, in cui viene promossa la formazione di complessi binari E3-PROTAC o POI-PROTAC, anziché del complesso ternario. In questo modo, il complesso binario può indurre la degradazione di altre proteine citoplasmatiche ed è, in aggiunta, potenzialmente in grado di esercitare una risposta farmacologica.⁴² È quindi necessario valutare attentamente la funzione delle proteine *off-target* degradate e le conseguenze della riduzione dei loro livelli intracellulari.

Con lo scopo di migliorare la finestra terapeutica dei PROTAC, migliorandone da una parte le caratteristiche farmacocinetiche e dall'altra riducendo la tossicità *on/off target*, sono stati sviluppati alcuni pro-PROTAC, ovvero delle *pro-drug* in grado di rilasciare selettivamente la forma attiva del PROTAC a livello tumorale.⁴³ Tra questi troviamo PROTAC coniugati con anticorpi, di cui un esempio è rappresentato dal coniugato trastuzumab-PROTAC per il targeting selettivo di HER2 nel carcinoma mammario metastatico. Tale pro-PROTAC è costituito da un linker che, da una parte, permette la coniugazione con l'anticorpo e, dall'altra, blocca il reclutamento della E3 ligasi, impedendo al PROTAC di indurre la degradazione della POI. In seguito all'internalizzazione, il linker viene idrolizzato, permettendo il rilascio del PROTAC attivo.⁴⁴

Altri esempi sono PROTAC coniugati con aptameri, ovvero sequenze oligonucleotidiche a singolo filamento, in grado di legarsi in modo specifico al bersaglio caratterizzato da domini di legame per il DNA.⁴⁵ In letteratura sono presenti anche dei pro-PROTAC costituiti da folati, per dirigere l'attività verso cellule tumorali esprimenti alti livelli di recettori folato α (FR- α)⁴⁶, così come pro-PROTAC attivati da luce e radiazioni.^{47,48}

Un'altra categoria di pro-PROTAC è rappresentata dai PROTAC attivabili in condizioni ipossiche, descritti di seguito.

1.6.1 PROTAC attivabili grazie alla nitroreduptasi

Le cellule neoplasiche, a causa della loro proliferazione incontrollata, consumano ossigeno in modo amplificato rispetto alle cellule sane. Tuttavia, i vasi adiacenti al tumore non sono in grado di apportare il quantitativo di O₂ sufficiente, generando quindi un microambiente tumorale ipossico.^{49,50} Questa condizione promuove la sovra-espressione di proteine come la nitroreduptasi (NTR)⁵¹, un enzima in grado di ridurre i gruppi nitro nelle corrispondenti idrossilammine o ammine, utilizzando NADH come donatore di elettroni. L'espressione di questo enzima risulta quasi assente nei tessuti sani.

Con lo scopo di dirigere l'azione del PROTAC verso le cellule tumorali, la ricerca ha quindi sviluppato pro-PROTAC in grado di attivarsi esclusivamente in condizioni ipossiche, sfruttando le elevate concentrazioni di NTR. Nel dettaglio, si è pensato di mascherare i farmacofori chiave degli *anchor* per l'interazione con la E3 ligasi introducendo dei gruppi uscenti (come il 4-nitrobenzile e l'1-metil-2-nitro-1*H*-imidazolo), (Fig. 10A) in grado di essere clivati chimicamente dalla NTR presente nel tumore.

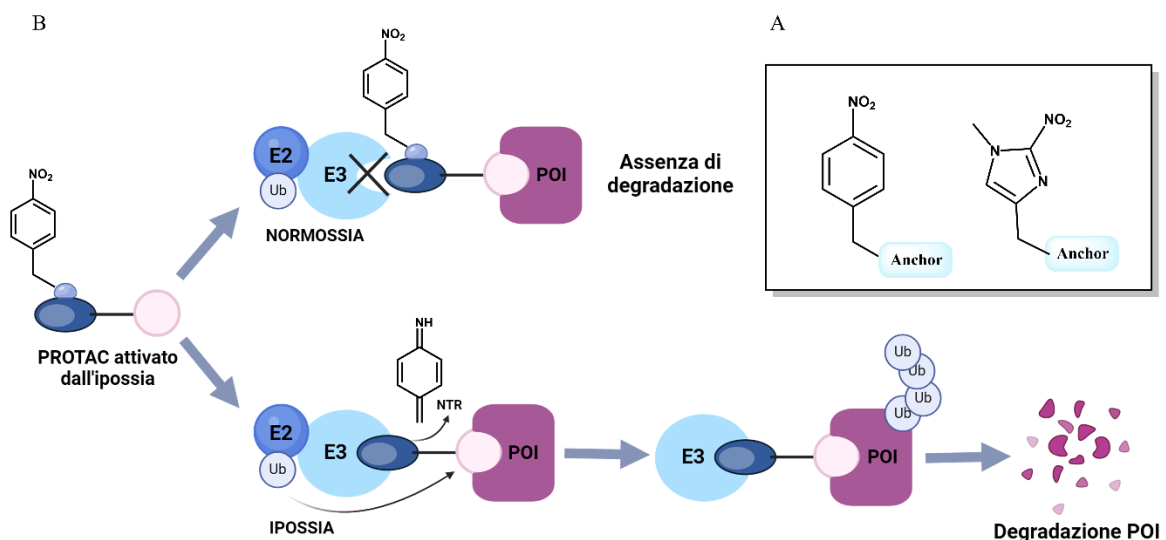


Figura 10: attivazione del PROTAC mediata dall'ambiente tumorale ipossico in presenza di NTR

In condizioni normossiche, quindi, il PROTAC non è attivo. Nel tumore, invece, la NTR riduce il gruppo nitro dei gruppi uscenti, generando la corrispondente forma ridotta. Questa non è stabile e spontaneamente si cliva, liberando così il PROTAC attivo (Fig. 10B).⁵²

Il primo pro-PROTAC sviluppato per agire in modo selettivo in ambiente ipossico è il composto riportato in Fig. 11, in grado di degradare efficacemente il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), e caratterizzato dalla presenza del gruppo uscente 1-metil-2-nitro-1*H*-imidazolo sull'ossidrilica della prolina del ligando per reclutare la E3 ligasi Von Hippel-Lindau (VHL). Il composto è risultato non attivo *in vitro* su cellule di carcinoma polmonare in condizioni di normossia, mentre ha esibito attività sulle stesse cellule incubate in condizioni ipossiche (<1% O₂). Il PROTAC è stato poi testato *in vivo*, dove ha dimostrato una soppressione significativa della crescita tumorale, accanto ad un'ottima tollerabilità.⁵²

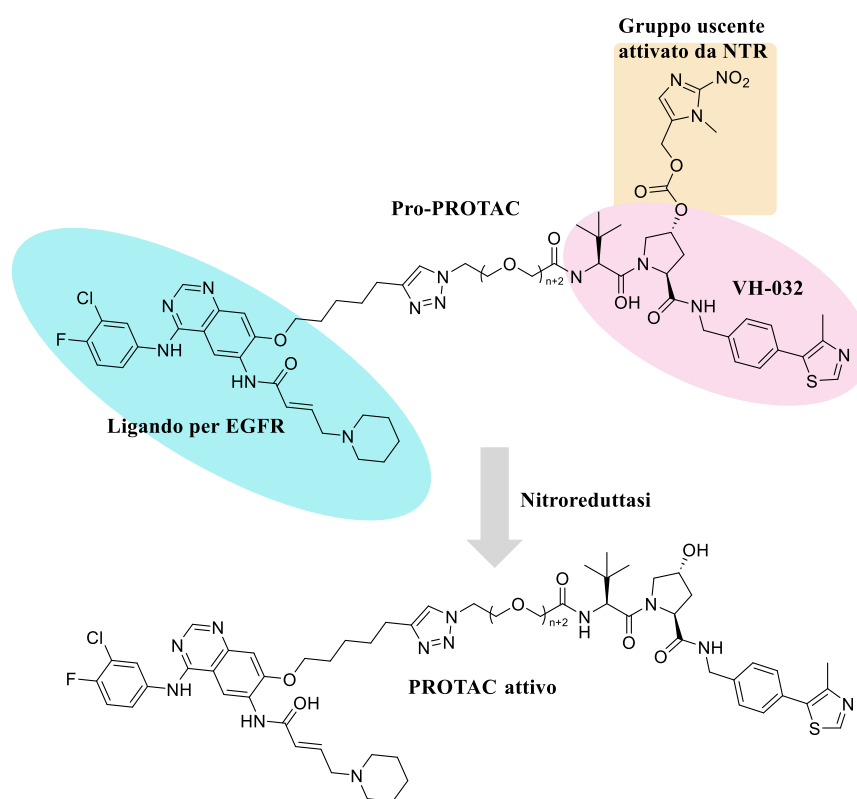


Figura 11: attivazione del pro-PROTAC ad opera della NTR per agire in modo selettivo nell'ambiente ipossico⁵²

1.6.2 PROTAC attivati dai ROS

Un'altra strategia per il rilascio direzionato del PROTAC in condizioni ipossiche si basa sulla funzionalizzazione degli *anchor* con gruppi clivabili in presenza di specie reattive

dell'ossigeno (ROS). I ROS sono radicali, ioni o molecole altamente reattivi derivati dall'ossigeno come il radicale superossido $O_2^{\cdot-}$, il radicale ossidrile OH^{\cdot} , il perossido di idrogeno H_2O_2 e l'ossigeno singoletto 1O_2 . Concentrazioni molto elevate di ROS si trovano all'interno delle cellule neoplasiche, dove contribuiscono a promuovere l'attivazione della segnalazione oncogenica e la crescita metastatica.⁵³

A differenza dei PROTAC attivati dalla NTR, i pro-PROTAC attivati dai ROS sono stati sviluppati al fine di sfruttare le elevate concentrazioni di ROS nel tumore per il rilascio selettivo del PROTAC attivo. Questi pro-PROTAC vengono funzionalizzati attraverso l'incorporazione di acidi ed esteri boronici, i quali, in presenza delle specie ROS, vengono convertiti negli intermedi fenolici instabili, che vanno, infine, incontro ad una eliminazione 1,6-benzilica, in modo da rilasciare il PROTAC attivo (Fig. 12).

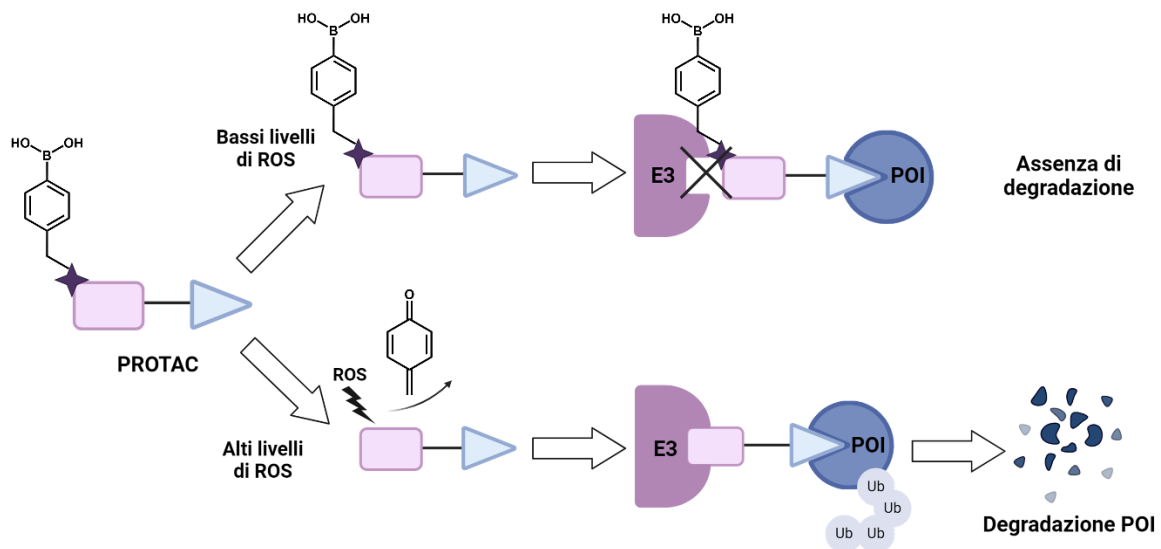


Figura 12: meccanismo di attivazione dei PROTAC attivati dai ROS

Un pro-PROTAC sviluppato con successo è il composto rappresentato in Fig. 13, avente come *target* la proteina BRD3, coinvolta nella progressione tumorale del cancro alla mammella. La funzionalizzazione del PROTAC mediante l'aggiunta di un gruppo metilfenilboronico acido al gruppo NH_2 della lenalidomide (un ligando per reclutare la E3 ligasi Cereblon, CRBN) ha permesso di indurre la degradazione della POI solo nelle cellule tumorali, in quanto caratterizzate da elevate concentrazioni di ROS.⁵⁴

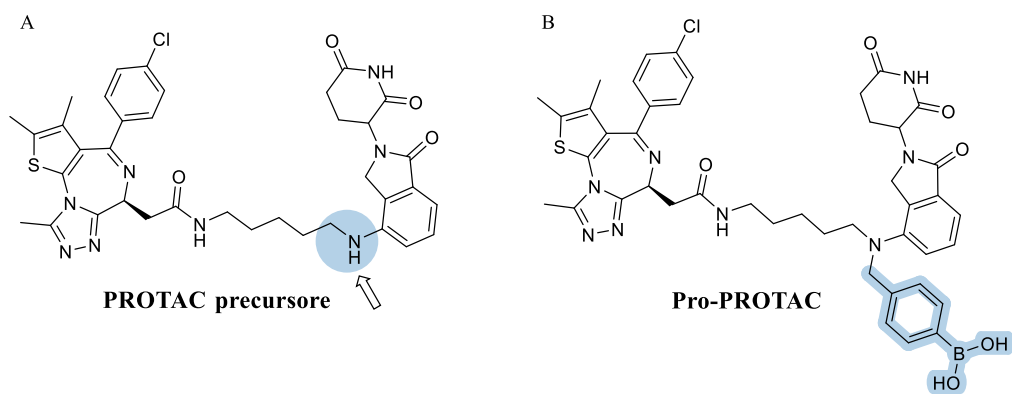


Figura 13: struttura del pro-PROTAC che si attiva in presenza di ROS (13A) e del PROTAC precursore attivo (13B)⁵⁴

2. Scopo del lavoro

ZEB1 è un fattore di trascrizione che, attraverso la soppressione del gene delle E-caderine, induce l'avvio della EMT, favorendo così un'aumentata invasività tumorale. Nel cancro, l'espressione di ZEB1 è indotta da ALDH1A3, un enzima che gioca un ruolo cruciale nella patogenesi tumorale e nello sviluppo delle CSC.¹⁵ I pazienti che presentano tumori ricchi di CSC sono, infatti, più inclini a metastasi e recidive. Per questo motivo, negli ultimi anni, la ricerca si è focalizzata sullo sviluppo di nuovi inibitori selettivi per ALDH1A3 in grado di bloccare l'attività catalitica. Tra questi, il composto **NR6**, riportato in letteratura, si distingue per la sua attività inibitoria selettiva verso l'isoforma 1A3 ed è in grado di esercitare un'attività antiproliferativa sulle linee cellulari di glioblastoma e mesotelioma pleurico maligno.^{26,28}

Dato il *cross-talk* tra ZEB1 e ALDH1A3, questo progetto di tesi è stato dedicato al *targeting* di ALDH1A3 come metodo indiretto per modulare l'espressione di ZEB1. Pertanto, con lo scopo di esplorare nuove modalità chimiche, è stata utilizzata la tecnologia PROTAC per indurre la degradazione selettiva di ALDH1A3, allo scopo di ridurre da un lato i livelli di ALDH1A3 e dall'altro i livelli di ZEB1 nel tumore.

I PROTAC sono stati disegnati a partire da **NR6**, selezionato come *warhead*, che è stato funzionalizzato tramite l'aggiunta di un *linkage point* per l'ancoraggio dei *linker*, costituiti da catene alchiliche alifatiche di diversa lunghezza. Tutti PROTAC sono stati progettati e sintetizzati per reclutare la ligasi VHL.

La seconda parte del progetto di tesi ha previsto la messa a punto della via sintetica per introdurre modificazioni strutturali sui PROTAC sintetizzati, al fine di garantirne un'attivazione selettiva nell'ambiente ipossico tumorale. Il *targeting* tumore-specifico dei PROTAC ha il potenziale di limitarne gli effetti *off-target* e di ampliarne, di conseguenza, la finestra terapeutica. Nel dettaglio, a livello dell'*anchor* è stato aggiunto un gruppo uscente attivato dalla NTR, la cui espressione è tipicamente presente solo negli ambienti ipossici tumorali.

La struttura generale dei PROTAC sintetizzati e le seguenti funzionalizzazioni effettuate sono riassunte in Fig. 14.

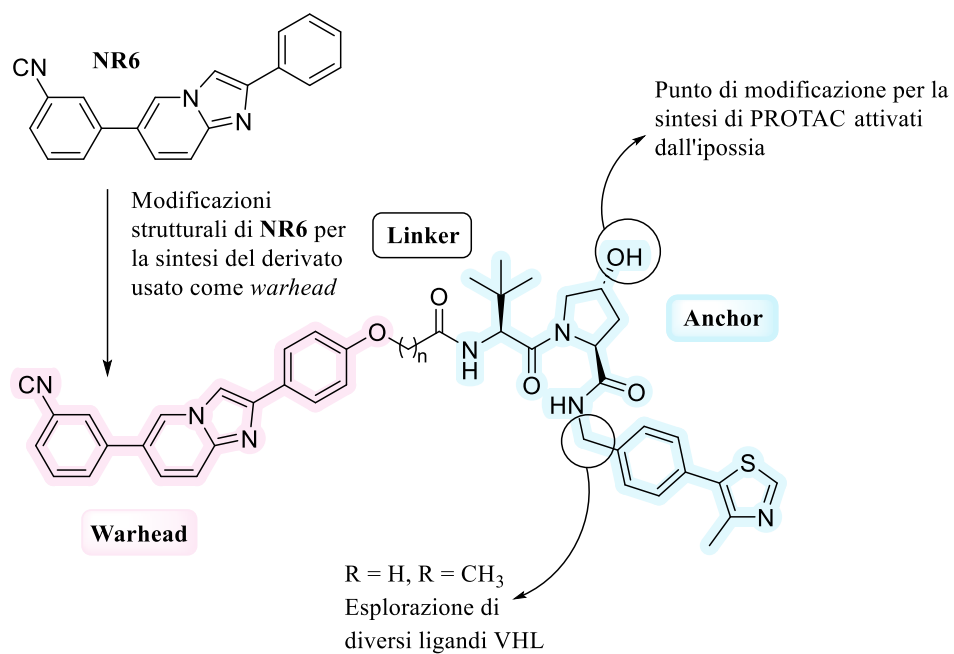


Figura 14: struttura generale dei PROTAC sintetizzati e modificazioni chimiche effettuate

3. Risultati e discussione

3.1 Sintesi di PROTAC per ALDH1A3

Questo progetto di tesi ha avuto come obiettivo la sintesi di PROTAC diretti alla degradazione dell'enzima ALDH1A3. Per mantenere la selettività verso l'isoforma 1A3, un analogo del composto **NR6**, noto per la sua esclusiva attività inibitoria verso l'isoforma desiderata, è stato selezionato come *warhead*.²⁷ Uno studio di cristallografia a raggi X svolto su **NR6** in complesso con l'enzima (PDB ID: 7A6Q), ha permesso di identificare il sostituente fenilico, situato nella parte destra della molecola, come la regione esposta al solvente (Fig. 15A) e la posizione *para* di tale anello aromatico come punto ottimale per l'ancoraggio del *linker*. Pertanto, la sostituzione del fenile di **NR6** con un *p*-OH-fenile ha portato a disegnare il derivato **3** (Fig. 15B) come *warhead*. Studi di docking hanno, inoltre, predetto per **3** una posa di *binding* molto simile a quella adottata da **NR6** a livello del sito attivo di ALDH1A3, confermando il direzionamento della funzione OH fenolica verso il solvente.

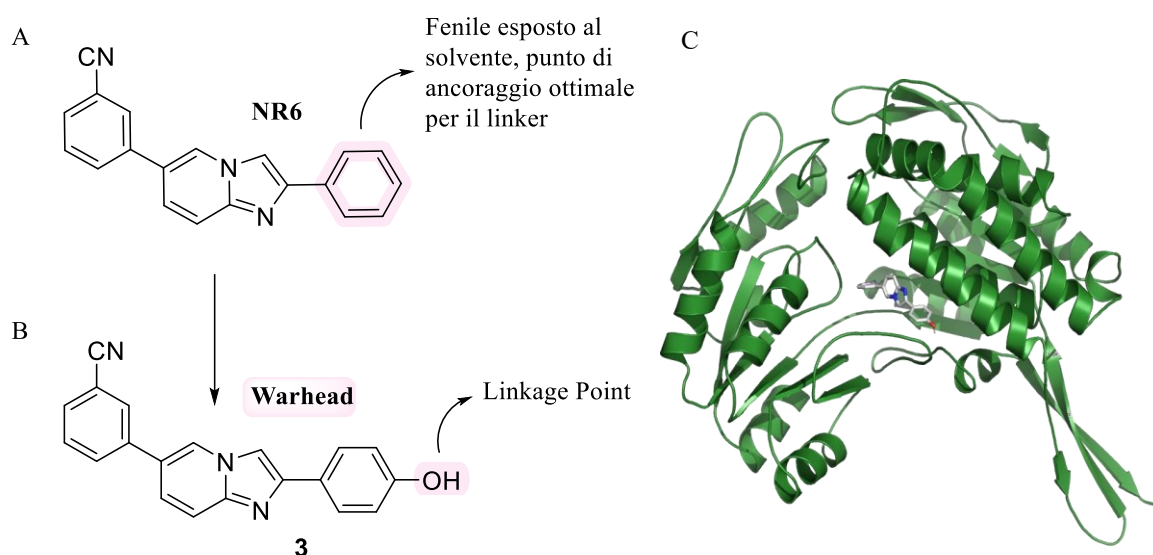


Figura 15: struttura di NR6 (15A), warhead (15B) e previsione delle zone esposte al solvente mediante docking molecolare (15C)

Il secondo componente che svolge un ruolo essenziale nel meccanismo degradativo del PROTAC è l'*anchor* (Fig. 16). In questo progetto, **VH032** (composto **16**, Fig. 16A), un ligando in grado di reclutare la ligasi ubiquitaria VHL, espressa ad elevate concentrazioni

dalla maggior parte dei tipi cellulari, è stata selezionata per la sintesi dei PROTAC. Inoltre, è stato sintetizzato il ligando **17** (Fig. 16B), un analogo di VH032⁵⁵ sviluppato con lo scopo di modularne l'affinità di legame. Questo ligando presenta un metile in configurazione S a livello della posizione benzilica,⁵⁶ che ne aumenta l'affinità di *binding* per VHL rispetto a VH032 (K_d di 63 nM rispetto alla K_d di 180 nM di VH032), incrementando l'attività degradativa dei PROTAC che lo contengono.

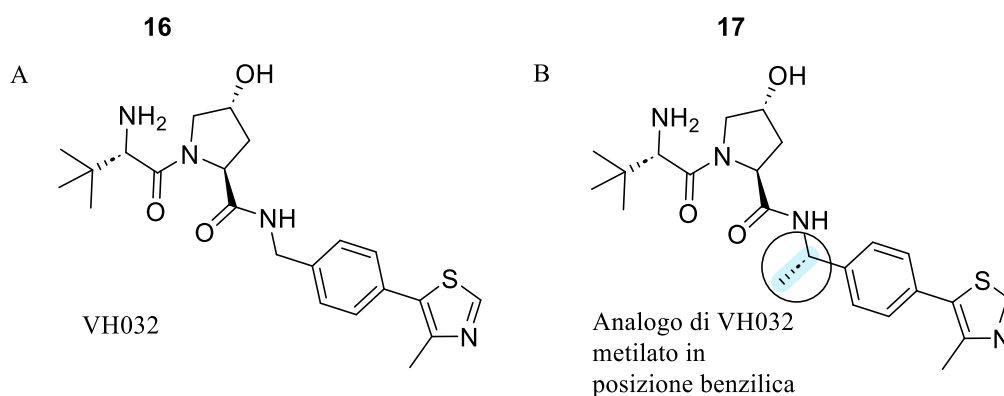


Figura 16: anchor sintetizzati per la sintesi dei PROTAC

Generalmente, il processo di progettazione e sintesi dei PROTAC è basato su metodi empirici, utilizzando tentativi ed errori, piuttosto che su una comprensione teorica completa. Risulta pertanto necessario svolgere un ampio studio SAR, prestando particolare attenzione alle caratteristiche dei *linker*. Questi ultimi sono in grado, infatti, di influenzare la formazione del complesso ternario, così come le proprietà farmacocinetiche dei PROTAC, incluse la permeabilità di membrana e la solubilità. In questo lavoro di tesi, catene alchiliche alifatiche di lunghezza compresa tra 4 e 11 unità metileniche sono state utilizzate.

Tenendo invariati *warhead* e *anchor*, sono stati pertanto sintetizzati i PROTAC **28-35**, rappresentati in Fig. 17, con rese dal 31% al 94%.

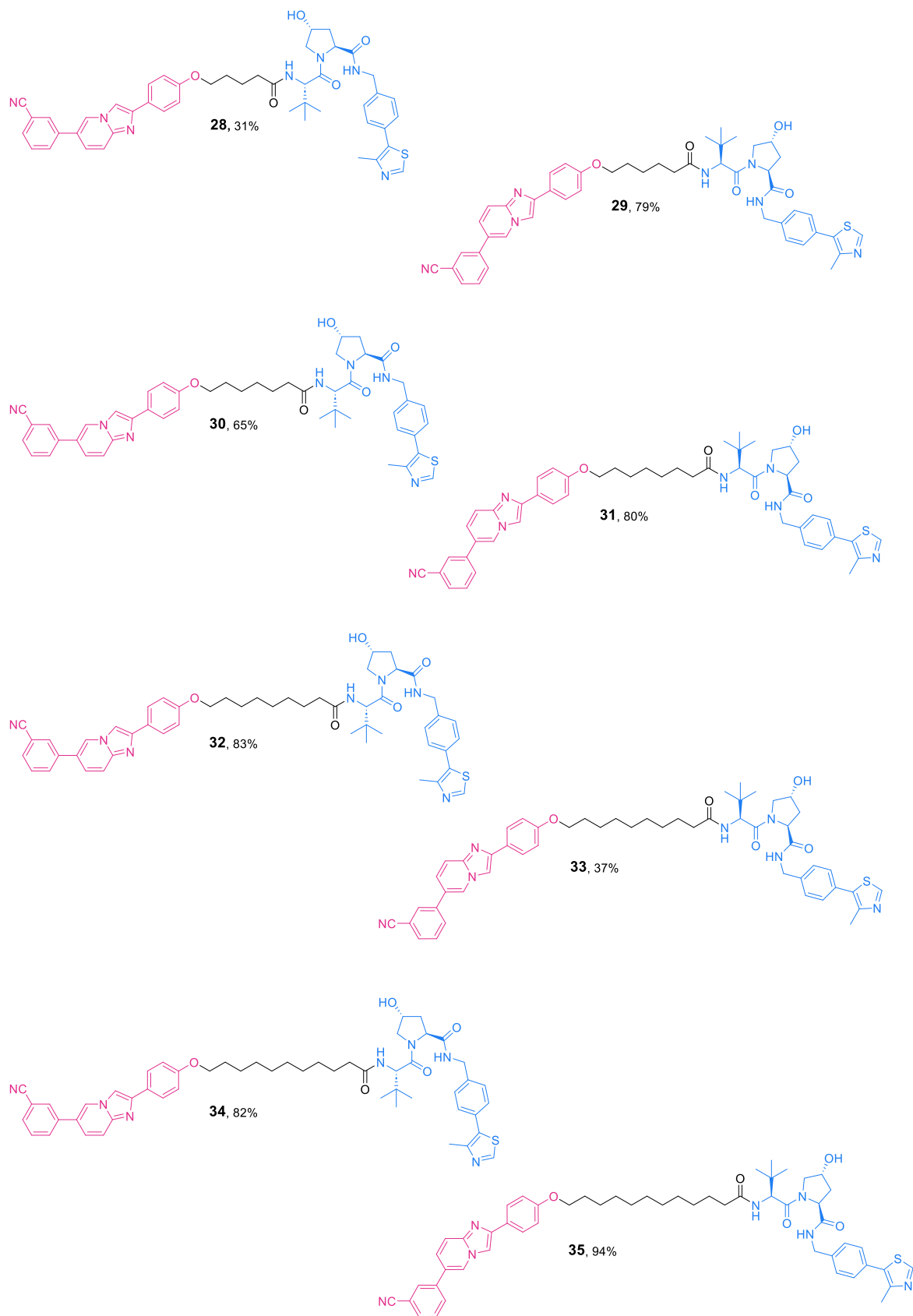
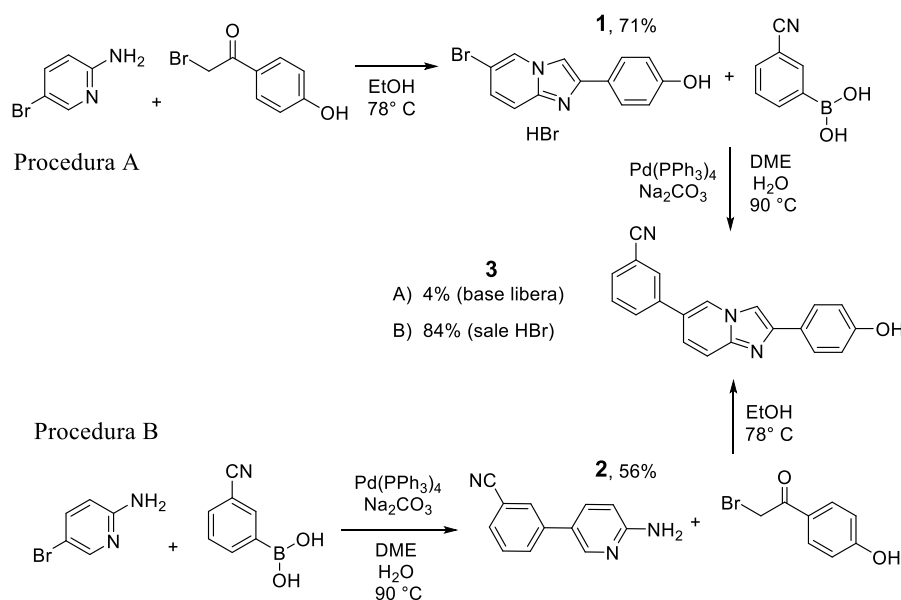


Figura 17: PROTAC sintetizzati volti alla degradazione di ALDH1A3

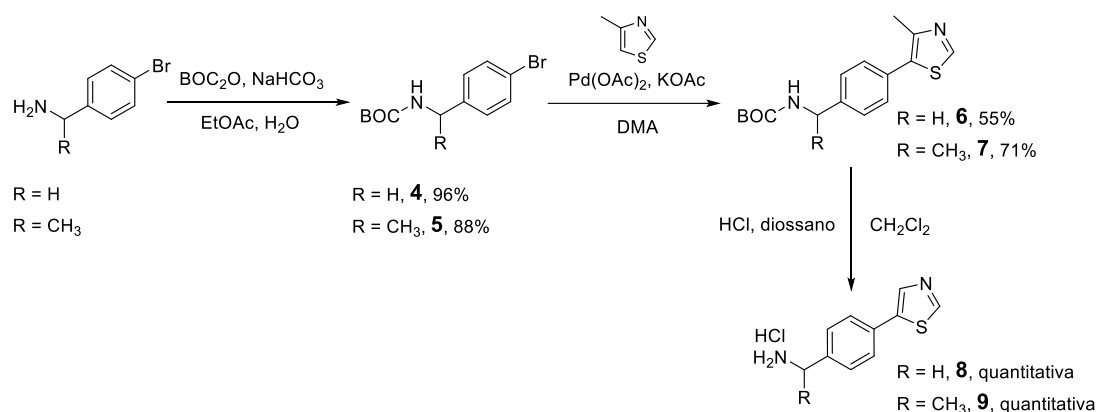
3.2 Sintesi del *warhead*



Schema 1: strategie di sintesi utilizzate per la preparazione del *warhead*

Il primo step per la sintesi dei PROTAC è stata la preparazione del *warhead*, ottenuto attraverso due strategie sintetiche differenti. Nella prima strategia (procedura A, Schema 1), il primo passaggio è rappresentato da una reazione di ciclizzazione tra la 5-bromopiridin-2-ammina e il 2-bromo-1-(4-idrossifenil)etan-1-one, entrambi disponibili commercialmente, al fine di ottenere l'intermedio **1**. Quest'ultimo è stato poi accoppiato con l'acido *meta* cianofenilboronico attraverso una reazione di Suzuki, catalizzata da $\text{Pd(PPh}_3)_4$, in presenza di Na_2CO_3 come base, per ottenere il composto **3**. Mentre la reazione di ciclizzazione avviene con ottime rese, la reazione di Suzuki cross-coupling porta alla formazione di diversi sottoprodotti, che rendono difficile la purificazione del *warhead* **3** tramite colonna cromatografica. Per questo motivo si è deciso di effettuare un'inversione degli step sintetici. Nella seconda strategia (procedura B, Schema 1), si effettua prima la reazione di Suzuki tra la 5-bromopiridin-2-ammina e l'acido *meta* cianofenilboronico, a dare l'intermedio **2**, utilizzando le stesse condizioni di reazione della procedura A. Successivamente, la reazione di ciclizzazione tra l'intermedio **2** ed il 2-bromo-1-(4-idrossifenil)etan-1-one porta alla formazione del prodotto finale **3** con 84% di resa.

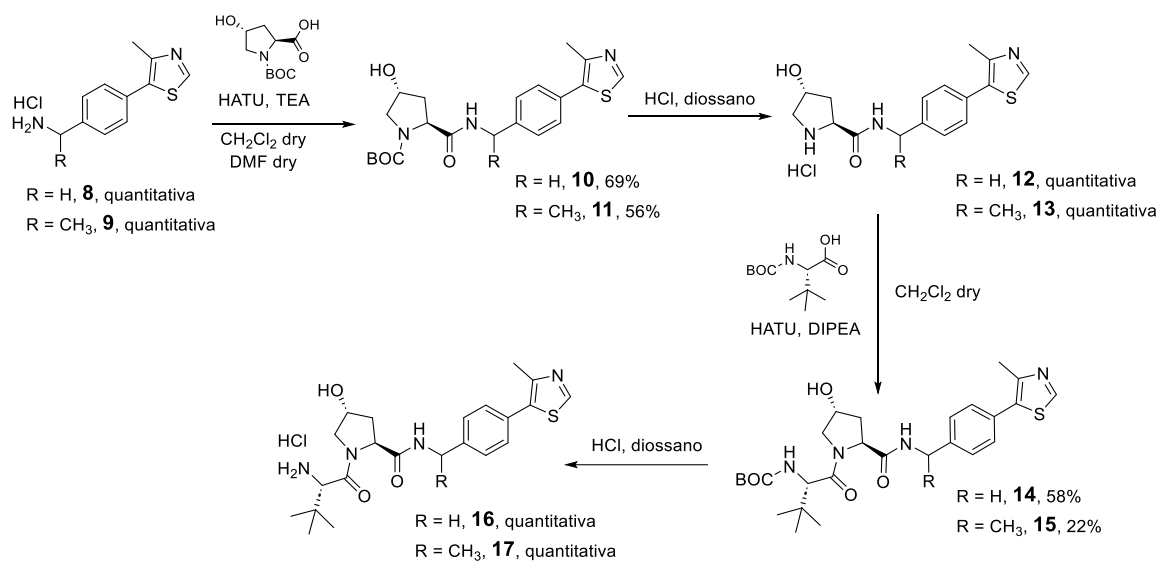
3.3 Sintesi degli *anchor*: i ligandi per la ligasi VHL



Schema 2: protezione, arilazione e deprotezione acida

Lo schema 2 mostra i primi 3 step per la sintesi degli *anchor* **16** e **17** per il reclutamento di VHL (Schema 3).

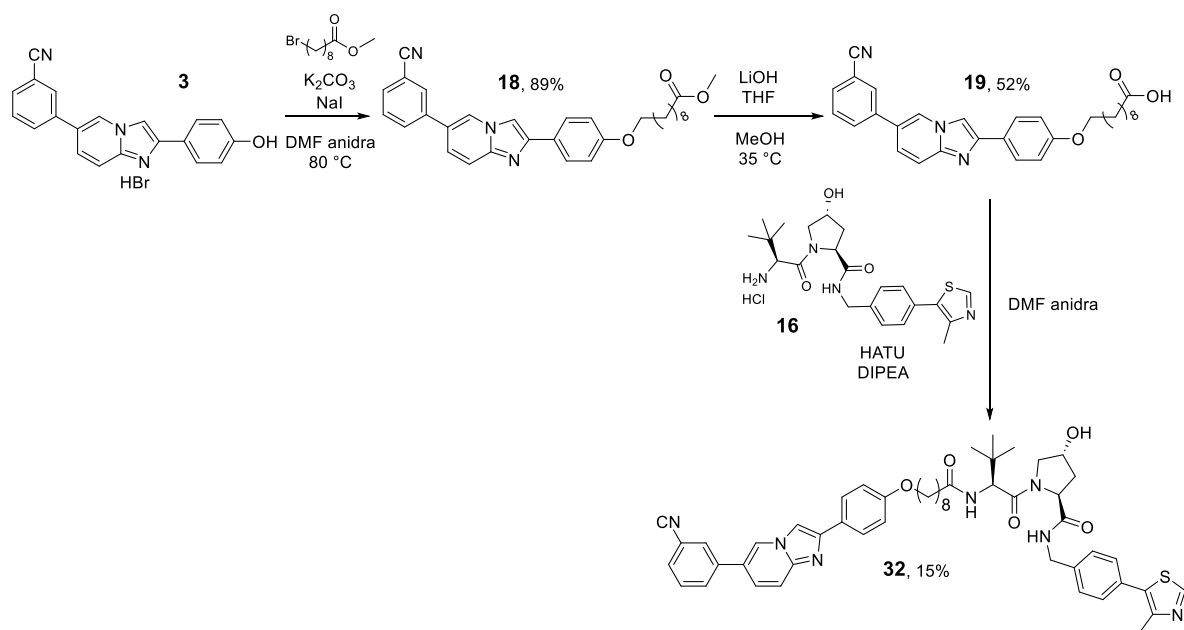
La prima reazione effettuata è la protezione della (4-bromofenil)metanamina o della (*S*)-1-(4-bromofenil)etan-1-ammina, disponibili commercialmente, utilizzando BOC₂O e NaHCO₃ come reagenti. I composti **4-5** ottenuti sono stati poi accoppiati al 4-metilthiazolo mediante una reazione di arilazione catalizzata da palladio (II) acetato, seguita da una reazione di rimozione del gruppo protettore BOC in ambiente acido, che ha permesso di ottenere le ammine **8-9** come sali cloridrati.



Schema 3: coupling amidici e BOC-deprotezione

La seconda parte della sintesi degli *anchor* **16** e **17**, come rappresentato in Schema 3, ha previsto due coupling ammidici, ciascuno dei quali è stato seguito da una reazione di deprotezione della funzione amminica BOC-protetta. In primo luogo, è stata condotta una reazione di accoppiamento tra le ammine cloridate **8-9**, ottenute precedentemente, e la *N*-BOC-idrossiprolina ad ottenere gli intermedi **10-11**. In seguito, è stato clivato il gruppo protettore con HCl in diossano, ottenendo i sali cloridati **12-13**. Questi ultimi sono stati sottoposti ad una successiva reazione di accoppiamento in presenza di BOC-*L*-*tert*-leucina, seguita da una reazione finale di rimozione del gruppo BOC, che ha dato i *building blocks* **16-17**, come sali cloridati, e con rese quantitative.

3.4 La prima via sintetica per i PROTAC diretti contro ALDH1A3



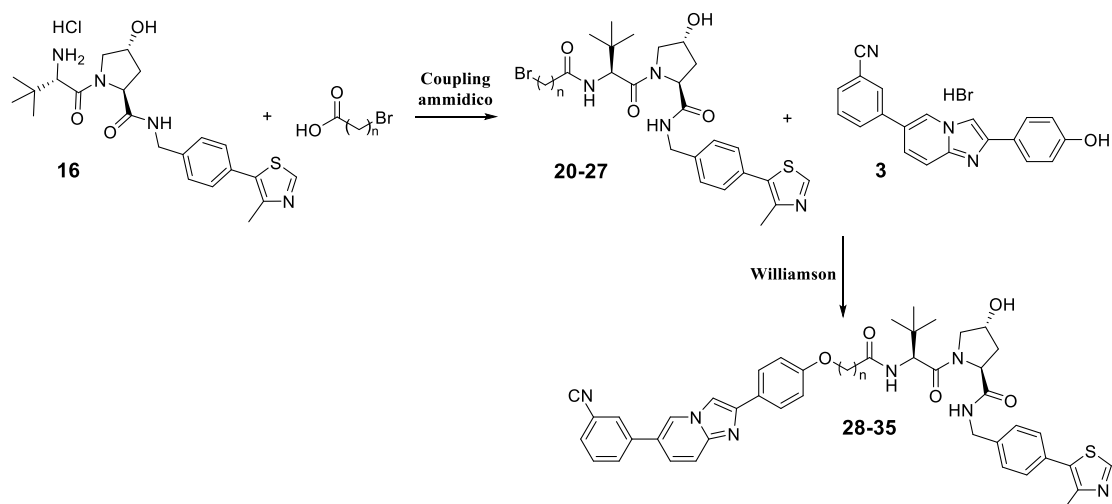
Schema 4: il primo approccio di sintesi dei PROTAC

Per la sintesi di PROTAC diretti contro ALDH1A3 è stata, inizialmente, utilizzata una strategia basata su 3 reazioni consequenziali: una reazione di Williamson, un'idrolisi ed infine una reazione di accoppiamento (Schema 4). Nel primo step, il *warhead* reagisce con il metil 9-bromononanoato in presenza di NaI e K_2CO_3 ad ottenere l'intermedio **18**, la cui funzione esterea viene idrolizzata in condizioni basiche. L'ultimo step prevede una reazione di accoppiamento tra l'acido carbossilico **19** e l'*anchor* **16**, in presenza di HATU, come agente di coupling, e DIPEA, come base, ottenendo il PROTAC **32** con una resa del 15%.

Questa procedura, pur permettendo di ottenere il PROTAC desiderato, ha presentato numerosi problemi a partire dal secondo step di sintesi. La reazione di idrolisi, infatti, non giunge mai a completamento e l'elevata insolubilità del prodotto rende complicata la purificazione dell'acido carbossilico **19** mediante colonna cromatografica flash. La bassa resa della reazione di accoppiamento finale è dovuta, invece, alla formazione di numerose impurezze, che non permettono di ottenere puro il PROTAC **32** mediante singola colonna cromatografica. Inoltre, quando sottoposto ad ulteriori trattamenti, come una seconda purificazione in colonna e/o triturazioni, il composto finale **32** risulta chimicamente instabile, formando prodotti di degradazione, che abbassano la resa in modo significativo.

Alla luce delle difficoltà suddette, una nuova strategia sintetica è stata ideata allo scopo di ottenere i PROTAC **28-35** con buone rese.

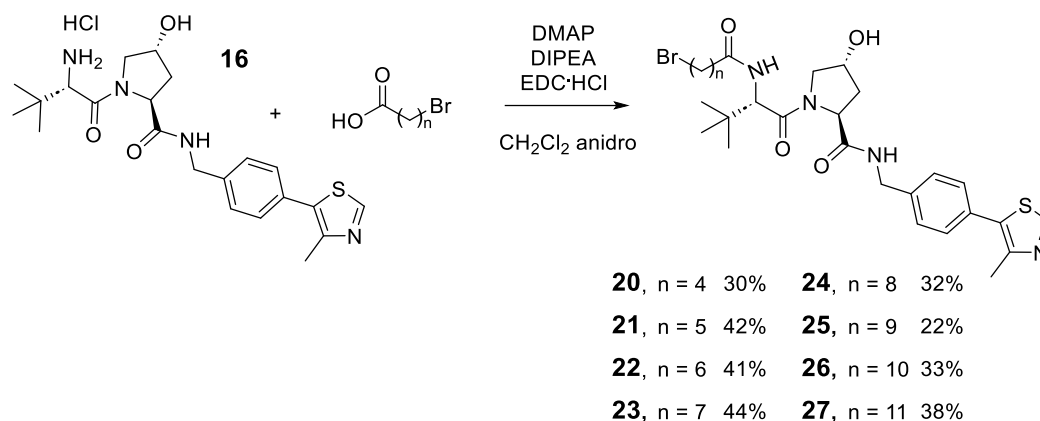
3.5 La nuova via di sintesi per i PROTAC contro ALDH1A3



Schema 5: schema generale della seconda via di sintesi dei PROTAC

La nuova via di sintesi utilizzata per lo sviluppo dei PROTAC **28-35** è caratterizzata da due step: prima si effettua un coupling ammidico tra l'*anchor* **16** e gli opportuni bromo-acidi ad ottenere i corrispettivi *building blocks* **20-27** che, attraverso una reazione di Williamson, vengono connessi al *warhead* **3**, precedentemente sintetizzato (Schema 5). Le due reazioni sono descritte in modo più dettagliato qui di seguito.

3.5.1 Sintesi dei *building blocks* 20-27 a partire dal ligando VH032



Schema 6: reazione di coupling per la preparazione dei *building blocks* 20-27

La reazione rappresentata nello Schema 6 permette di costruire i *building blocks* 20-27 per la sintesi dei PROTAC. Nel dettaglio, il ligando per la ligasi VHL **16** è stato sottoposto ad una reazione di accoppiamento ammidico con acidi carbossilici disponibili commercialmente, caratterizzati da catene carboniose alifatiche di diversa lunghezza e recanti un atomo di bromo terminale.

Inizialmente, HATU è stato selezionato come agente di *coupling*. Purtroppo, il sottoprodotto di reazione di tale agente, rappresentato in Fig. 18A, ha dimostrato di reagire con il prodotto della reazione di accoppiamento in una reazione collaterale di sostituzione nucleofila di tipo SN2, portando alla formazione di un prodotto indesiderato, raffigurato in Fig. 18B.

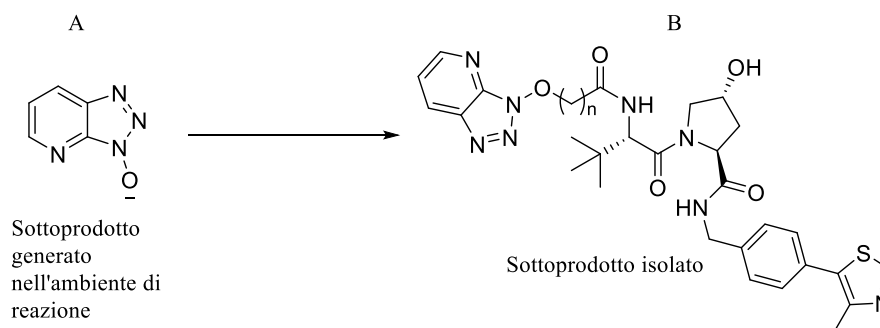
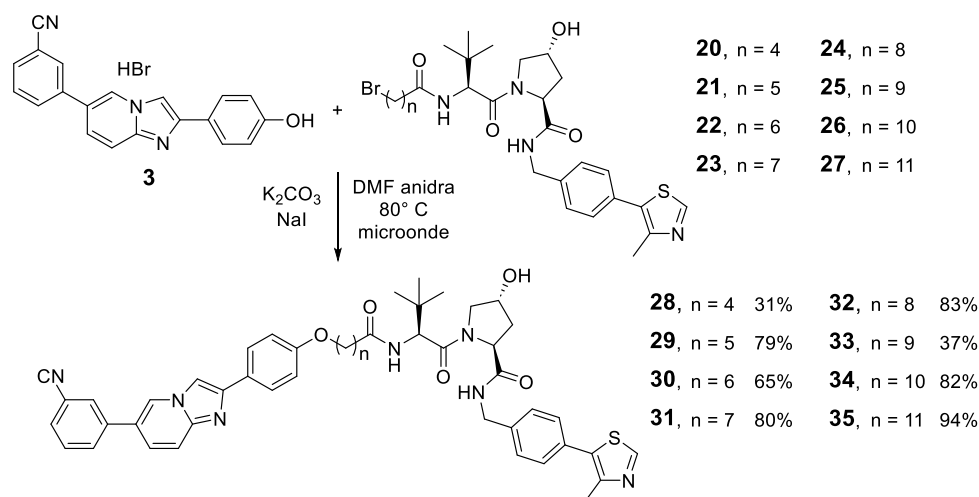


Figura 18: reazione secondaria del coupling ammidico mediata da HATU

Pertanto, la reazione di accoppiamento amidico è stata in seguito condotta utilizzando EDC·HCl e DMAP catalitica, come agenti di *coupling*, e DIPEA, come base, evitando in questo modo la formazione dell'addotto indesiderato (Fig. 18B).

3.5.2 Reazione di Williamson per l'assemblaggio dei PROTAC



Schema 7: reazione di Williamson

La reazione di Williamson, rappresentata nello Schema 7, è l'ultimo step della via sintetica utilizzata per la preparazione dei PROTAC e permette di combinare i *building blocks* **20-27**, ottenuti in precedenza, con il *warhead* **3**.

Il primo tentativo effettuato è stato condotto scaldando a 100 °C per tutta la notte, in presenza di NaI e K₂CO₃, in DMF anidra. Il controllo del grezzo di reazione mediante TLC ha rivelato la presenza di numerose impurezze aventi un R_f simile a quello del prodotto, rendendo quindi difficile la purificazione e portando a basse rese. Inoltre, il *warhead* **3** risultava non esaurito, contrariamente ai *building blocks* derivati dal ligando VH032. Tutto ciò ci ha condotto a pensare che l'*anchor* **16** fosse poco stabile a temperature così elevate protratte nel tempo, data la sua natura peptidica, andando incontro a fenomeni di degradazione e portando alla formazione del prodotto desiderato in minima quantità.

Per ovviare ai problemi riscontrati, la miscela di reazione è stata scaldata utilizzando le microonde, in modo da ridurre i tempi di reazione a solo due ore, limitando così la degradazione peptidica e aumentando la resa di reazione. Mediante questa nuova metodica sono stati preparati otto PROTAC (**28-35**), caratterizzati da linker di differenti lunghezze.

3.6 Risultati biologici dei PROTAC per ALDH1A3

Per screenare PROTAC il primo saggio che si utilizza è un metodo che valuti l'attività inibitoria della POI consentendo così di verificare il legame del PROTAC alla POI stessa. Il *warhead* **3** e i PROTAC **29-35** sono stati quindi testati in un saggio biochimico per valutare l'attività inibitoria di ALDH1A3, in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Garavaglia (Tab. 3). È stata anche quantificata l'attività inibitoria sulle altre isoforme di ALDH1A per valutare la selettività. Il composto **28** non è stato valutato nel saggio biochimico a causa della sua instabilità chimica. Nel dettaglio, dopo aver incubato le forme ricombinanti umane delle tre isoforme di ALDH (1A1, 1A2, 1A3) con i composti insieme ad acetaldeide (un substrato dell'enzima) e NAD⁺, è stata misurata l'assorbanza relativa alla formazione del NADH. Come controllo positivo nel saggio è stato utilizzato NR6.

Composto	Inibizione (%)	Inibizione (%)	Inibizione (%)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
	ALDH1A1 (25 μM)	ALDH1A2 (25 μM)	ALDH1A3 (25 μM)	ALDH1A3	
NR6	20	29	70.0	18.0	3.70
3	17.2	29.1	68.4	17.9	3.41
29	9.7	26.7	74.7	1.08	-
30	14.6	27.1	77.9	0.39	-
31	15	22.1	80.1	6.86	-
32	9.0	6.3	47.9	14.7	-
33	11.3	15.1	58.3	8.46	-
34	19.8	29.2	65.4	17.5	-
35	8.3	10.7	44.2	18.4	-

Tabella 3: attività inibitoria di NR6, warhead e PROTAC sintetizzati nei confronti delle isoforme ALDH1

Il saggio enzimatico ha confermato l'attività inibitoria selettiva del composto **3** su ALDH1A3, alle concentrazioni 25 μM e 100 μM (Tab. 3). A 25 μM il composto mostra, infatti, un'inibizione del 68% per l'isoforma 1A3, nettamente superiore ai valori di inibizione esibiti per le isoforme 1A1 e 1A2, 17% e 29%, rispettivamente. Per quanto riguarda l'isoforma 1A3, è stata, inoltre, effettuata una valutazione del valore di IC₅₀ (17.9 μM) e di K_i (3.41 μM).

Tutti i PROTAC testati (**29-35**) si sono rivelati selettivi nei confronti dell'isoforma 1A3, e capaci di inibire l'enzima con valori di IC_{50} compresi tra 18.4 e 0.39 μM (Tab. 3). Tutti i PROTAC hanno mostrato potenza superiore rispetto al *warhead 3*, ad eccezione del composto **35**.

Data la buona attività nel saggio enzimatico, in collaborazione con la Prof.ssa Pinton, i composti sono stati valutati in un saggio di vitalità cellulare in linee di mesotelioma MSTO-211H e di glioblastoma U87. A differenza del *warhead 3* che, dopo 24 ore di incubazione, ha mostrato un notevole effetto citotossico alla concentrazione 1 μM (53% di cellule MSTO-211H vitali e 38% di cellule U87), i PROTAC non hanno esibito alcun effetto sulla vitalità cellulare (Fig. 19 e 20).

I risultati ottenuti suggeriscono che la scarsa permeabilità di membrana, una limitazione ben nota dei PROTAC, sia la causa del mancato effetto citotossico dei composti **29-35** nel saggio di vitalità cellulare, nonostante l'ottima attività inibitoria mostrata nel saggio enzimatico. Pertanto, ulteriori studi SAR saranno diretti a migliorare la permeabilità cellulare di questa prima serie di composti diretti contro ALDH1A3.

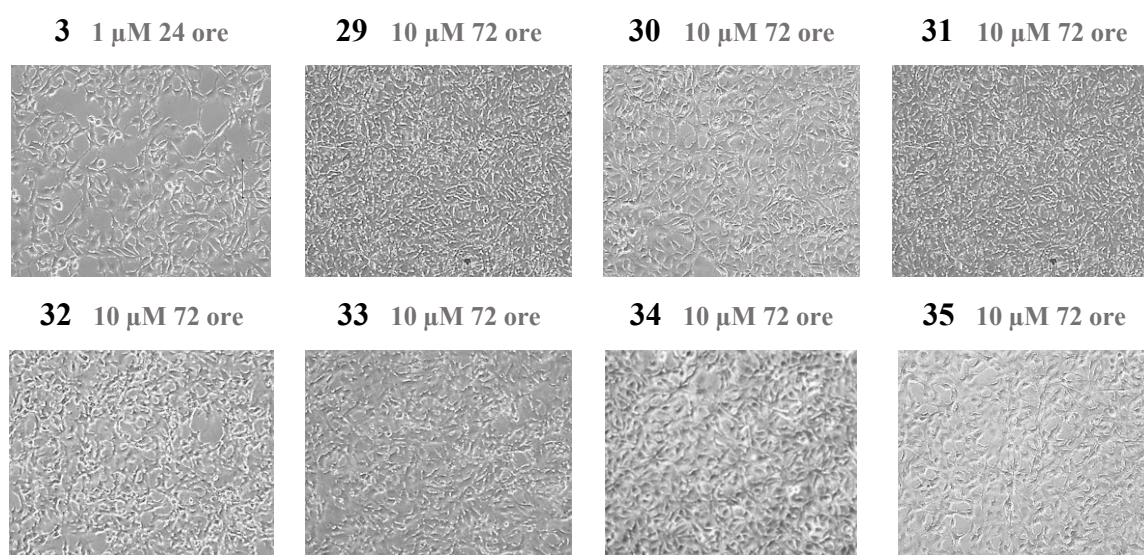


Figura 19: immagini in contrasto di fase di cellule di mesotelioma MSTO-211H dopo somministrazione di *warhead* e PROTAC

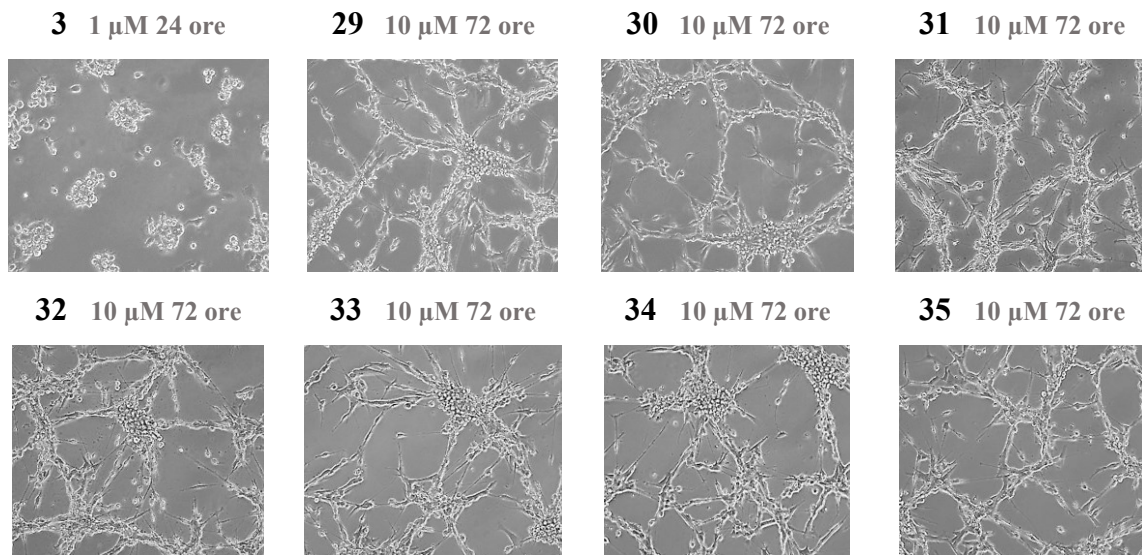


Figura 20: immagini in contrasto di fase di cellule di glioblastoma U87 dopo somministrazione di warhead e PROTAC

3.7 Lo sviluppo di pro-PROTAC attivati dalla NTR

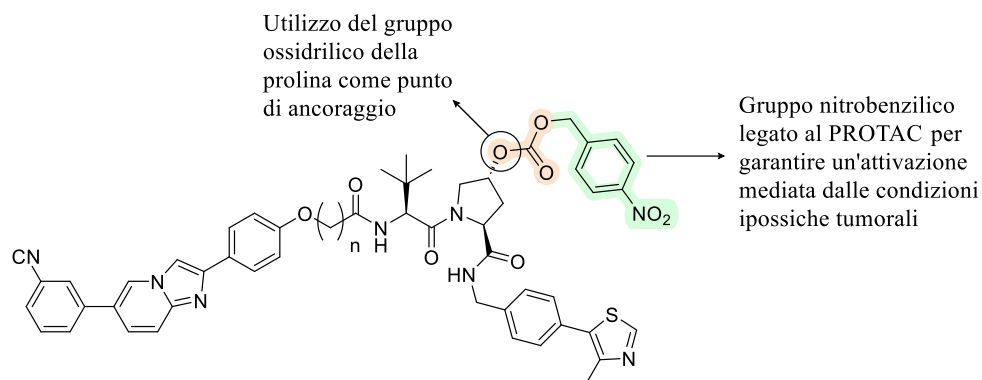
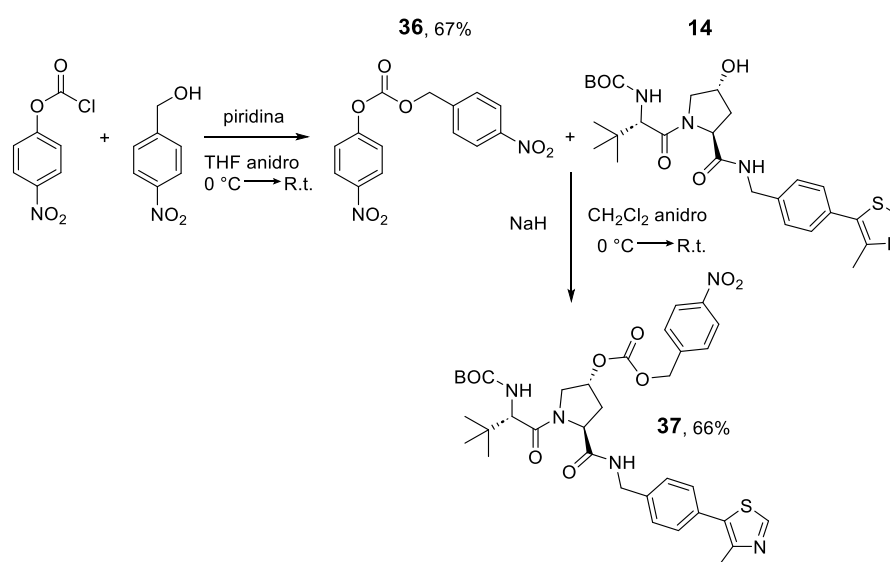


Figura 21: struttura generale dei PROTAC attivati dall'ipossia

Alla fine del mio periodo di tesi, mi sono, infine, dedicata alla messa a punto della strategia di sintesi per ottenere i pro-PROTAC diretti contro ALDH1A3 attivati in condizioni ipossiche dalla NTR per ottenere selettività verso i tessuti tumorali e limitarne così gli effetti collaterali derivanti da un'attività *off-target*. Diversi tentativi di funzionalizzazione sono stati svolti su alcuni dei PROTAC sintetizzati in questo progetto di tesi, con lo scopo di validare la strategia sintetica per l'introduzione di un gruppo nitrobenzileico a livello del gruppo ossidrilico della prolina attraverso un carbonato (Fig. 21).

3.7.1 Attivazione del nitrobenzilalcol e funzionalizzazione dell'*anchor* protetto



Schema 8: attivazione nel nitrobenzile e ancoraggio sull'ossidrilico del ligando VHL

Per verificare la fattibilità della strategia, ho iniziato a funzionalizzare la funzione OH dell'intermedio **14**, precursore BOC-protetto del ligando VH032 (Schema 8). Come primo step è stato attivato il nitrobenzilalcol in presenza di cloroformiato e piridina, in THF come solvente. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente. Il solvente di reazione è stato evaporato, ottenendo l'intermedio **36** con grado di purezza sufficiente da essere direttamente utilizzato nello step successivo, senza bisogno di ulteriori trattamenti.

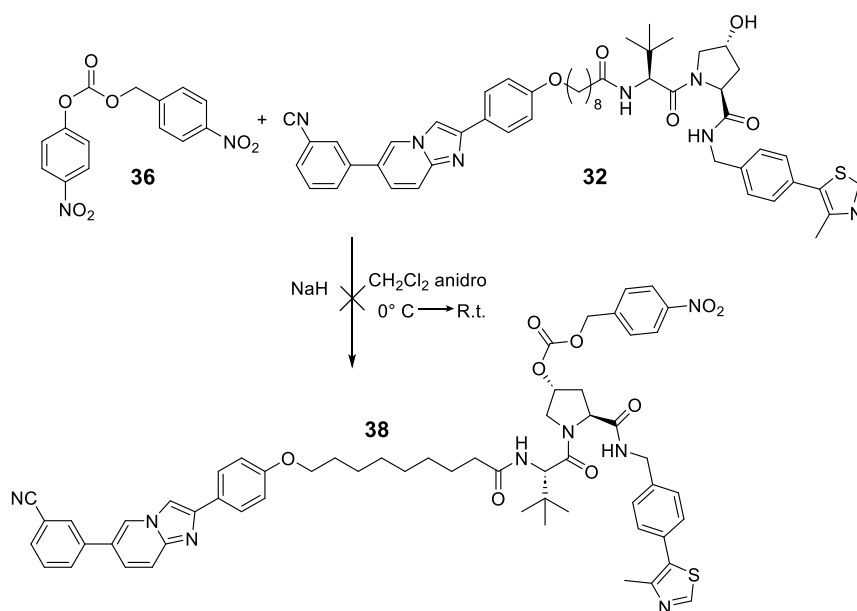
La successiva reazione di sostituzione nucleofila acilica tra **36** e **14** ha richiesto un lavoro di ottimizzazione al fine di trovare le condizioni ottimali in termini di solvente, base e temperatura (Tab. 4).

Solvente	Base	Temperatura	Resa
CH ₂ Cl ₂ anidro	TEA	r.t. → 35 °C	35%
DMA / CH ₂ Cl ₂ anidro	TEA	45° C → 50 °C	26%
CH ₂ Cl ₂ anidro	NaH	0 °C → r.t.	66%

Tabella 4: condizioni di reazione utilizzate per l'aggiunta del nitrobenzile all'ossidrilico

I primi due tentativi hanno previsto l'utilizzo di diclorometano e della miscela diclorometano/DMA, rispettivamente, come solvente, e TEA è stata utilizzata come base. Nonostante il blando riscaldamento, le rese non sono risultate buone. Per questo motivo si è deciso di utilizzare una base più forte, come NaH, in grado di deprotonare totalmente la funzione OH della prolina, rendendola un miglior nucleofilo. La strategia ha portato ad un netto miglioramento della resa (66%) e, pertanto, queste ultime condizioni sono state utilizzate per la funzionalizzazione dei PROTAC.

3.7.2 Incorporazione del nitrobenzile nel PROTAC 32: Strategia A

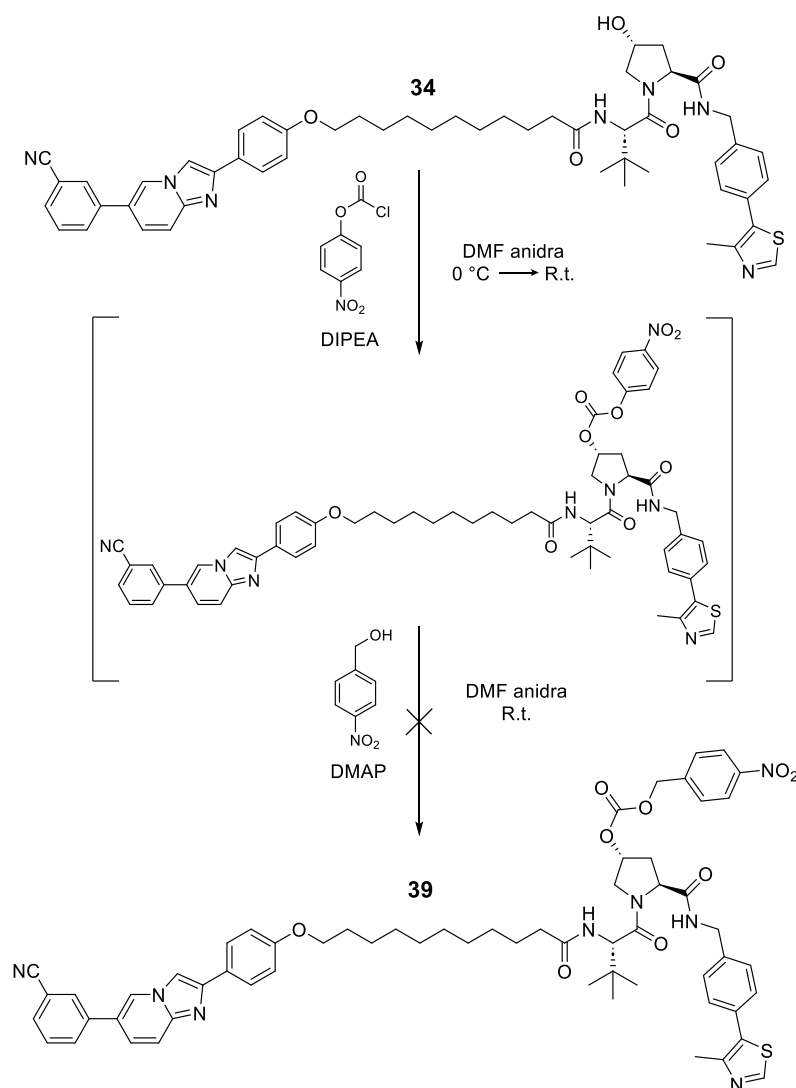


Schema 9: preparazione del pro-PROTAC 38 mediante l'utilizzo di NaH

Nella prima strategia di sintesi del pro-PROTAC attivato dall'ipossia **38** (Schema 9), il PROTAC **32** è stato prima attivato in presenza di NaH a 0 °C e poi, dopo 1 ora è stato aggiunto il carbonato **36**, ottenuto secondo lo Schema 8. Pur avendo compiuto due diversi tentativi, la reazione non ha dato il prodotto desiderato, ma prodotti di degradazione a causa della elevata basicità di NaH necessaria alla deprotonazione ed attivazione dell'OH del PROTAC **32**.

Per ovviare a questi problemi si è pensato, perciò, di invertire la reattività dei componenti con la procedura descritta di seguito.

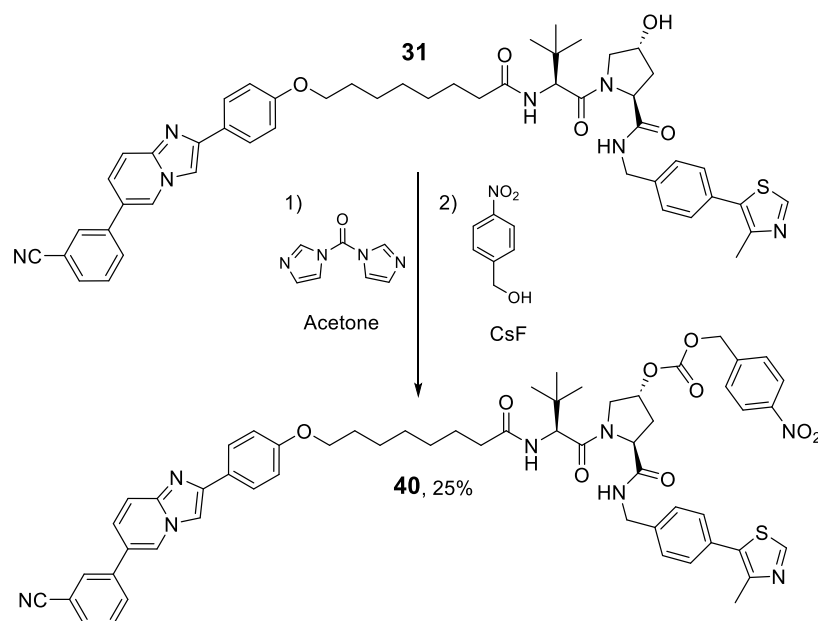
3.7.3 Aggiunta del nitrobenzile al PROTAC 34: Strategia B



Schema 10: preparazione del pro-PROTAC 39

La strategia B, rappresentata nello Schema 10, ha previsto prima l'attivazione dell'OH della prolina utilizzando il *p*-nitrofenil cloroformiato, e, successivamente, una reazione di sostituzione nucleofila acilica tra il *p*-nitrofenil carbonato non isolato ed il nitrobenzilalcol. Il composto 34 è stato fatto reagire con il *p*-nitrofenil cloroformiato in presenza di DIPEA per 1 ora, a formare il carbonato corrispondente descritto nello Schema 10 e non isolato. Successivamente, *p*-nitrobenzilalcol e DMAP sono stati aggiunti alla miscela di reazione, che è stata lasciata agitare a temperatura ambiente *overnight*. Purtroppo, nonostante l'intermedio fosse visibile in TLC, la reazione non ha portato al prodotto desiderato ed è stata, pertanto, intrapresa la strategia C, descritta qui di seguito.

3.7.4 Incorporazione del nitrobenzile nel PROTAC 31: Strategia C



Schema 11: nuova strategia di sintesi per lo sviluppo di PROTAC attivati dall'ipossia

La terza strategia sintetica utilizzata (Schema 11) ha previsto l'utilizzo del di(1*H*-imidazol-1-il)metanone (CDI), che porta alla formazione del carbonato in condizioni blande ed in assenza di basi forti. Lavorando in condizioni anidre si è lasciato reagire il PROTAC **31** con CDI in presenza di acetone come solvente per un totale di 6 ore e, solo successivamente, sono stati aggiunti il *p*-nitrobenzilalcol e CsF. La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente *overnight*.

In un primo tentativo di sintesi, una purificazione del grezzo di reazione mediante colonna cromatografica flash, utilizzando la miscela PE/Acetone 5:5 come eluente, ha richiesto successivi trattamenti del prodotto isolato con H₂O, dietilere ed acetonitrile nel tentativo di rimuovere l'imidazolo, sottoprodotto del CDI. Questi trattamenti insieme ad una parziale idrolisi del prodotto isolato hanno portato ad una bassa resa del 12%.

In un secondo tentativo di sintesi, il grezzo di reazione è stato purificato tramite colonna cromatografica flash, utilizzando EtOAc come fase mobile. Il pro-PROTAC **40** è stato isolato puro con una resa del 25%, confermando la validità della strategia C rispetto alle precedenti. Inoltre, la stabilità chimica di **40** è stata confermata tramite analisi NMR della polvere sciolta in DMSO-*d*₆ e valutazione degli spettri registrati per un mese.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

In questo progetto di tesi sono stati sintetizzati otto PROTAC (**28-35**) volti alla degradazione di ALDH1A3 e che differiscono tra loro per la lunghezza dei linker alchilici alifatici. In primo luogo, è stato sintetizzato il *warhead* **3**, un derivato di **NR6**, caratterizzato dalla presenza di un *p*-OH fenile al posto di un semplice fenile come punto di attacco per il linker. In seguito, sono stati sintetizzati i due ligandi per la ligasi VHL (**16** e **17**). Il *warhead* **3** e l'*anchor* **16** sono stati connessi tramite otto diversi linker alifatici con catene alifatiche comprese tra 4 e 11 unità metileniche, ottenendo i PROTAC desiderati.

Sia il *warhead* che i PROTAC hanno mostrato buona attività inibitoria nei confronti di ALDH1A3 e selettività per quest'ultima isoforma rispetto alle altre della stessa famiglia (1A1 e 1A2). Tuttavia, a differenza del *warhead*, i PROTAC non hanno esibito attività citotossica nei saggi di vitalità cellulare, molto probabilmente a causa di una scarsa permeabilità di membrana. In generale, sarà quindi necessario ampliare la library di PROTAC diversificando la natura dei linker, inserendo dei gruppi più rigidi come piperazine e piperidine (che sono note per aumentare anche la solubilità acquosa) o catene pegilate (Fig. 22).

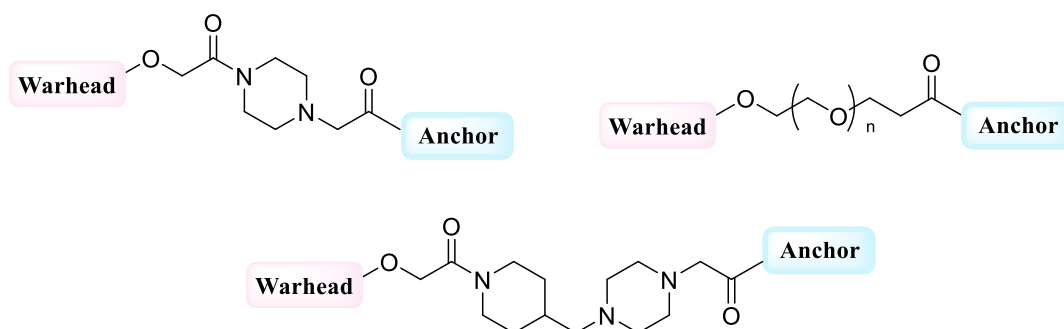


Figura 22: linker rigidi da utilizzare nella sintesi di nuovi PROTAC diretti contro ALDH1A3

In futuro, partendo da PROTAC che avranno dimostrato buona efficienza degradativa in saggi di Western Blot, si mirerà a preparare nuovi composti caratterizzati dall'*anchor* **17**, noto in letteratura per avere un'affinità di legame per la ligasi VHL più alta rispetto a **16**. Parallelamente, insieme alla quantificazione dei livelli cellulari di ALDH1A3 attraverso Western Blot, sarà fondamentale quantificare i livelli di espressione di ZEB1 in cellule di glioblastoma e/o mesotelioma. Ciò verrà svolto allo scopo di verificare se il *chemical knockdown* di ALDH1A3 possa effettivamente ridurre i livelli di ZEB1, riducendo, così, le proprietà pro-invasive di questo fattore di trascrizione.

5. Parte sperimentale

I solventi ed i reagenti commercialmente disponibili sono stati acquistati dalle aziende Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fluorochem, TCI e Carlo Erba.

Tutti i solventi sono stati utilizzati tal quali senza alcun tipo di purificazione ad eccezione del petroletere, che è stato distillato mediante distillazione semplice.

I composti sono stati così caratterizzati:

- **Spettrofotometria di massa** su strumento Thermo Finnigan LCQ-dec.a XP-plus, utilizzando una sorgente ESI.
- Gli **spettri IR** sono stati registrati su spettrofotometro FT-IR Bruker Alpha II.
- Gli **spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$** sono stati eseguiti su strumento Bruker Avance Neo 400 MHz. I chemical shift sono indicati in parti per milione (ppm).
- I **punti di fusione** sono stati determinati usando lo strumento Stuart Scientific SMP3.

Le **colonne cromatografiche** sono state eseguite con:

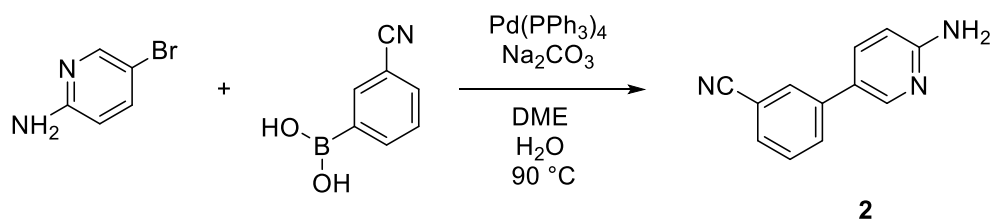
- Gel di silice Merck Kiesegel 320-400 mesh ASTM, per colonne flash, utilizzando gli eluenti indicati.

Per la **cromatografia su strato sottile (TLC)** sono state utilizzate lastrine 5 x 20 cm con spessore di 0.25 mm.

I prodotti sono stati rilevati usando:

- **Lampada UV** a λ 254 nm e 365 nm.
- **Permanganato di potassio**, preparato miscelando una soluzione di 2 g di KMnO_4 in 100 mL di acqua distillata con una soluzione di 4 g di NaHCO_3 in 100 mL di acqua distillata.

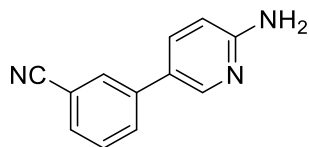
SINTESI DEL 3-(6-AMMINOPIRIDIN-3-IL)BENZONITRILE



All'interno di un tubo schlenk, si solubilizza l'anilina (500 mg, 2.89 mmol, 1 eq) in DME (16.9 mL). In sequenza si aggiungono l'acido boronico (467 mg, 3.18 mmol, 1.1 eq), Pd(PPh₃)₄ (334 mg, 0.29 mmol, 0.1 eq), H₂O (8.12 mL) e Na₂CO₃ (1.225 g, 11.56 mmol, 4 eq) in atmosfera inerte (N₂) e si scalda la miscela risultante a 90 °C per 6 ore. A reazione conclusa, si evapora il solvente e si purifica il grezzo mediante colonna cromatografica flash usando come eluente CH₂Cl₂/MeOH 98:2. Successivamente, si effettua una triturazione con EtOAc e si concentra la fase liquida, ottenendo 318 mg di un solido giallo con una resa del 56%.

Caratteristiche chimico-fisiche

3-(6-amminopiridin-3-il)benzonitrile



2

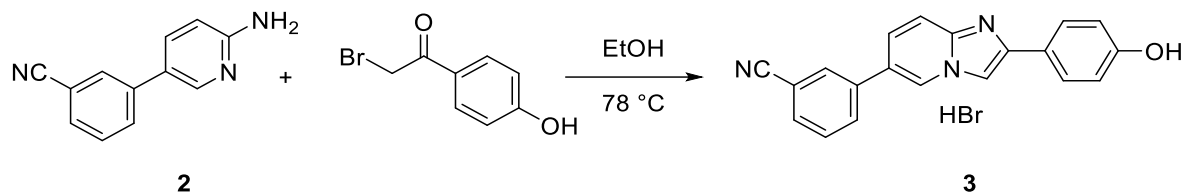
Formula bruta:	C ₁₂ H ₉ N ₃
Peso Molecolare:	195.23
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	104 – 106 °C
Massa (ESI) [M+H]⁺:	196.09
Resa:	56%

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.82 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.77 (dt, *J_s* = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J_s* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.57 (dt, *J_s* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 160.7, 146.3, 140.8, 137.7, 131.3, 131.1, 131.0, 130.2, 124.9, 119.7, 114.0, 110.3.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3414, 2225, 2921, 2850, 1642, 1605, 1561, 1251, 833, 798 cm⁻¹.

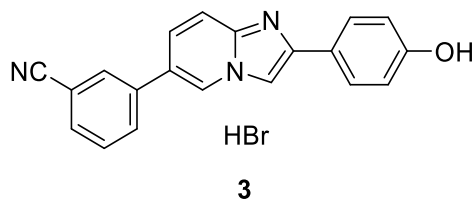
SINTESI DEL 3-(2-(4-IDROSSIFENIL)IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDIN-6-IL)BENZONITRILE BROMIDRATO



Si solubilizza l'amminopiridina **2** (318 mg, 1.63 mmol, 1 eq) in EtOH (3.74 mL), si aggiunge il 2-bromo-1-(4-idrossifenil)etan-1-one (456 mg, 2.12 mmol, 1.3 eq) e si scalda la miscela così ottenuta a 78 °C *overnight*. A reazione conclusa si evapora il solvente, si precipita il grezzo con dietilere a freddo e si filtra. Successivamente, si lava il solido ottenuto con EtOH freddo. Si ottengono 376 mg di un solido giallo con 84% di resa.

Caratteristiche chimico-fisiche

3-(2-(4-idrossifenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-6-il)benzonnitrile bromidrato



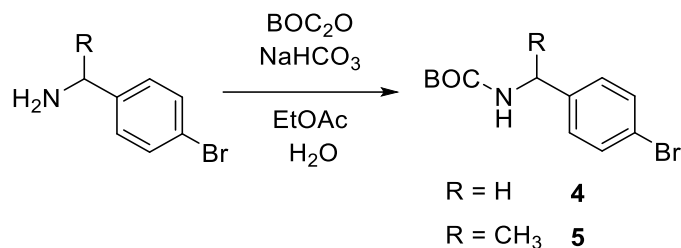
Formula bruta:	C ₂₀ H ₁₄ BrN ₃ O
Peso Molecolare:	392.26
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	167 – 170 °C dec.
Massa (ESI) [M+H]⁺:	312.11
Resa:	84%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.05 (bs, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.33 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.19 – 8.12 (m, 1H), 7.99 – 7.89 (m, 2H), 7.85 – 7.81 (m, 2H), 7.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.1, 139.8, 137.4, 136.5, 132.9, 132.4, 132.4, 131.2, 131.0, 128.6 (2C), 128.1, 127.2, 119.0, 117.5, 116.7 (2C), 112.9, 112.6, 110.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3066, 2919, 2850, 2231, 1610, 1507, 1434, 1218, 830, 797 cm⁻¹.

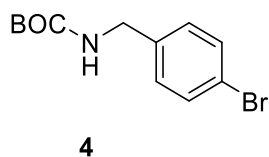
PROCEDURA GENERALE PER LA BOC-PROTEZIONE DELLE BENZILAMMINE



Si solubilizza l'ammina (10.75 mmol, 1 eq) in EtOAc (10 mL) e si aggiungono in sequenza H₂O (10 mL) e NaHCO₃ (0.9 eq). In seguito, si solubilizza BOC₂O (1.3 eq) in EtOAc (4 mL) e la soluzione ottenuta viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione precedente. La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente *overnight*. Il giorno seguente, a reazione conclusa, si diluisce il grezzo con EtOAc e si lava con acqua (x1). La fase organica viene poi anidrificata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata a ridotte pressioni. Il grezzo viene, infine, purificato mediante colonna cromatografica flash, usando gli eluenti descritti nelle proprietà chimico-fisiche di ciascun prodotto.

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (4-bromobenzil)carbammato

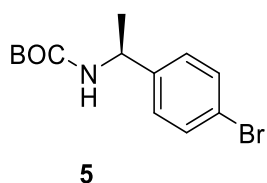


Formula bruta:	C ₁₂ H ₁₆ BrNO ₂
Peso Molecolare:	286.17
Stato fisico:	solido bianco
Resa:	96%
Eluente:	PE/EtOAc 95:5

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.91 (br s, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H).

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (*S*)-(1-(4-bromofenil)etil)carbammato



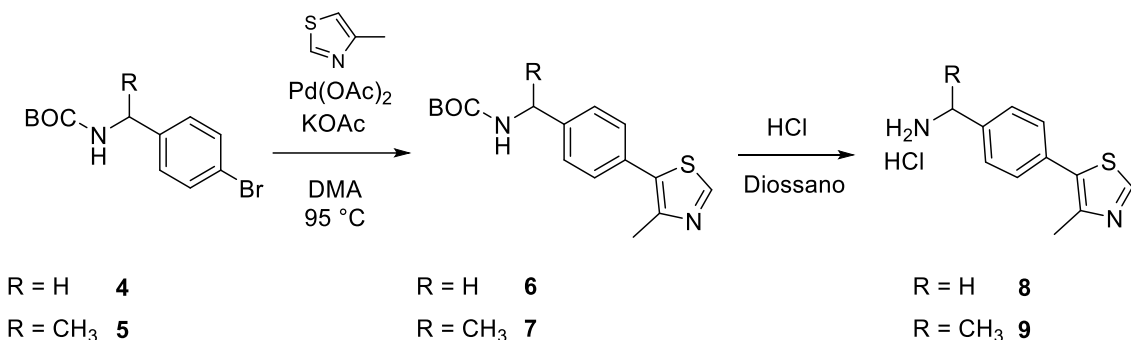
Formula bruta:	C ₁₃ H ₁₈ BrNO ₂
Peso Molecolare:	300.20
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	148 – 150 °C
Resa:	88%
Eluente:	PE/EtOAc 96:4

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.45 (br s, 1H), 4.75 – 4.71 (m, 1H), 1.41 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3380, 2978, 2931, 1680, 1508, 1268, 1243, 1059, 826, 558 cm⁻¹.

PROCEDURA GENERALE DELLA REAZIONE DI ARILAZIONE e

BOC-DEPROTEZIONE

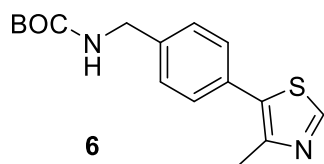


In ambiente anidro, il *tert*-butil(4-bromobenzil)carbammato **4** o *tert*-butil (S)-(1-(4-bromofenil)etil)carbammato **5** (3.98 mmol, 1 eq) si solubilizza in DMA (6.84 mL) e 4-metiltiazolo (2 eq), KOAc (2 eq) e Pd(OAc)₂ (0.008 eq) vengono aggiunti in sequenza alla soluzione. La miscela di reazione viene scaldata a 95 °C e lasciata in agitazione per 18 ore. A reazione conclusa, si diluisce il grezzo con CH₂Cl₂ e si lava con acqua (x2), quindi si anidrifica con Na₂SO₄ e si evapora il solvente. Infine, il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica flash usando come eluente la miscela PE/EtOAc 85:15.

Le ammine **6-7** ottenute (1.3 mmol, 1 eq) vengono poi solubilizzate in HCl (4N in diossano, 6.85 mL) e la miscela risultante viene lasciata in agitazione magnetica per 3 ore a temperatura ambiente. Quando la reazione risulta conclusa, si precipita il sale cloridrato dell'ammina in dietilere a freddo ed il solido ottenuto viene tirato a secco al rotavapor, ottenendo un solido giallo con resa quantitativa.

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)carbammato

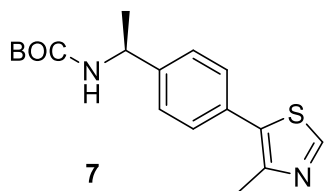


Formula bruta:	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₂ S
Peso Molecolare:	304.41
Stato fisico:	solido giallo
Resa:	55%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.95 (br s, 1H), 4.35 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (S)-(1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)carbammato



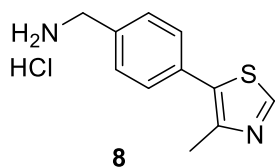
Formula bruta:	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ S
Peso Molecolare:	318.44
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	129 – 131 °C
Resa:	71%

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ 8.84 (s, 1H), 7.47 (s, 4H), 6.47 (br s, 1H), 4.87 – 4.74 (m, 1H), 2.48 (s, 3H), 1.46 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.39 (s, 9H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3381, 3050, 2977, 2921, 1677, 1510, 1246, 1058, 848, 824 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)metanamina cloridrato

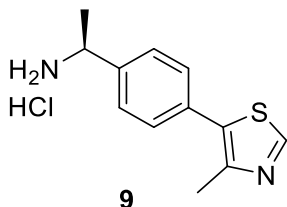


Formula bruta:	C ₁₁ H ₁₃ ClN ₂ S
Peso Molecolare:	240.75
Stato fisico:	solido giallo
Resa:	quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 9.96 (s, 1H), 7.71 (s, 4H), 4.25 (s, 2H), 2.64 (s, 3H).

Caratteristiche chimico fisiche

(S)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etan-1-ammina cloridrato

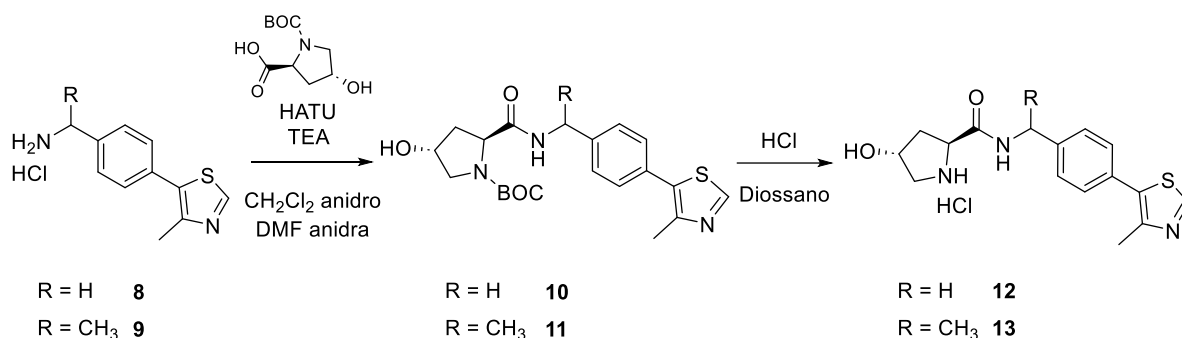


Formula bruta:	C ₁₂ H ₁₅ ClN ₂ S
Peso Molecolare:	254.78
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	240 – 242 °C
Resa:	quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 9.98 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 1.1 Hz, 4H), 4.59 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H), 1.69 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3340, 3040, 2968, 2918, 1592, 1498, 1463, 1086, 882, 830 cm⁻¹.

PROCEDURA GENERALE DEL COUPLING AMMIDICO CON LA N-BOC-L-IDROSSIPROLINA e BOC-DEPROTEZIONE

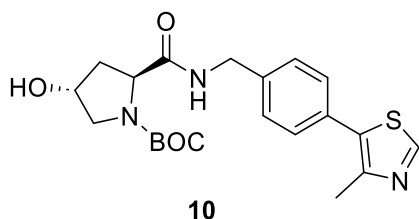


In ambiente anidro, si solubilizza l'ammina **8-9** (2.91 mmol, 1 eq) in una miscela 1:1 di DMF anidra e CH₂Cl₂ anidro (10.6 mL), e si porta la miscela di reazione a 0 °C. A questa temperatura, si aggiunge in sequenza TEA (4 eq), BOC-L-idrossiprolina (1.02 eq) e HATU (1.21 eq) e si lascia la miscela di reazione a temperatura ambiente e in agitazione *overnight*. Il giorno seguente, a reazione conclusa, si evapora il solvente, si diluisce con CH₂Cl₂ e si lava la fase organica con una soluzione satura di NH₄Cl (x2); quindi, si anidrifica con Na₂SO₄ e si concentra. Il grezzo viene purificato mediante colonna cromatografica flash, usando gli eluenti descritti nelle proprietà chimico-fisiche di ciascun prodotto.

In seguito, si solubilizzano gli intermedi **10-11** ottenuti (4.07 mmol, 1 eq) in HCl (soluzione 4N in diossano) (12.4 mL) e si lascia la miscela di reazione in agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Quando la reazione risulta conclusa si precipita il sale cloridrato dell'ammina in dietilere a freddo e si tira a secco il solido ottenuto al rotavapor, ottenendo un solido giallo con resa quantitativa.

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (2*S*,4*R*)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazolo-5-il)benzil)carbamoil)pirrolidin-1-carbossilato

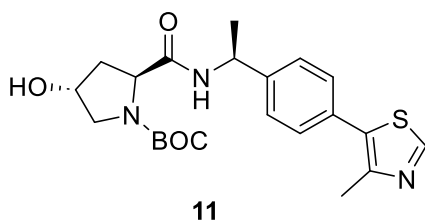


Formula bruta:	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₄ S
Peso Molecolare:	417.52
Stato fisico:	solido bianco
Resa:	69%
Eluente:	PE/EtOAc 1:9

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.88 (s, 1H), 8.68 – 8.58 (m, 1H), 7.45 – 7.42 (m, 4H), 4.53 – 4.48 (m, 1H), 4.45 – 4.38 (m, 2H), 4.34 – 4.31 (m, 1H), 3.63 – 3.56 (m, 1H), 3.52 – 3.47 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.31 – 2.21 (m, 1H), 2.07 – 2.02 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.33 (s, 6H).

Caratteristiche chimico-fisiche

tert-butil (2*S*,4*R*)-4-idrossi-2-(((*S*)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)carbamoil)pirrolidin-1-carbossilato



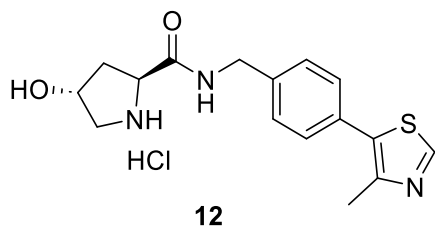
Formula bruta:	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₄ S
Peso Molecolare:	431.55
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	62 – 64 °C
Resa:	56%
Eluente:	EtOAc

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.88 (s, 1H), 7.46 – 7.41 (m, 4H), 5.10 – 5.03 (m, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 2H), 3.58 – 3.53 (m, 1H), 3.50 – 3.44 (m, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.26 – 2.20 (m, 1H), 1.98 – 1.89 (m, 1H), 1.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.41 (s, 6H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3400, 3292, 2976, 2931, 1658, 1537, 1404, 1252, 833, 772 cm⁻¹

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide cloridrato

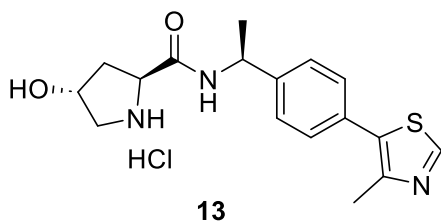


Formula bruta:	C ₁₆ H ₂₀ ClN ₃ O ₂ S
Peso Molecolare:	353.87
Stato fisico:	solido giallo
Resa:	quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 10.0 (s, 1H), 7.61 – 7.58 (m, 2H), 7.55 – 7.52 (m, 2H), 4.61 (t, *J* = 3.5 Hz, 2H), 4.58 – 4.51 (m, 3H), 3.44 (dd, *J*_s = 12.1, 3.6 Hz, 1H), 3.34 – 3.33 (m, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.51 (ddt, *J*_s = 13.4, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 2.09 (ddd, *J*_s = 13.4, 10.6, 4.0 Hz, 1H).

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-4-idrossi-*N*-((*S*)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossammide cloridrato



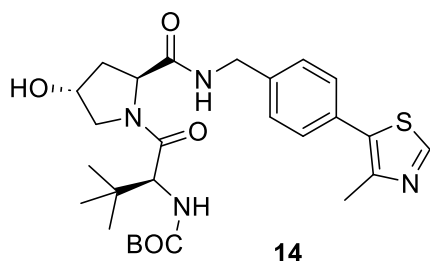
Formula bruta:	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O ₂ S
Peso Molecolare:	367.89
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	82 – 84 °C
Resa:	quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 9.92 (s, 1H), 9.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.14 – 5.10 (m, 1H), 4.58 – 4.55 (m, 1H), 4.52 (dd, *J*_s = 10.5, 7.4 Hz, 1H), 3.39 – 3.35 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.51 (dd, *J*_s = 13.5, 7.5 Hz, 1H), 1.99 – 1.93 (m, 1H), 1.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3218, 3042, 2970, 2854, 1655, 1553, 1254, 1117, 1081, 833 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

***tert*-butil ((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-idrossi-2-((4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)carbamoil)pirrolidin-1-il)-3,3-dimetil-1-ossobutan-2-il)carbammato**

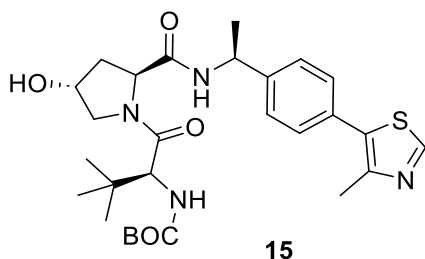


Formula bruta:	C ₂₇ H ₃₈ N ₄ O ₅ S
Peso Molecolare:	530.68
Stato fisico:	solido bianco
Resa:	58%
Eluente:	PE/EtOAc 2:8

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.87 (s, 1H), 8.66 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.66 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.61 – 4.57 (m, 1H), 4.55 – 4.50 (m, 2H), 4.40 – 4.33 (m, 1H), 4.30 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.88 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.83 – 3.77 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.25 – 2.20 (m, 1H), 2.12 – 2.06 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.01 (s, 9H).

Caratteristiche chimico-fisiche

***tert*-butil ((*S*)-1-((2*S*,4*R*)-4-idrossi-2-(((*S*)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)carbamoil)pirrolidin-1-il)-3,3-dimetil-1-ossobutan-2-il)carbammato**



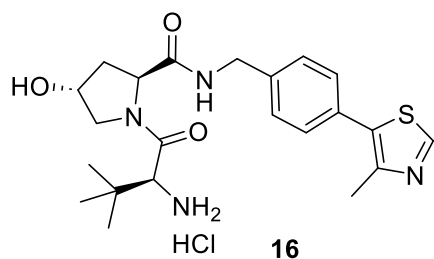
Formula bruta:	C ₂₈ H ₄₀ N ₄ O ₅ S
Peso Molecolare:	544.71
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	232 – 234 °C
Resa:	22%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /EtOAc 2:8

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.87 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.45 – 7.40 (m, 4H), 6.38 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.05 – 4.95 (m, 1H), 4.58 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.29 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J*_s = 10.9, 3.8 Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.20 (dd, *J*_s = 13.0, 7.8 Hz, 1H), 2.10 – 1.92 (m, 1H), 1.51 – 1.48 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.02 (s, 9H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3350, 3273, 3059, 2977, 2928, 1684, 1614, 1542, 1455, 1171 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-ammino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossamide cloridrato



Formula bruta: C₂₂H₃₁ClN₄O₃S

Peso Molecolare: 467.03

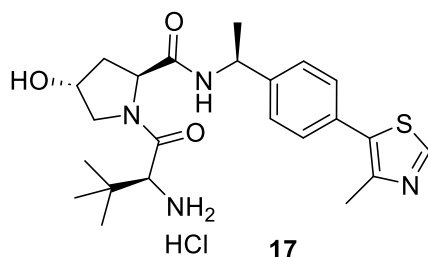
Stato fisico: solido giallo

Resa: quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 10.02 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H), 4.68 (dd, *J*_s = 9.6, 7.6 Hz, 1H), 4.58 – 4.53 (m, 2H), 4.42 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.09 (s, 1H), 3.88 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J*_s = 11.2, 3.6 Hz, 1H), 2.61 (s, 3H), 2.31 (ddt, *J*_s = 13.3, 7.6, 1.7 Hz, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 1.14 (s, 9H).

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-ammino-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-((*S*)-1-(4-(4-metiltiazol-5-il)fenil)etil)pirrolidin-2-carbossammide cloridrato

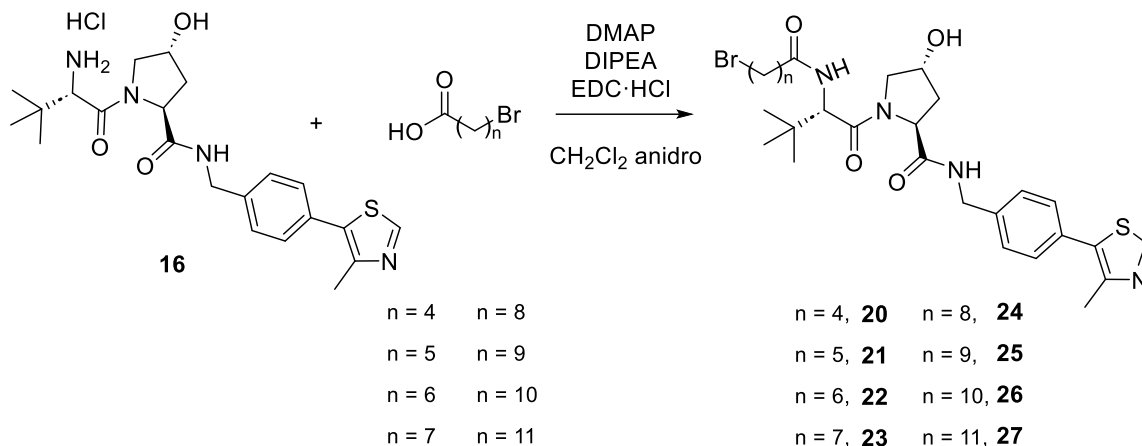


Formula bruta:	C ₂₃ H ₃₃ ClN ₄ O ₃ S
Peso Molecolare:	481.05
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	143 – 145 °C
Resa:	quantitativa

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 9.84 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.01 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.68 (dd, *J_s* = 9.6, 7.7 Hz, 1H), 4.49 – 4.46 (m, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.81 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.49 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.59 (s, 3H), 2.31 – 2.26 (m, 1H), 1.93 (ddd, *J_s* = 13.5, 9.5, 4.2 Hz, 1H), 1.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.14 (s, 9H).

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3244, 3044, 2957, 2853, 1632, 1495, 1252, 1117, 1080, 870 cm⁻¹.

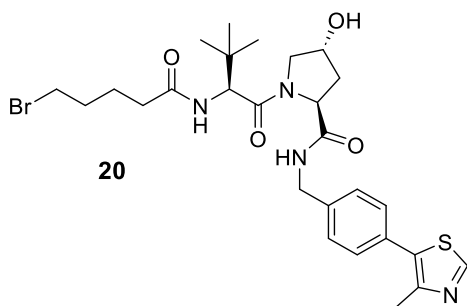
**PROCEDURA GENERALE DELLA REAZIONE DI ACCOPPIAMENTO CON
I BROMO-ACIDI**



In ambiente anidro, in un vial, si solubilizza l'acido carbossilico (1.5 eq) in CH_2Cl_2 anidro (2 mL) e si aggiungono in sequenza $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (1.6 eq), DMAP (0.2 eq) e DIPEA (3 eq) (soluzione A). Contemporaneamente, in un pallone di reazione, si solubilizza l'ammina **16** (0.214 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 anidro (2 mL) e si aggiunge la DIPEA (3 eq) (soluzione B). Entrambe le reazioni vengono lasciate in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito, si aggiunge la soluzione B alla soluzione A e la miscela risultante viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente *overnight*. A reazione conclusa, si diluisce il grezzo con CH_2Cl_2 e si lava prima con una soluzione satura di NaHCO_3 (x1) e poi con una soluzione satura di NH_4Cl (x1). La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata. Il grezzo viene, infine, purificato mediante colonna cromatografica flash, usando gli eluenti descritti nelle proprietà chimico-fisiche di ciascun prodotto.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(5-bromopentanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₂₇ H ₃₇ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	593.58
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	77 – 79 °C
Resa:	30%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 96:4

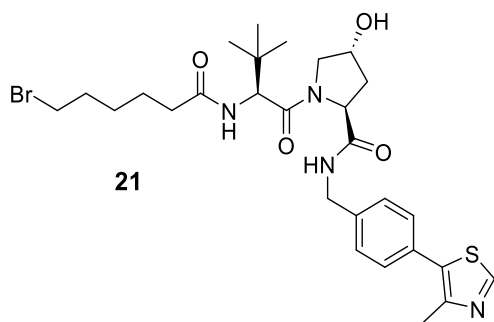
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 5H), 6.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.48 (m, 3H), 4.33 (dd, *J_s* = 15.0, 5.2 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J_s* = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.59 – 2.54 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.15 – 2.10 (m, 1H), 1.88 – 1.83 (m, 2H), 1.79 – 1.72 (m, 2H), 0.93 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.2, 171.9, 170.9, 150.5, 148.6, 138.2, 131.7, 131.1, 129.7 (2C), 128.2 (2C), 70.2, 58.7, 57.7, 56.9, 43.4, 36.1, 35.4, 35.1, 33.2, 32.1, 26.5 (3C), 24.2, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3305, 3078, 2922, 2852, 1616, 1521, 1436, 1242, 835, 548 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(6-bromoesanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₂₈ H ₃₉ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	607.61
Stato fisico:	solido amorfo giallo
Resa:	42%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5

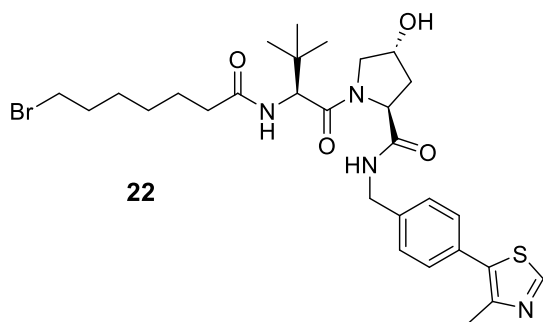
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.66 (s, 1H), 7.41 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 4H), 6.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.55 – 4.48 (m, 3H), 4.32 (dd, *J*_s = 15.1, 5.4 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J*_s = 11.2, 3.8 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.47 – 2.34 (m, 1H), 2.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.13 – 2.05 (m, 1H), 1.81 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.64 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 175.8, 174.5, 172.3, 150.5, 149.0, 140.3, 133.4, 131.5, 130.4 (2C), 129.0 (2C), 71.1, 60.8, 50.0, 58.0, 43.7, 38.9, 36.5, 36.4, 34.2, 33.6, 28.8, 27.0 (3C), 26.1, 15.8.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3292, 3078, 2924, 2855, 1621, 1526, 1434, 1230, 846, 550 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(7-bromoetanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₂₉ H ₄₁ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	621.64
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	57 – 59 °C
Resa:	41%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 96:4

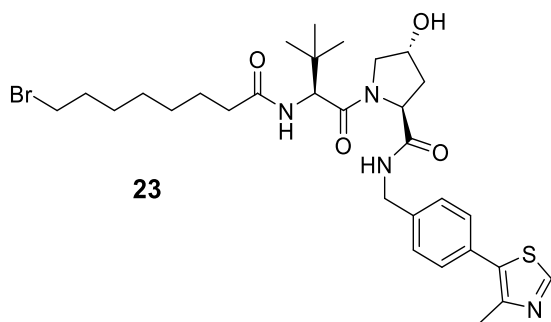
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.63 – 4.56 (m, 1H), 4.54 (br s, 1H), 4.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J*_s = 14.9, 5.2 Hz, 1H), 4.15 – 4.12 (m, 1H), 3.58 (dd, *J*_s = 11.4, 3.5 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.90 (br s, 1H), 2.58 (ddd, *J*_s = 13.6, 7.8, 4.6 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.16 – 2.10 (m, 1H), 1.88 – 1.80 (m, 2H), 1.61 – 1.57 (m, 2H), 1.47 – 1.40 (m, 2H), 1.35 – 1.29 (m, 2H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 172.2, 171.4, 150.4, 148.6, 145.0, 138.6, 138.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.3, 58.5, 57.7, 56.8, 43.5, 36.8, 35.8, 35.3, 34.8, 28.9, 28.1, 26.6 (3C), 25.7, 25.5, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3294, 3078, 2922, 2852, 1622, 1532, 1435, 1236, 799, 549 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(8-bromooctanamido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₃₀ H ₄₃ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	635.66
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	62 – 64 °C
Resa:	44%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3

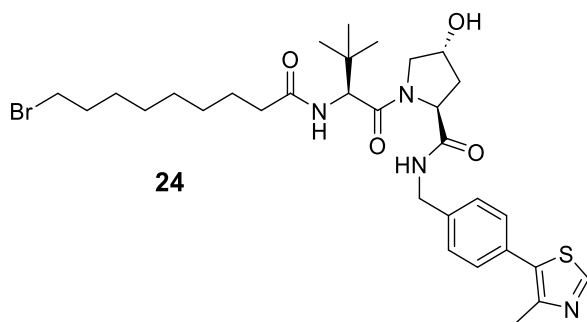
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.51 (m, 2H), 4.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J*_s = 15.0, 5.0 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J*_s = 11.3, 3.6 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.06 (br s, 1H), 2.59 – 2.53 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.83 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.64 – 1.58 (m, 2H), 1.43 – 1.38 (m, 2H), 1.33 – 1.28 (m, 4H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.2, 170.7, 150.5, 148.7, 138.2, 131.7, 131.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.4, 36.5, 35.8, 34.9, 34.1, 32.8, 29.1, 28.5, 28.1, 26.5 (3C), 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3293, 3066, 2922, 2853, 1622, 1522, 1434, 1234, 846, 550 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(9-bromononanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₃₁ H ₄₅ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	649.69
Stato fisico:	solido giallo
Punto di fusione:	85 – 87 °C
Resa:	32%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3

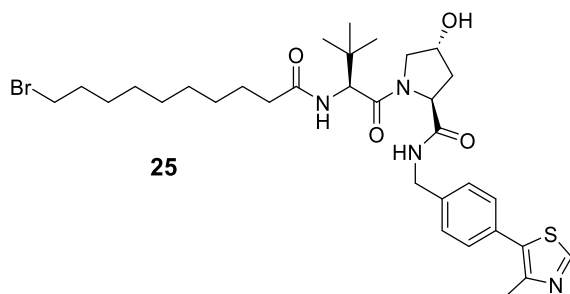
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.40 – 7.32 (m, 4H), 7.31 – 7.28 (m, 1H), 6.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.61 – 4.47 (m, 3H), 4.33 (dd, *J*_s = 15.1, 5.1 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J*_s = 11.3, 3.6 Hz, 1H), 3.43 – 3.39 (m, 2H), 3.09 (br s, 1H), 2.61 – 2.54 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.76 (br s, 2H), 1.44 – 1.36 (m, 2H), 1.33 – 1.26 (m, 6H), 0.95 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 172.2, 170.7, 150.5, 148.6, 138.2, 131.7, 131.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.4, 36.6, 35.8, 34.9, 34.1, 32.9, 29.2 (2C), 28.7, 28.2, 26.5 (3C), 25.6, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3291, 3065, 2925, 2854, 1622, 1522, 1434, 1227, 800, 549 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(10-bromodecanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₃₂ H ₄₇ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	663.72
Stato fisico:	solido bianco
Punto di fusione:	79 – 81 °C
Resa:	22%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3

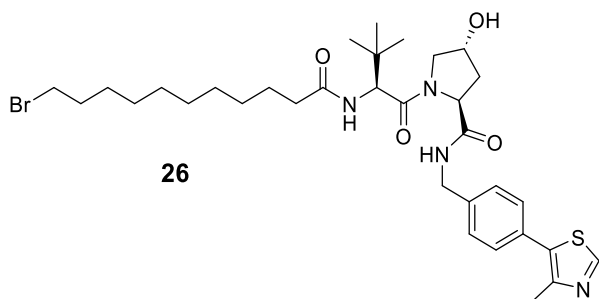
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.61 – 4.52 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J_s* = 14.9, 5.2 Hz, 1H), 4.13 (dt, *J_s* = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J_s* = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.88 (br s, 1H), 2.59 (ddd, *J_s* = 13.6, 7.6, 4.6 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.84 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.61 – 1.57 (m, 2H), 1.44 – 1.37 (m, 2H), 1.31 – 1.25 (m, 8H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.2, 170.7, 150.5, 148.6, 138.2, 131.7, 131.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.4, 36.6, 35.8, 34.9, 34.2, 32.9, 29.4, 29.3 (2C), 28.8, 28.2, 26.5 (3C), 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3292, 3065, 2923, 2853, 1622, 1434, 1225, 1085, 800, 550 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(11-bromoundecanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta: C₃₃H₄₉BrN₄O₄S

Peso Molecolare: 677.74

Stato fisico: solido bianco

Punto di fusione: 68 – 70 °C

Resa: 33%

Eluente: CH₂Cl₂/MeOH 98:2

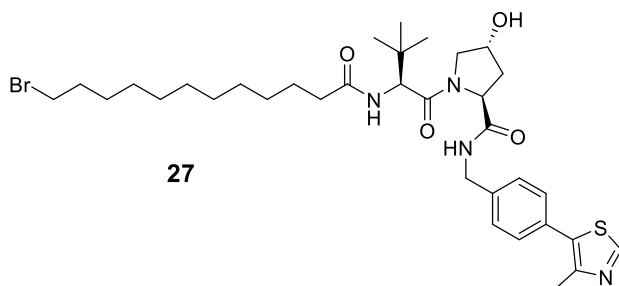
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 5H), 6.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.52 (m, 2H), 4.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.33 (dd, *J*_s = 14.9, 5.2 Hz, 1H), 4.12 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J*_s = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.01 (br s, 1H), 2.60 – 2.54 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.12 (dd, *J*_s = 13.7, 8.4 Hz, 1H), 1.84 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.72 (s, 2H), 1.62 – 1.56 (m, 2H), 1.42 – 1.37 (m, 2H), 1.26 (s, 8H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.2, 170.7, 150.5, 148.7, 138.2, 131.7, 131.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.5, 36.7, 35.7, 34.8, 34.2, 32.9, 29.5, 29.4 (2C), 29.3, 28.8, 28.3, 26.5 (3C), 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3293, 3063, 2923, 2852, 1622, 1522, 1435, 1227, 801, 549 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(12-bromododecanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



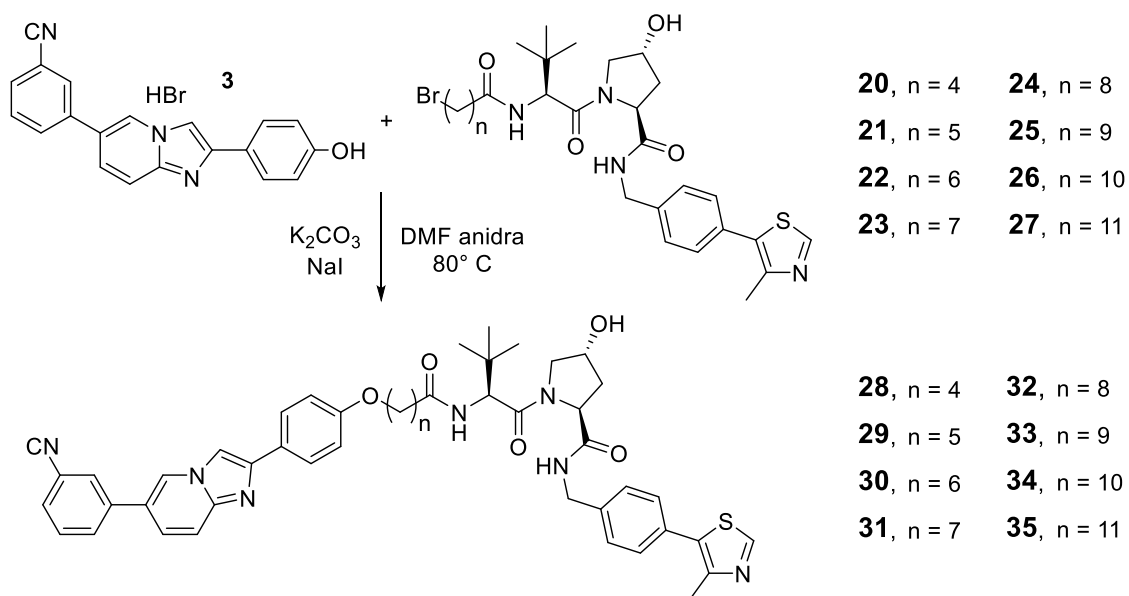
Formula bruta:	C ₃₄ H ₅₁ BrN ₄ O ₄ S
Peso Molecolare:	691.77
Stato fisico:	solido amorfo bianco
Resa:	38%
Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 96:4

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.68 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.31 – 7.28 (m, 1H), 6.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.53 (m, 3H), 4.33 (dd, *J*_s = 14.9, 5.1 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 11.4, 1H), 3.59 (dd, *J*_s = 11.5, 3.5 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.05 (br s, 1H), 2.60 – 2.54 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.85 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.62 – 1.55 (m, 2H), 1.43 – 1.37 (m, 2H), 1.26 (s, 12H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.2, 170.7, 150.5, 148.7, 138.2, 131.7, 131.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 70.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.5, 36.7, 35.8, 34.8, 34.2, 33.0, 29.6, 29.5 (2C), 29.4, 29.3, 28.9, 28.3, 26.6 (3C), 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3305, 3078, 2923, 2852, 1621, 1530, 1434, 1226, 801, 549 cm⁻¹.

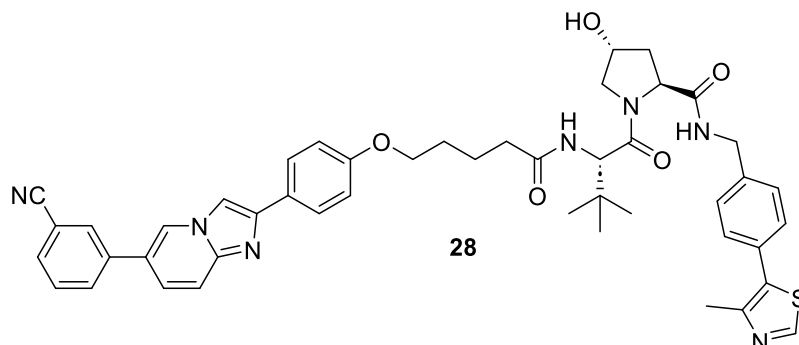
PROCEDURA GENERALE DELLA REAZIONE DI WILLIAMSON



In un vial per microonde precedentemente anidrificato, si solubilizza 3-(2-(4-idrossifenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-6-il)benzonitrile bromidrato **3** (1 eq), in DMF anidra (3 mL). Alla soluzione così ottenuta si aggiungono K_2CO_3 (4 eq) e NaI (0.5 eq) e si lascia la miscela di reazione in agitazione 30 minuti in atmosfera inerte (N_2). Successivamente, si aggiunge l'opportuno *building block* **20-27** (0.055 mmol, 1 eq) e si scalda a 80 °C per 2 ore in microonde. A reazione conclusa, si evapora il solvente e si purifica il grezzo mediante colonna cromatografica flash usando gli eluenti descritti nelle proprietà chimico-fisiche di ciascun prodotto.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(5-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)pentanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₄₇ H ₄₉ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	824.36
Peso molecolare:	824.01	Resa:	31%
Stato fisico:	solido beige	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 96:4
Punto di fusione:	96 – 98 °C		

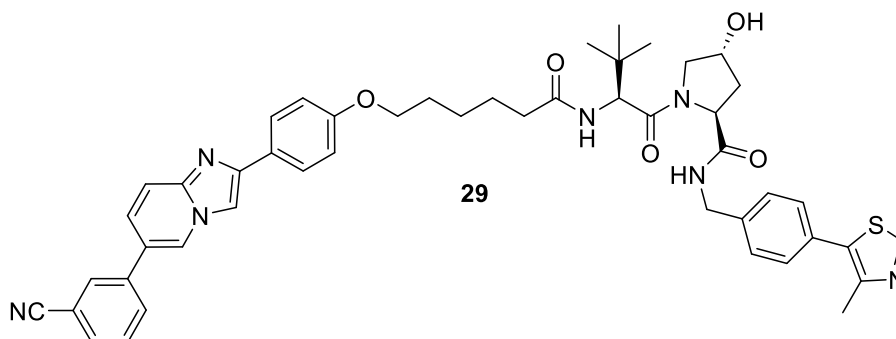
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 4H), 7.79 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.69 – 7.67 (m, 2H), 7.61 – 7.57 (m, 1H), 7.37 – 7.30 (m, 6H), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.60 – 4.50 (m, 3H), 4.33 (dd, *J*_s = 15.0, 5.2 Hz, 1H), 4.09 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.61 (dd, *J*_s = 11.4, 3.7 Hz, 1H), 3.37 (br s, 1H), 2.56 – 2.51 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.30 (s, 2H), 2.17 – 2.09 (m, 1H), 1.84 – 1.75 (m, 4H), 0.94 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.6, 172.2, 170.6, 159.3, 150.1, 148.7, 147.0, 145.1, 138.9, 138.2, 131.4, 131.3, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 129.5, 129.0, 128.3 (2C), 127.6 (2C), 126.3, 124.8, 124.5, 123.3, 118.6, 117.8, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.3, 67.7, 58.4, 57.8, 56.8, 43.5, 36.1, 35.7, 34.8, 28.7, 26.6 (3C), 22.5, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3292, 3065, 2953, 2922, 2855, 2229, 1623, 1242, 793, 727 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(6-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)esanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₄₈ H ₅₁ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	838.37
Peso molecolare:	838.04	Resa:	79%
Stato fisico:	solido pesca	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5
Punto di fusione:	113 – 115 °C		

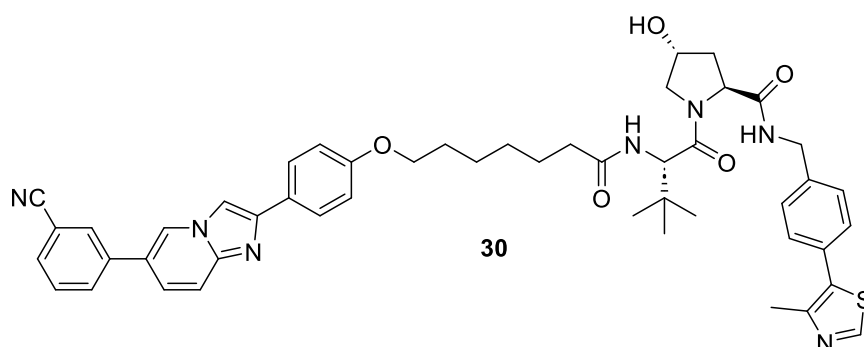
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.65 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.86 – 7.79 (m, 4H), 7.78 – 7.75 (m, 1H), 7.67 – 7.66 (m, 1H), 7.65 – 7.64 (m, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 7H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.55 – 4.49 (m, 3H), 4.31 (dd, *J_s* = 15.1, 5.4 Hz, 1H), 4.04 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.61 (dd, *J_s* = 11.3, 3.8 Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.47 – 2.42 (m, 1H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.14 – 2.07 (m, 1H), 1.76 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.71 – 1.61 (m, 2H), 1.50 – 1.42 (m, 2H), 0.93 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.6, 171.9, 171.0, 159.4, 153.0, 148.5, 146.8, 145.0, 138.8, 138.2, 131.7, 131.3 (2C), 131.0, 130.4, 130.1, 129.6 (2C), 128.2 (2C), 127.5 (2C), 126.0, 124.7, 124.4, 123.3, 118.6, 117.6, 114.9 (2C), 113.5, 108.0, 70.1, 67.8, 58.8, 57.6, 56.8, 43.3, 36.4, 36.2, 35.2, 29.0, 26.5 (3C), 25.8, 25.4, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3291, 3079, 2923, 2856, 2228, 1624, 1242, 1172, 835, 793 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(7-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)eptanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₄₉ H ₅₃ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	852.39
Peso molecolare:	852.07	Resa:	65%
Stato fisico:	solido pesca	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5
Punto di fusione:	68 – 70 °C		

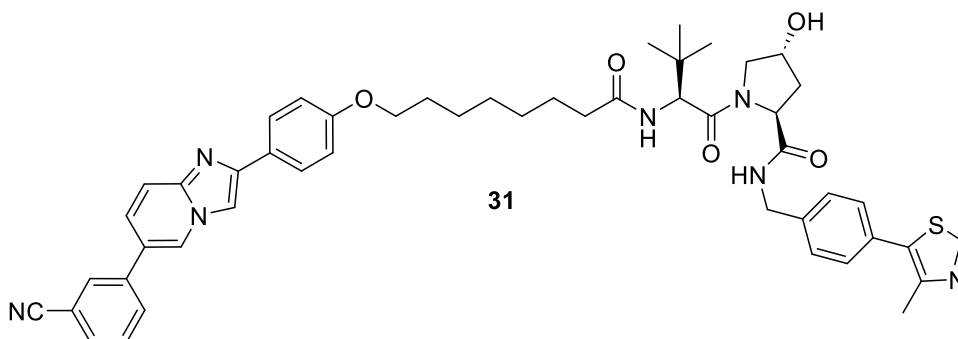
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.91 – 7.85 (m, 4H), 7.81 (dt, *J*_s = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.73 – 7.68 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.39 – 7.37 (m, 1H), 7.36 – 7.32 (m, 4H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.60 – 4.52 (m, 2H), 4.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J*_s = 15.0, 5.2 Hz, 1H), 4.15- 4.12 (m, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.58 (dd, *J*_s = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 2.59 (ddd, *J*_s = 13.0, 7.6, 4.7 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.11 (ddd, *J*_s = 10.0, 8.1, 4.1 Hz, 1H), 1.80 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.69 – 1.64 (m, 2H), 1.51 – 1.46 (m, 2H), 1.42 – 1.36 (m, 2H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.8, 172.2, 170.7, 159.5, 150.4, 148.6, 146.8, 144.9, 138.8, 138.2, 131.4, 131.7, 131.4, 131.3, 131.2, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.6 (2C), 125.8, 124.6, 123.3, 118.6, 117.7, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2, 68.0, 58.5, 57.6, 56.8, 43.4, 36.5, 35.8, 34.8, 29.1, 28.9, 26.6 (3C), 25.8, 25.5, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3304, 3066, 2922, 2853, 2229, 1625, 1243, 1172, 793, 728 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(8-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)octanamido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₅₀ H ₅₅ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	866.40
Peso molecolare:	866.09	Resa:	80%
Stato fisico:	solido bianco	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3
Punto di fusione:	89 – 91 °C		

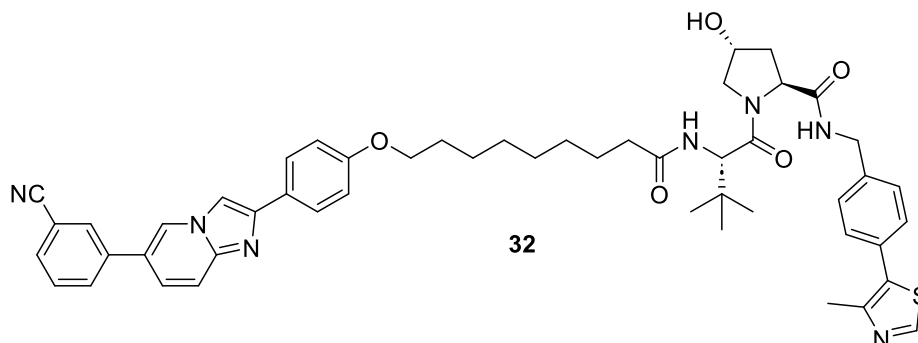
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.89 – 7.84 (m, 4H), 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.71 – 7.67 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 6H), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.59 – 4.47 (m, 3H), 4.32 (dd, *J*_s = 14.9, 5.2 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.59 (dd, *J*_s = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.12 (br s, 1H), 2.60 – 2.53 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.14 – 2.09 (m, 1H), 1.79 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.66 – 1.60 (m, 2H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.39 – 1.31 (m, 2H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 172.2, 170.6, 159.5, 150.5, 147.5, 147.0, 145.0, 140.2, 138.2, 131.7, 131.4, 131.3, 131.2, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.6 (2C), 126.0, 124.5, 123.3, 121.5, 118.6, 117.7, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2, 68.1, 58.4, 57.6, 56.8, 43.5, 36.6, 35.7, 34.8, 29.2, 29.1 (2C), 26.6 (3C), 25.9, 25.6, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3304, 3065, 2923, 2854, 2229, 1624, 1244, 1173, 793, 727 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(9-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)nonanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₅₁ H ₅₇ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	880.42
Peso molecolare:	880.12	Resa:	83%
Stato fisico:	solido beige	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 96:4
Punto di fusione:	108 – 110 °C		

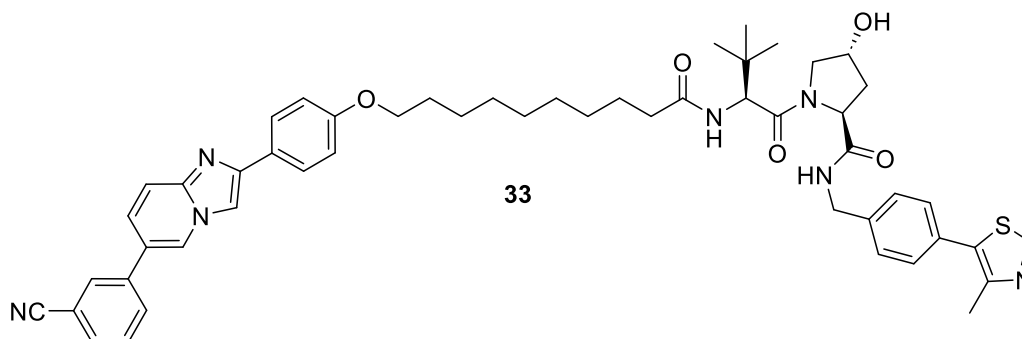
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.89 – 7.79 (m, 4H), 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.71 – 7.67 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 6H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.60 – 4.49 (m, 3H), 4.32 (dd, *J*_s = 15.0, 5.0 Hz, 1H), 4.12 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.58 (dd, *J*_s = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.19 (br s, 1H), 2.60 – 2.53 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.20 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.58 (m, 2H), 1.49 – 1.42 (m, 2H), 1.40 – 1.29 (s, 6H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 172.2, 170.7, 159.6, 150.4, 148.7, 147.1, 145.1, 138.9, 138.2, 131.7, 131.4, 131.3, 131.2, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.5 (2C), 126.0, 124.8, 124.4, 123.3, 118.6, 117.8, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2, 68.2, 58.5, 57.6, 56.8, 43.4, 36.6, 35.8, 34.9, 29.3 (2C), 29.2 (2C), 26.6 (3C), 26.1, 25.6, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3304, 3065, 2925, 2855, 2228, 1616, 1242, 1172, 1081, 792 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(10-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)decanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₅₂ H ₅₉ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	894.44
Peso molecolare:	894.15	Resa:	37%
Stato fisico:	solido rosa	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3
Punto di fusione:	72 – 74 °C		

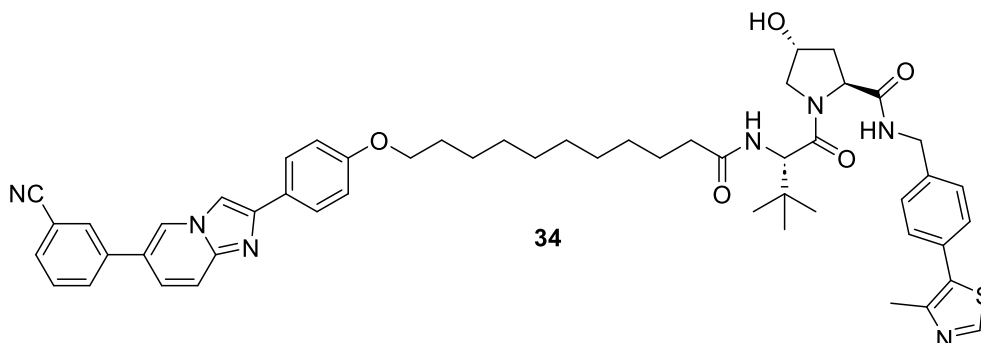
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 4H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.74 – 7.68 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 6H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.47 (m, 3H), 4.32 (dd, *J*_s = 15.0, 5.0 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.65 – 3.57 (m, 1H), 2.59 – 2.57 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.81 – 1.77 (m, 2H), 1.64 – 1.60 (m, 4H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.37 – 1.25 (s, 6H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.3, 170.6, 159.6, 152.2, 148.7, 147.1, 145.1, 138.9, 138.1, 131.4, 131.3, 131.2 (2C), 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.5 (2C), 126.0, 124.8, 124.4, 123.3, 118.6, 117.8, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2, 68.2, 58.4, 57.6, 56.7, 43.5, 36.6, 35.6, 34.7, 29.4 (2C), 29.3 (2C), 29.2, 26.6 (3C), 26.1, 25.6, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3303, 3065, 2921, 2852, 2229, 1624, 1244, 1172, 1083, 794 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(11-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)undecanammido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



Formula bruta:	C ₅₃ H ₆₁ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	908.45
Peso molecolare:	908.18	Resa:	82%
Stato fisico:	solido rosa	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3
Punto di fusione:	91 – 93 °C		

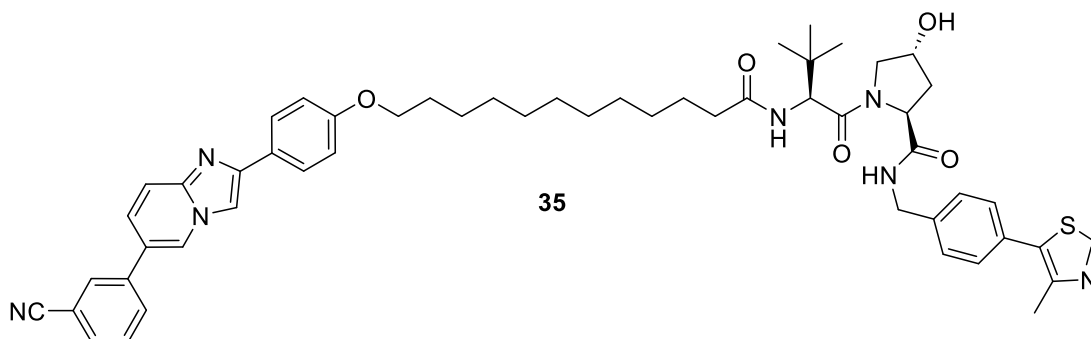
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 4H), 7.81 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.72 – 7.68 (m, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 6H), 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 4.60 – 4.52 (m, 2H), 4.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.36 – 4.29 (m, 1H), 4.12 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.59 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.04 (br s, 1H), 2.62 – 2.54 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.09 (m, 1H), 1.83 – 1.76 (m, 2H), 1.72 – 1.65 (m, 2H), 1.63 – 1.55 (m, 2H), 1.48 – 1.45 (m, 2H), 1.28 (s, 8H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.2, 170.6, 159.6, 150.4, 148.7, 147.0, 145.0, 138.9, 138.2, 131.7, 131.4, 131.3, 131.2, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.5 (2C), 125.9, 124.8, 124.5, 123.3, 118.6, 117.8, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2, 68.2, 58.5, 57.6, 56.7, 43.5, 36.7, 35.7, 34.8, 29.5, 29.4 (3C), 29.3 (2C), 26.6 (3C), 26.1, 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3305, 3066, 2922, 2852, 2228, 1615, 1242, 1171, 1082, 792 cm⁻¹.

Caratteristiche chimico-fisiche

(2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(12-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)dodecanamido)-3,3-dimetilbutanoil)-4-idrossi-*N*-(4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)pirrolidin-2-carbossammide



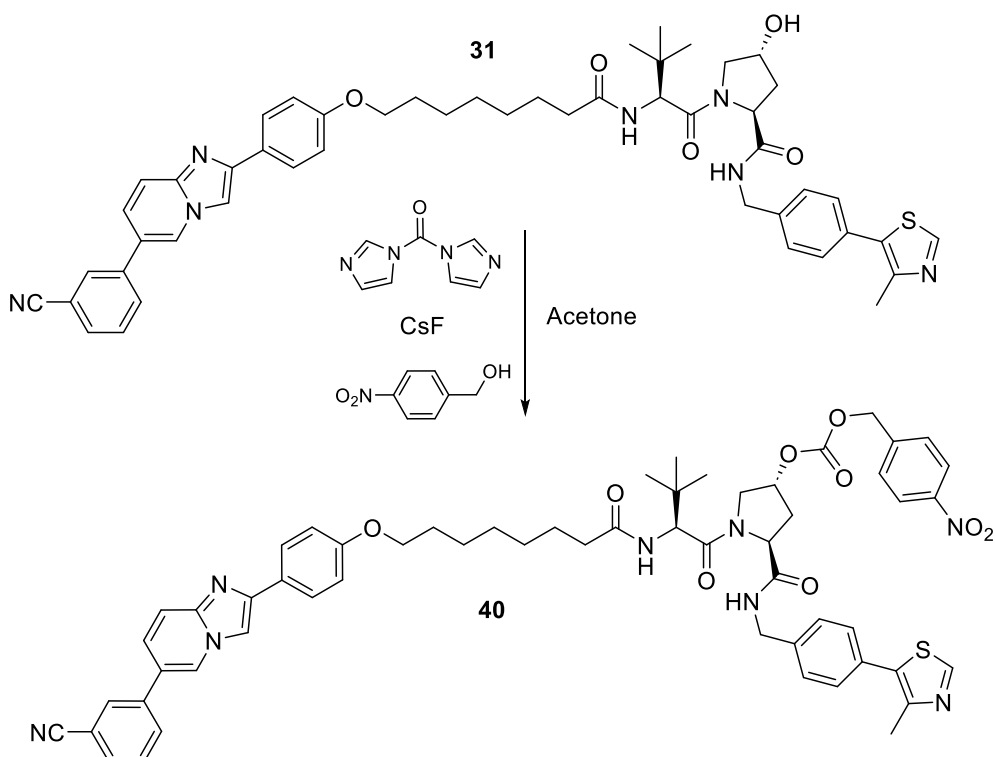
Formula bruta:	C ₅₄ H ₆₃ N ₇ O ₅ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	922.47
Peso molecolare:	922.20	Resa:	94%
Stato fisico:	solido bianco	Eluente:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 97:3
Punto di fusione:	82 – 84 °C		

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 4H), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 2H), 7.62 – 7.58 (m, 1H), 7.38 – 7.32 (m, 6H), 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.60 – 4.47 (m, 3H), 4.35 – 4.30 (m, 1H), 4.12 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.58 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.07 (br s, 1H), 2.61 – 2.55 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.14 – 2.09 (m, 1H), 1.81 – 1.78 (m, 2H), 1.69 – 1.65 (m, 4H), 1.62 – 1.52 (m, 2H), 1.50 – 1.42 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 8H), 0.92 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 174.1, 172.3, 170.6, 159.6, 150.4, 148.7, 147.0, 145.0, 138.9, 138.2, 131.7, 131.4, 131.3, 131.2, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.3 (2C), 127.5 (2C), 125.9, 124.8, 124.5, 123.3, 118.6, 117.8, 115.0 (2C), 113.6, 107.9, 70.2 (2C), 68.2, 58.5, 57.6, 56.7, 43.5, 36.7, 35.7, 34.8, 29.6 (2C), 29.5, 29.4 (2C), 29.3, 26.6 (3C), 26.1, 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3304, 3062, 2921, 2852, 2228, 1616, 1242, 1172, 1082, 793 cm⁻¹.

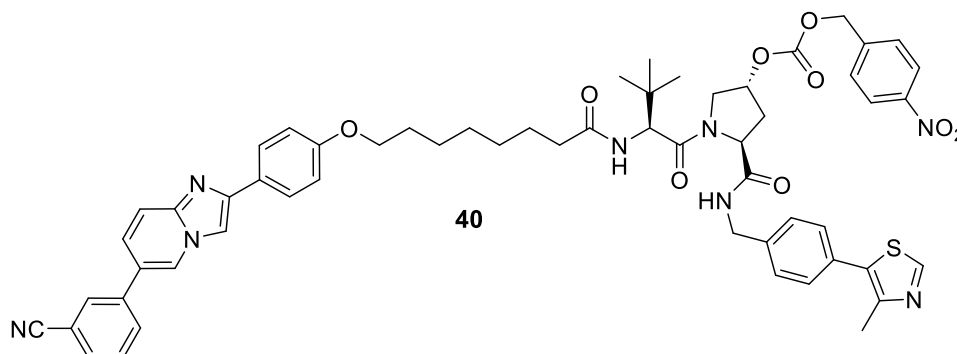
SINTESI DEL (3R,5S)-1-((S)-2-(8-(4-(6-(3-CIANO FENIL)IMIDAZO[1,2-a]PIRIDIN-2-IL)FENOSSID)OCTANAMMIDO)-3,3-DIMETILBUTANOIL)-5-((4-(4-METILTIAZOL-5-IL)BENZIL)CARBAMOIL)PIRROLIDIN-3-IL (4-NITROBENZIL) CARBONATO



In ambiente anidro, si solubilizza il PROTAC **31** (30 mg, 0.035 mmol, 0.8 eq) in acetone (0.6 mL), si aggiunge CDI (9.10 mg, 0.056 mmol, 1.3 eq) e si lascia la miscela di reazione in agitazione per 6 ore. Si aggiungono poi il (4-nitrofenil)metanolo (5.30 mg, 0.035 mmol, 0.8 eq) e CsF (0.13 mg, 0.0009 mmol, 0.02 eq); quindi, si lascia la miscela di reazione risultante in agitazione a temperatura ambiente *overnight*. A reazione conclusa, si evapora il solvente e si purifica il grezzo mediante colonna cromatografica flash, usando come eluente EtOAc, ottenendo 9.4 mg di un solido beige con una resa del 25%.

Caratteristiche chimico-fisiche

(3*R*,5*S*)-1-((*S*)-2-(8-(4-(6-(3-cianofenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)fenossi)octanamido)-3,3-dimetilbutanoil)-5-((4-(4-metiltiazol-5-il)benzil)carbamoil)pirrolidin-3-il (4-nitrobenzil) carbonato



Formula bruta:	C ₅₈ H ₆₀ N ₈ O ₉ S	Massa (ESI) [M+H]⁺:	1045.43
Peso molecolare:	1045.23	Resa:	25%
Stato fisico:	solido beige	Eluente:	EtOAc
Punto di fusione:	94 – 96 °C		

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.24 – 8.20 (m, 2H), 7.90 – 7.75 (m, 3H), 7.84 (s, 1H), 7.80 (dt, *J*_s = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.71 – 7.67 (m, 2H), 7.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 6H), 7.23 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.00 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.32 – 5.29 (m, 2H), 4.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.60 – 4.54 (m, 2H), 4.34 – 4.27 (m, 2H), 3.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.78 (dd, *J*_s = 11.7, 3.9 Hz, 1H), 2.84 – 2.78 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.30 – 2.24 (m, 1H), 2.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.80 – 1.73 (m, 2H), 1.60 – 1.56 (m, 2H), 1.44 – 1.41 (m, 2H), 1.33 – 1.30 (m, 4H), 0.90 (s, 9H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.0, 172.1, 169.9, 159.5, 154.3, 150.5, 148.7, 148.0, 147.0, 145.1, 142.3, 138.9, 137.9, 131.6 (2C), 131.4, 131.3, 130.5, 130.2, 129.7 (2C), 128.6 (2C), 128.4 (2C), 127.5 (2C), 126.1, 124.7, 124.4, 124.0 (2C), 123.3, 118.6, 117.8, 114.9 (2C), 113.6, 107.9, 76.9, 68.4, 68.1, 58.3, 57.0, 53.8, 43.6, 36.7, 35.4, 32.6, 29.3, 29.2, 29.1, 26.5 (3C), 26.0, 25.7, 16.2.

IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 2922, 2852, 2230, 1746, 1634, 1518, 1344, 1246, 1015, 794 cm⁻¹

6. Bibliografia

1. Drápela S, Bouchal J, Jolly MK, Culig Z, Souček K. ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance. *Front Mol Biosci.* 2020;7. doi:10.3389/fmolb.2020.00036
2. Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 2021. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10). doi:10.3390/ijms23105848
3. Debnath P, Huirem RS, Dutta P, Palchaudhuri S. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep.* 2022;42(1). doi:10.1042/BSR20211754
4. Saitoh M. Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2023;97:21-29. doi:10.1016/j.semcancer.2023.10.001
5. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.* 2015;14(4):481-487. doi:10.1080/15384101.2015.1006048
6. Wong TS, Gao W, Chan JYW. Transcription regulation of E-cadherin by zinc finger E-box binding homeobox proteins in solid tumors. *Biomed Res Int.* 2014;2014:921564. doi:10.1155/2014/921564
7. Zhang Y, Xu L, Li A, Han X. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;110:400-408. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.112
8. Zhang P, Wei Y, Wang L i., et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat Cell Biol.* 2014;16(9):864-875. doi:10.1038/ncb3013
9. Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(10):601-620. doi:10.1038/s41571-019-0222-4
10. Bassani B, Simonetti G, Cancila V, et al. ZEB1 shapes AML immunological niches, suppressing CD8 T cell activity while fostering Th17 cell expansion. *Cell Rep.* 2024;43(2):113794. doi:10.1016/j.celrep.2024.113794
11. Vlashi E, Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semin Cancer Biol.* 2015;31:28-35. doi:10.1016/j.semcancer.2014.07.001

12. Barbato L, Bocchetti M, Di Biase A, Regad T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*. 2019;8(8). doi:10.3390/cells8080926
13. Zhang H, Steed A, Co M, Chen X. Cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, ATP and their roles in drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2021;4(3):684-709. doi:10.20517/cdr.2021.32
14. Kharkar PS. Cancer Stem Cell (CSC) Inhibitors in Oncology-A Promise for a Better Therapeutic Outcome: State of the Art and Future Perspectives. *J Med Chem*. 2020;63(24):15279-15307. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01336
15. McLean ME, MacLean MR, Cahill HF, et al. The Expanding Role of Cancer Stem Cell Marker ALDH1A3 in Cancer and Beyond. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2). doi:10.3390/cancers15020492
16. Duan JJ, Wang D, Cai J, et al. An aldehyde dehydrogenase 1A3 inhibitor attenuates the metastasis of human colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2022;536. doi:10.1016/j.canlet.2022.215662
17. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(4):735-746. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.033
18. Duan JJ, Cai J, Gao L, Yu SC. ALDEFLUOR activity, ALDH isoforms, and their clinical significance in cancers. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2023;38(1). doi:10.1080/14756366.2023.2166035
19. Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact*. 2000;129(1-2):1-19. doi:10.1016/S0009-2797(00)00211-8
20. Poturnajova M, Kozovska Z, Matuskova M. Aldehyde dehydrogenase 1A1 and 1A3 isoforms - mechanism of activation and regulation in cancer. *Cell Signal*. 2021;87:110120. doi:10.1016/j.cellsig.2021.110120
21. Nie S, Qian X, Shi M, et al. ALDH1A3 Accelerates Pancreatic Cancer Metastasis by Promoting Glucose Metabolism. *Front Oncol*. 2020;10:915. doi:10.3389/fonc.2020.00915

22. Xu X, Chai S, Wang P, et al. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2015;369(1):50-57. doi:10.1016/j.canlet.2015.08.018
23. Li J, Garavaglia S, Ye Z, et al. A specific inhibitor of ALDH1A3 regulates retinoic acid biosynthesis in glioma stem cells. *Commun Biol.* 2021;4(1). doi:10.1038/s42003-021-02949-7
24. Son J, Du W, Esposito M, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of ALDH1A3 as a treatment of β -cell failure. *Nat Commun.* 2023;14(1):558. doi:10.1038/s41467-023-36315-4
25. Cheng P, Wang J, Waghmare I, et al. FOXD1-ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Res.* 2016;76(24):7219-7230. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2860
26. Quattrini L, Gelardi ELM, Coviello V, et al. Imidazo[1,2- a]pyridine derivatives as aldehyde dehydrogenase inhibitors: Novel chemotypes to target glioblastoma stem cells. *J Med Chem.* 2020;63(9):4603-4616. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01910
27. Gelardi ELM, Colombo G, Picarazzi F, et al. A selective competitive inhibitor of aldehyde dehydrogenase 1A3 hinders cancer cell growth, invasiveness and stemness in vitro. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):1-20. doi:10.3390/cancers13020356
28. Boumya S, Fallarini S, Siragusa S, et al. A Selective ALDH1A3 Inhibitor Impairs Mesothelioma 3-D Multicellular Spheroid Growth and Neutrophil Recruitment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076689
29. Zou Y, Ma D, Wang Y. The PROTAC technology in drug development. *Cell Biochem Funct.* 2019;37(1):21-30. doi:10.1002/cbf.3369
30. Li X, Song Y. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):50. doi:10.1186/s13045-020-00885-3
31. Kelm JM, Pandey DS, Malin E, et al. PROTAC'ing oncoproteins: targeted protein degradation for cancer therapy. *Mol Cancer.* 2023;22(1):62. doi:10.1186/s12943-022-01707-5

32. Sharma A, Trivedi AK. Regulation of apoptosis by E3 ubiquitin ligases in ubiquitin proteasome system. *Cell Biol Int.* 2020;44(3):721-734. doi:10.1002/cbin.11277
33. Pettersson M, Crews CM. PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) - Past, present and future. *Drug Discov Today Technol.* 2019;31:15-27. doi:10.1016/j.ddtec.2019.01.002
34. Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell.* 2020;181(1):102-114. doi:10.1016/j.cell.2019.11.031
35. Ocaña A, Pandiella A. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):189. doi:10.1186/s13046-020-01672-1
36. Troup RI, Fallan C, Baud MGJ. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review. *Explor Target Antitumor Ther.* 2020;1(5):273-312. doi:10.37349/etat.2020.00018
37. <https://njbio.com/targeted-protein-degraders/>.
38. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05732428?cond=ARV-471&rank=6>.
39. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03888612?cond=NCT03888612.&rank=1>.
40. Wang C, Zhang Y, Chen W, Wu Y, Xing D. New-generation advanced PROTACs as potential therapeutic agents in cancer therapy. *Mol Cancer.* 2024;23(1):110. doi:10.1186/s12943-024-02024-9
41. Moreau K, Coen M, Zhang AX, et al. Proteolysis-targeting chimeras in drug development: A safety perspective. *Br J Pharmacol.* 2020;177(8):1709-1718. doi:10.1111/bph.15014
42. Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell.* 2020;181(1):102-114. doi:10.1016/j.cell.2019.11.031
43. Chen C, Yang Y, Wang Z, Li H, Dong C, Zhang X. Recent Advances in Pro-PROTAC Development to Address On-Target Off-Tumor Toxicity. *J Med Chem.* 2023;66(13):8428-8440. doi:10.1021/acs.jmedchem.3c00302

44. Maneiro M, Forte N, Shchepinova MM, et al. Antibody–PROTAC Conjugates Enable HER2-Dependent Targeted Protein Degradation of BRD4. *ACS Chem Biol.* 2020;15(6):1306-1312. doi:10.1021/acscchembio.0c00285
45. He S, Gao F, Ma J, Ma H, Dong G, Sheng C. Aptamer-PROTAC Conjugates (APCs) for Tumor-Specific Targeting in Breast Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021;60(43):23299-23305. doi:10.1002/anie.202107347
46. Liu J, Chen H, Liu Y, et al. Cancer Selective Target Degradation by Folate-Caged PROTACs. *J Am Chem Soc.* 2021;143(19):7380-7387. doi:10.1021/jacs.1c00451
47. Yang C, Yang Y, Li Y, Ni Q, Li J. Radiotherapy-Triggered Proteolysis Targeting Chimera Prodrug Activation in Tumors. *J Am Chem Soc.* 2023;145(1):385-391. doi:10.1021/jacs.2c10177
48. Xue G, Wang K, Zhou D, Zhong H, Pan Z. Light-Induced Protein Degradation with Photocaged PROTACs. *J Am Chem Soc.* 2019;141(46):18370-18374. doi:10.1021/jacs.9b06422
49. Li Y, Zhao L, Li XF. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat.* 2021;20:153303382110363. doi:10.1177/15330338211036304
50. Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019;18(1):157. doi:10.1186/s12943-019-1089-9
51. Wang W, Cai J, Wong NK, et al. Visualizing nitroreductase activity in living cells and tissues under hypoxia and hepatic inflammation. *Analyst.* 2022;147(7):1449-1456. doi:10.1039/d1an01724a
52. Shi S, Du Y, Zou Y, et al. Rational Design for Nitroreductase (NTR)-Responsive Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Selectively Targeting Tumor Tissues. *J Med Chem.* 2022;65(6):5057-5071. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c02221
53. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-496. doi:10.3109/10715761003667554

54. Liu H, Ren C, Sun R, et al. Reactive oxygen species-responsive Pre-PROTAC for tumor-specific protein degradation. *Chemical Communications*. 2022;58(72):10072-10075. doi:10.1039/D2CC03367D
55. Krieger J, Sorrell FJ, Wegener AA, et al. Systematic Potency and Property Assessment of VHL Ligands and Implications on PROTAC Design. *ChemMedChem*. 2023;18(8):e202200615. doi:10.1002/cmdc.202200615
56. Setia N, Almuqdad HTA, Abid M. Journey of Von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase in PROTACs design: From VHL ligands to VHL-based degraders. *Eur J Med Chem*. 2024;265. doi:10.1016/j.ejmech.2023.116041

7. Ringraziamenti

Arrivata alla fine di questo percorso vorrei ringraziare tutti coloro che ne hanno fatto parte e che in qualche modo mi hanno sostenuta durante il raggiungimento di questo traguardo.

Vorrei innanzitutto ringraziare la mia relatrice *Tracey* che mi ha dato la possibilità di entrare a far parte del suo gruppo di ricerca e mi ha trasmesso la passione per questo lavoro fin dalle prime ore di lezione del corso di PESF.

Grazie a *Rita* per il supporto costante e l'immensa disponibilità in ogni momento di bisogno e grazie a *Laura* per avermi seguita durante tutta la stesura della tesi.

Un grazie infinito va ai miei genitori *Patrizia* e *Maurizio* per avermi dato la possibilità di studiare e per essere sempre stati i miei fan numero uno durante tutto questo percorso di studi. Grazie mamma per tutte le interrogazioni simulate ogni sera prima di un esame per farmi passare l'ansia, e grazie papà per aver sempre avuto pronta una battuta o una parola dolce, nonostante qualche mio sclero in piena sessione. Grazie a mia zia *Paola* per avermi sempre sostenuta nello studio e per avermi fatto da seconda mamma.

Un grazie speciale va ai miei nonni, *Carla*, *Anna* e *Franco*, che anche se non sono più qui con me, so che da lassù mi hanno sempre sostenuta e sempre lo faranno.

Grazie a tutti i compagni e le compagne di laboratorio, *Laura*, *Georgia*, *Jane* e *Pietro* per le risate, la musica e le battute nelle giornate no, per aver reso tutto più leggero e spensierato. Grazie per avermi accompagnato nelle giornate di questi sei mesi trascorsi con voi.

E infine, un grazie un po' particolare e probabilmente per molti strano, va a tutti i miei animali, poiché ognuno di loro ha giocato un piccolo ruolo in questo percorso, insegnandomi qualcosa o strappandomi una risata in una giornata no, dormendo sempre al mio fianco nelle interminabili giornate di studio.

Grazie a tutti coloro che mi sono sempre stati vicini e su cui ho sempre potuto fare affidamento durante tutto il mio percorso universitario.

Debby