

# ***UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA***



## ***FACOLTA' DI FARMACIA***

*Corso di Laurea Specialistica in Farmacia*

### **TESI DI LAUREA**

**“PROGETTAZIONE, SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI  
NUOVI INIBITORI DELLA SERINA-TREONINA CHINASI  
AKT A STRUTTURA 2-OXO-INDOLICA VARIAMENTE  
FUNZIONALIZZATA IN POSIZIONE 3 E 5”**

#### **Relatore**

Dott.ssa Simona Rapposelli

#### **Candidata**

Chiara Bertagnini

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

# ***INDICE***

<i><b>INTRODUZIONE GENERALE</b></i> .....	<b>3</b>
<b>AKT/PKB</b> .....	6
<b>STRUTTURA AKT/PKB</b> .....	7
• <b>DOMINIO PH</b> .....	8
• <b>DOMINIO CHINASICO (KD)</b> .....	8
• <b>DOMINIO CARBOSSI TERMINALE (CTD)</b> .....	8
<b>MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DI AKT</b> .....	9
<b>PROCESSI CELLULARI REGOLATI DA PKB/AKT</b> .....	10
<b>COMPONENTI DELLA VIA PI3K/AKT</b> .....	14
• <b>PI3K</b> .....	14
• <b>PTEN</b> .....	15
• <b>PDK1</b> .....	16
<b>RUOLO DI AKT NEL CANCRO</b> .....	17
<b>FARMACI INIBITORI DELL'ASSE PI3K/AKT/mTOR</b> .....	18
• <b>INIBITORI PI3K</b> .....	18
• <b>INIBITORI PDK1</b> .....	20
• <b>INIBITORI mTOR</b> .....	22
• <b>AKT</b> .....	23
<i><b>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE</b></i> .....	<b>28</b>
<i><b>PARTE SPERIMENTALE</b></i> .....	<b>37</b>
<i><b>BIBLIOGRAFIA</b></i> .....	<b>49</b>

# ***INTRODUZIONE GENERALE***

Il cancro è una delle prime cause di morte nel mondo, seconda solo alle malattie cardiovascolari; solamente negli stati uniti, sono stati diagnosticati circa 1,44 milioni di nuovi casi di cancro nel 2007<sup>1</sup>.

Il processo di carcinogenesi è il risultato di uno squilibrio tra divisione e crescita cellulare da un lato e morte cellulare programmata dall'altro.

Spesso ad alterare questo equilibrio è un danno, indotto chimicamente o fisicamente, all'integrità cromosomiale, che riduce l'abilità della cellula di regolare la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione cellulare.

In questo delicato equilibrio, le proteine e i segnali che regolano la crescita, lo sviluppo e la differenziazione cellulare possono essere sottoposti a mutazione<sup>2</sup>. Sono generalmente due i tipi di alterazioni che portano alla formazione di tumori: mutazioni di specifiche classi di geni, quali proto-oncogeni e geni soppressori dei tumori.

Spesso i proto-oncogeni codificano per proteine che hanno la funzione di stimolare la divisione, l'inibizione e la differenziazione cellulare; tutti questi processi sono importanti per un normale sviluppo e per il mantenimento dei tessuti e degli organi. A seguito di eventi particolari (mutazioni puntiformi, eventi di traslocazione genica o fusione con altri geni) possono dare origine agli oncogeni, i quali incrementano la produzione di queste proteine: si ha quindi un aumento della divisione delle cellule, una diminuzione della differenziazione e un'inibizione della morte cellulare.

Gli oncogeni sono anche detti geni dominanti in quanto è sufficiente la presenza di un singolo allele mutato, perché si abbia la trasformazione neoplastica<sup>3</sup>. Esempi di trasformazione di proto-oncogeni in oncogeni sono rappresentati da *ret*, *ras* e *myc*.

Un certo numero di proto-oncogeni codifica per recettori cellulari di membrana, i quali, in seguito all'interazione con lo specifico ligando esterno, inducono una cascata di reazioni cellulari.

Tali recettori sono costituiti da tre parti:

- Regione extracellulare, in grado di captare i segnali esterni;
- Regione transmembrana, che permette la comunicazione tra interno ed esterno della cellula;
- Regione intracellulare, la quale ha una sua attività enzimatica e può associarsi ad altre proteine all'interno della cellula;

Esempi di questi recettori sono:

- recettori accoppiati a proteine G
- recettori tirosin-chinasici (RTK)
- recettori accoppiati a chinasi

I recettori accoppiati a chinasi, la cui struttura ed il meccanismo d'azione sono simili a quelli degli RTK, non hanno attività tirosin-chinasica, ma la loro azione è mediata da una chinasi cellulare; recettori di questo tipo comprendono quelli dell'insulina, di varie citochine e dei fattori di crescita.

I proto-oncogeni codificano, inoltre, per alcune proteine intracellulari che agiscono a valle dei recettori di membrana e stimolano la divisione e la crescita cellulare<sup>4</sup>.

La maggior parte dei fattori oncogenici appartiene a diverse famiglie di protein-chinasi, coinvolte nei processi di trasduzione del segnale.

Fattori di crescita autocrini, citochine, amminoacidi, ioni, lipidi si legano alla regione extracellulare di alcuni dei differenti tipi di recettori transmembrana e le cellule rispondono a queste varie forme di stimoli attraverso alcune vie di trasduzione dei segnali, che utilizzano una serie di proteine chinasi, le quali danno reazioni di fosforilazione<sup>5</sup>.

Le chinasi possono essere ricondotte a due principali classi: serina/treonina chinasi e tirosina chinasi, in grado di trasferire un gruppo fosfato a residui di serina e treonina, o a residui di tirosina, rispettivamente.

Alcune delle serina-treonina protein chinasi appartengono alle famiglie di proteine chinasi più conosciute: le AGC proteine chinasi e la famiglia delle MAPK (mitogen-activated protein kinase).

La famiglia delle AGC include proteine, come PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase), PKC (Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-activated protein kinase), PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1) e la proteina chinasi B (PKB o AKT)<sup>5</sup>.

La PKB rappresenta un bersaglio a valle di molti recettori, regolati da importanti stimoli: fattori di crescita (EGF, PDGF-R, bFGF), insulina e fattore di crescita insulino simile I (IGF-1).

Negli ultimi anni è stato dimostrato come la via PI3K/AKT, coinvolta nei processi di trasduzione, sia frequentemente alterata in alcuni tipi di tumore; l'asse PI3K/AKT è importante, non solo nello sviluppo dei tumori, ma anche nello studio di nuove terapie contro il cancro<sup>2</sup>.

Si tratta di nuove terapie mirate, nelle quali un farmaco distrugge in modo specifico le cellule tumorali maligne, senza danneggiare significativamente le cellule normali, e che costituiscono un utile supporto alle altre terapie antitumorali, citotossica e antiormonale.

Come uno dei maggiori bersagli di PI3K nella trasduzione del segnale, AKT gioca un ruolo centrale nel promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare: tra tutti i nuovi approcci in fase di studio, gli inibitori di AKT sono stati recentemente presi in considerazione come agenti antitumorali, rappresentandone la classe in più rapido sviluppo<sup>6</sup>.

### **AKT/PKB**

AKT, conosciuto anche come PKB, fu caratterizzato nel 1991 in seguito all'isolamento di due geni (AKT1 e AKT2) identificati come omologhi umani dell'oncogene retrovirale v-AKT, responsabile di un tipo di leucemia nei topi<sup>7</sup>.

v-AKT e i suoi omologhi codificano per una proteina chinasi che ha alcune somiglianze con la proteina chinasi C (PKC) e la proteina chinasi A (PKA)<sup>8</sup>, e fu pertanto chiamata PKB.

Nelle cellule di mammifero, fino ad ora, sono stati isolati tre membri di questa famiglia, chiamati PKB $\alpha$  (AKT1), PKB $\beta$  (AKT2) e PKB $\gamma$  (AKT3)<sup>9</sup>; sebbene esse siano prodotte da tre geni differenti, sono strettamente correlate l'una con l'altra.

I tre geni sono espressi in modo diverso, con una più ampia espressione per PKB $\alpha$ /AKT1 e PKB $\beta$ /AKT2 ed una più ridotta espressione per PKB $\gamma$ /AKT3<sup>2</sup>; la loro distribuzione tissutale è stata recentemente determinata usando una PCR quantitativa in tempo reale (RT-PCR)<sup>10</sup>.

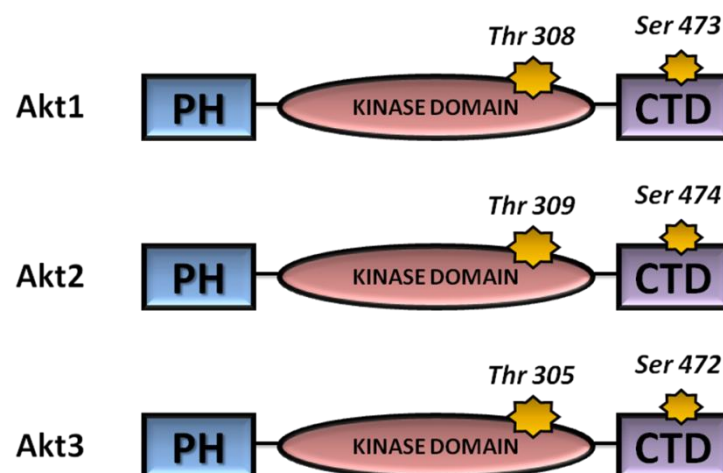
Nei tessuti di topo, AKT1 è ubiquitariamente espressa ad alti livelli ad eccezione di rene, milza e fegato, mentre AKT3 non è rilevato nei diversi tessuti dove AKT1 e AKT2 sono ampiamente espressi, ma mostra una buona espressione a livello del cervello e dei testicoli. PKB $\beta$  o AKT2 è espressa prevalentemente nei tessuti bersaglio dell'insulina, quali cellule adipose, epatiche e muscolari scheletriche<sup>11</sup>.

## **STRUTTURA AKT/PKB**

Le tre isoforme di AKT presentano la stessa struttura: un dominio ammino-terminale denominato pleckstrin homology (PH), un dominio chinamico centrale ed un dominio regolatore carbossi-terminale (CTD), costituito da una sequenza idrofobica caratteristica della famiglia delle AGC, molte delle quali sono regolate da secondi messaggeri, tra cui Calcio, mononucleotidi ciclici o fosfoinositidi<sup>11</sup>.

Nel dominio catalitico e nella regione carbossi-terminale si trovano due residui amminoacidici fondamentali per l'attivazione della proteina: un residuo di treonina nel dominio chinamico e un residuo di serina nel CTD.

Nello specifico, tali amminoacidi si trovano nelle posizioni 308 in AKT1, 309 in AKT2 e 305 in AKT3 per quanto riguarda la treonina, mentre la serina si trova nella posizione 473 in AKT1, 474 in AKT2 e 472 in AKT3.



**Fig.1:** Struttura delle tre isoforme di Akt

### **DOMINIO PH**

Sono stati descritti una varietà di domini che riconoscono specifici fosfoinositidi, inclusi domini PH, FYVE e SH2<sup>12</sup>.

I domini PH sono sequenze amminoacidiche contenenti dai 100 ai 120 amminoacidi, in grado di legare fosfoinositidi con buona affinità e specificità<sup>13</sup>.

Il dominio PH interagisce con i prodotti della membrana lipidica, tra i quali il fosfatidil-inositolo trifosfato (PIP3) prodotto dalla fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K).

Analisi biochimiche hanno rivelato che il dominio PH di AKT lega sia il fosfatidil-inositolo trifosfato (PIP3) che il fosfatidil-inositolo bifosfato (PIP2) con uguale affinità<sup>14</sup>.

Direttamente collegato al dominio PH vi è il dominio catalitico o dominio chinamico

### **DOMINIO CHINASICO (KD)**

Il dominio chinamico di AKT, situato nella parte centrale della proteina, ha una grande somiglianza con le altre proteine chinasi appartenenti alla famiglia delle AGC, ad esempio PKA, PKB, p70S6K e p90RSK.

Il dominio è costituito da 9 foglietti  $\beta$ , 7  $\alpha$ -eliche e numerose zone di legame. Il residuo di Treonina, la cui fosforilazione è richiesta per l'attivazione enzimatica, è localizzato tra i motivi DFG e APE nella "zona di attivazione", che si trova nel lobo C del dominio chinamico<sup>15</sup>.

### **DOMINIO CARBOSSI TERMINALE (CTD)**

Tutte le isoforme di PKB/AKT sono costituite da un dominio carbossi-terminale di circa 40 amminoacidi; questo dominio possiede un motivo idrofobico, tipico delle chinasi della famiglia delle AGC<sup>15</sup>.

Il dominio regolatorio C-terminale contiene il secondo sito di fosforilazione, sulla serina 473, fondamentale per la massima attivazione della chinasi. La sequenza idrofobica è importante in quanto una delezione di questo motivo porta alla perdita dell'attività enzimatica<sup>16</sup>.



## **MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DI AKT**

La completa attivazione della proteina chinasi B è un processo multi-step in cui le diverse proteine, responsabili di ogni step, sono state identificate e caratterizzate<sup>11</sup>. Una serie di stimoli, quali fattori di crescita (IGF-1, PDGF, NGF), può promuovere l'attivazione di PKB attraverso l'attivazione di recettori tirosin-chinasici.

Il recettore, una volta legato il ligando esterno, attiva una proteina chinasi intracellulare: la fosfatidil inositolo-3-chinasi (PI3K). Tale proteina fosforila il fosfoinositolo-4,5-difosfato (PIP2), trasformandolo in fosfoinositolo-3,4,5- trifosfato (PIP3).

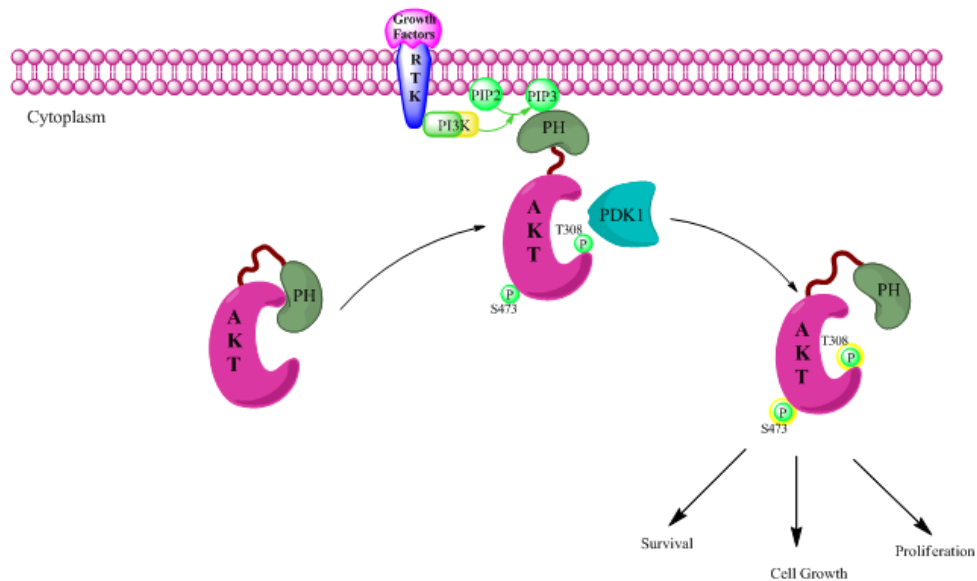
La formazione di PIP3 provoca una migrazione di AKT verso la membrana plasmatica: a questo punto il dominio PH interagisce con il PIP3, portando ad un cambiamento conformazionale della molecola.

Tale cambiamento ha come risultato quello di esporre il sito di fosforilazione sul residuo di treonina 308, situato nel dominio chinasi di AKT, che verrà fosforilato da PDK1, promuovendo la parziale attivazione di AKT.

La completa attivazione di AKT è associata alla fosforilazione del residuo di serina 473<sup>17</sup>, sul dominio carbossi terminale; sebbene il ruolo di PDK1 nella fosforilazione della treonina sia stato ben stabilito, il meccanismo di fosforilazione della serina è invece poco chiaro<sup>18</sup>.

L'attività di AKT è regolata negativamente da una fosfatasi lipidica (PTEN), che inibisce l'azione di PI3K, defosforilando PIP3 a PIP2.

Una volta attiva, AKT si dirige verso il citoplasma, dove sarà in grado di fosforilare diverse proteine substrato.



**Fig.2:** Rappresentazione schematica dell'attivazione della via PI3K/AKT

## **PROCESSI CELLULARI REGOLATI DA PKB/AKT**

Le isoforme di AKT contribuiscono ad una serie di risposte cellulari diverse, incluse la crescita, la sopravvivenza e il metabolismo cellulare. Questa molteplicità di funzioni potrebbe essere dovuta alla variabilità e specificità dei suoi substrati. Fino ad ora, più di 50 proteine sono state identificate come possibili substrati per AKT<sup>11</sup>.

### **❖ REGOLAZIONE DEL CICLO E DELLA CRESCITA CELLULARE**

Promuovendo la progressione del ciclo cellulare, la sintesi proteica e la sintesi del glicogeno, AKT è un importante mediatore della proliferazione cellulare, in quanto agisce su elementi proteici che costituiscono il sistema di controllo del ciclo cellulare.

Il primo substrato fisiologico identificato fu GSK3 (Glycogen synthase kinase-3)<sup>19</sup>. GSK3 fosforila e inattiva la glicogeno sintasi in risposta a stimolazioni da parte dell'insulina. Si tratta di una proteina associata alla regolazione del metabolismo del glucosio, ma è stato osservato un suo addizionale ruolo nella proliferazione cellulare.

Entrambe le isoforme (GSK3 $\alpha$  e  $\beta$ ) hanno il sito di fosforilazione nella regione ammino-terminale (Ser21 e Ser9, rispettivamente), ed esse sono fosforilate ed inattivate da AKT, causando la stabilizzazione e la traslocazione nucleare di  $\beta$ -

catenine, le quali aumentano la trascrizione di geni (inclusa la ciclina D1) coinvolti nella progressione del ciclo cellulare<sup>20</sup>. In aggiunta all'aumento di trascrizione, l'inattivazione di GSK3 stabilizza la ciclina D1, inibendone la degradazione<sup>21</sup>.

La fosfodiesterasi 3B (PDE3B) viene fosforilata da AKT sulla Ser273; ciò causa un'attivazione enzimatica di PDE3B, la quale contribuisce alla regolazione enzimatica dei livelli intracellulari di nucleotidi ciclici, quali cAMP e cGMP, in risposta all'insulina<sup>22</sup>.

Un substrato di AKT, identificato di recente, è p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor); esso normalmente funziona nel nucleo, dove inibisce la replicazione del DNA. AKT fosforila p21 sulla treonina45, con il risultato di una sua inattivazione ed esclusione dall'interno del nucleo<sup>23</sup>.

Un altro bersaglio è p27/KIP1, diretto inibitore di cdk2 (cyclin-dependent kinase 2), che viene regolato da AKT. In questo caso, AKT riduce la trascrizione di p27 fosforilando e inattivando i componenti di una famiglia di fattori di trascrizione, chiamati Forkhead (FOXO)<sup>24</sup>.

Il controllo di AKT sul ciclo cellulare può avvenire anche tramite l'inibizione dei fattori trascrizionali FOXO, che nel nucleo sono in grado di regolare l'espressione dei geni che promuovono l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (come lo stesso p27KIP1) o regolando l'espressione delle cicline D1 e D2.

In risposta ai fattori di crescita, la via AKT attiva anche mTOR (mammalian target of Rapamycin), che appare come maggior substrato di AKT.

mTOR è una serina/treonina chinasi che promuove la crescita attraverso un aumento della sintesi proteica, inducendo, inoltre, la biogenesi del ribosoma<sup>25</sup>. AKT può fosforilare mTOR sulla serina2448 ed attivarla<sup>26</sup>. mTOR, a sua volta, controlla S6K1, una chinasi fisiologica per la proteina ribosomiale S6, la cui attivazione fa aumentare la quota di mRNA che entra nel ribosoma.

#### **❖ BERSAGLI ANTI-APOPTOTICI**

AKT è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare in quanto tra i suoi substrati proteici, sia diretti che indiretti, figurano diverse proteine coinvolte nel processo apoptotico.

Il primo bersaglio anti-apoptotico di AKT identificato è BAD (Bcl-2/Bcl-X antagonist)<sup>27</sup>.

BAD è un membro della famiglia di proteine Bcl-2, che iniziano il processo apoptotico legandosi a Bcl-XL all'esterno della membrana mitocondriale, causando il rilascio del Citocromo C nel citosol. AKT fosforila BAD sulla serina 136<sup>28</sup>: tale fosforilazione inibisce la formazione del complesso tra BAD e la proteina apoptotica Bcl-2/Bcl-XL.

Il rilascio di Bcl-2/Bcl-XL blocca la liberazione del Citocromo C da parte del mitocondrio disattivando il processo dell'apoptosi<sup>5</sup>.

Inoltre, AKT può fosforilare e inattivare la proteasi Caspasi-9, un'altra proteina pro-apoptotica, substrato della chinasi. Il sito di fosforilazione sulla Caspasi-9 (Ser196) è presente nella caspasi-9 degli uomini, ma non nella caspasi-9 di ratti, topi o scimmie<sup>29</sup>. Per questo motivo, il ruolo della caspasi-9 nell'attività anti-apoptotica di AKT è ancora da chiarire.

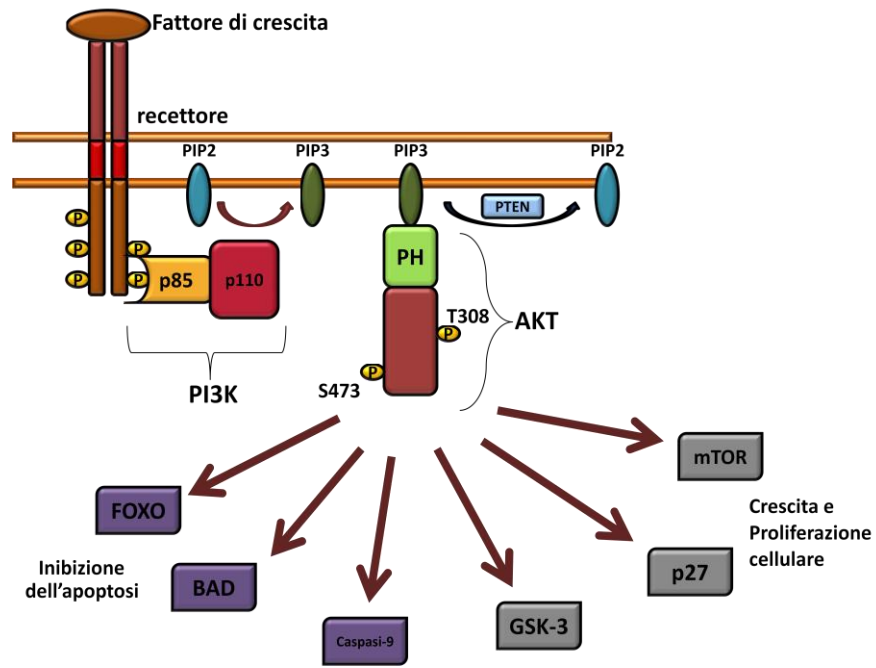
La fosforilazione dei fattori di trascrizione FOXO (FOXO1, FOXO3 e FOXO4) inibisce la loro abilità di indurre l'espressione di vari geni pro-apoptotici e geni inibitori del ciclo cellulare<sup>5</sup>.

Un'ulteriore azione di AKT è quella a carico della proteina p53: il soppressore del tumore p53 agisce come sensore agli stress cellulari, traducendo i segnali di stress in segnali apoptotici<sup>30</sup>.

Promuovendo la degradazione di p53, AKT danneggia la risposta allo stress cellulare aumentando la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Un altro substrato di AKT è l'eNOS (endothelial nitric oxide synthase), responsabile della produzione di NO, uno dei maggiori vasodilatatori<sup>31</sup>.

AKT fosforila eNOS sulla serina 1177, con il risultato di una sua attivazione enzimatica, che influenza l'angiogenesi tumorale e controlla la pressione sanguigna sistemica<sup>32</sup>.



**Fig.3:** Meccanismo di azione di AKT ed effetti biologici della sua attivazione

## COMPONENTI DELLA VIA PI3K/AKT

### PI3K

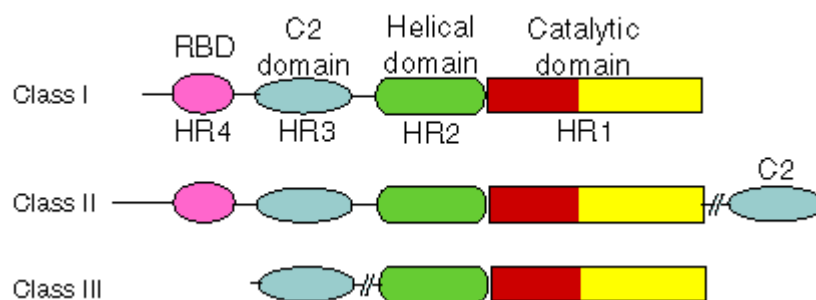
Le fosfatidil inositolo-3 chinasi (PI3K), costituiscono una famiglia di chinasi lipidiche, caratterizzate dalla capacità di fosforilare l'anello inositolico sul gruppo 3'-OH<sup>33</sup>. Gli otto membri della famiglia delle PI3K sono classificate in tre gruppi (classe I, II e III), basati sui domini proteici che le costituiscono. I membri della classe I sono i meglio caratterizzati; ne esistono quattro isoforme ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ), le quali convertono PIP2 in PIP3, e che sono associate alla carcinogenesi.

La classe I è ulteriormente suddivisa in due sottoclassi:

- Classe IA
- Classe IB

Le proteine appartenenti alla classe IA sono costituite da tre subunità catalitiche (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  e p110 $\delta$ ), che formano etero dimeri con uno dei cinque domini regolatori (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ , p50 $\alpha$  e p55 $\alpha$ ). Le PI3K della classe IA sono attivate dai recettori tirosin chinasi.

Le proteine della classe IB sono costituite dalla subunità catalitica p110 $\gamma$  associata ad una subunità regolatrice p101 e vengono attivate da recettori di membrana associati a proteine G<sup>34</sup>.



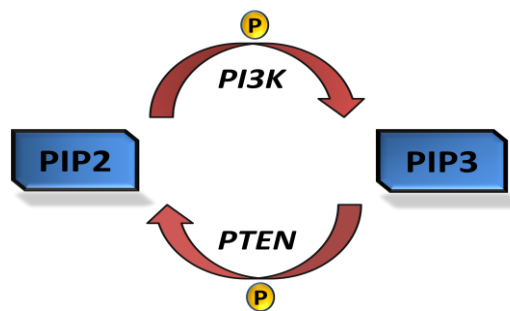
**Fig.4:** Struttura delle classi di PI3K

## PTEN

L'attività di AKT è negativamente regolata dal soppressore del tumore PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), una fosfatasi con attività duale su lipidi e proteine, che fu originariamente identificata come gene soppressore del tumore.

Il suo substrato lipidico fisiologico principale è PI(3,4,5)P, prodotto da PI3K; PTEN defosforila l'inositolo in posizione 3' e, in questo modo, agisce come regolatore negativo della via PI3K/AKT. La funzione di PTEN è richiesta per un normale sviluppo cellulare e la sua perdita contribuisce alla cancerogenesi.

PTEN è frequentemente alterato in stadi avanzati di diversi tumori, in particolare nel glioblastoma multiforme, nei tumori della prostata endometriale e renale<sup>2</sup>.



**Fig.5:** Reazione catalizzata da PI3K e PTEN.

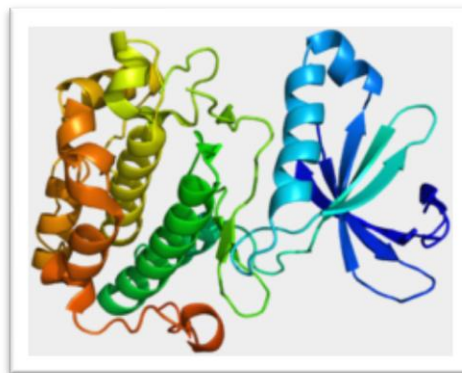
## PDK1

La 3-fosfoinositide-dipendente chinasi 1 (PDK1) è un enzima di 556 amminoacidi composto da tre motivi diversi: un dominio N-terminale, un dominio serina/treonina chinasi costitutivamente attivato ed un dominio PH carbossi-terminale<sup>35</sup>.

A differenza di PI3K e AKT, nell'uomo è stata segnalata solo un'isoforma di PDK1. L'interesse di PDK1 come potenziale anticancerogeno è legato alla sua abilità di fosforilare una diversa serie di chinasi, membri della famiglia delle AGC, in particolare le tre isoforme di AKT<sup>36</sup>.

La fosforilazione del residuo di treonina, nella zona di attivazione, delle tre isoforme è svolta da PDK1 a livello della membrana plasmatica. Insieme ad AKT, altri membri della famiglia delle AGC, incluse S6K1 (p70 ribosomal S6 kinase), SGK (serum-and glucocorticoid-induced protein kinase) e PKC, sono fosforilate ed attivate da PDK1<sup>37</sup>. Per AKT è necessaria una co-localizzazione con PDK1 per la fosforilazione della treonina 308, mediata dall'aumento di PIP3, prodotto da PI3K. In contrasto con AKT, le altre chinasi sono fosforilate nel citosol.

Il dominio PH di PDK1 lega i 3-fosfoinositidi con maggior affinità del dominio PH di PKB $\alpha$ <sup>38</sup>, il che è coerente con l'osservazione che PDK1 è già situata a livello della membrana plasmatica nelle cellule a riposo. Ciò suggerisce che PDK1 è una chinasi costitutivamente attiva e che la sua azione non è stimolata dai fattori di crescita<sup>39</sup>.



**Fig.6:** Struttura PDK1



## **RUOLO DI AKT NEL CANCRO**

Nel cancro, la via PI3K/AKT è spesso attivata in modo aberrante; ciò è dovuto a alterazioni genetiche ed epigenetiche.

Le diverse alterazioni possono essere a carico dei vari componenti della via di trasduzione: PI3K, PTEN, AKT e mTOR.

Amplificazioni genetiche o mutazioni di *PI3KCA*, che codifica per la subunità catalitica p110 di PI3K, sono state osservate in diversi tipi di tumore, (i.e. tumore alle ovaie, al colon-retto, al seno e al cervello)<sup>40</sup>. Queste aberrazioni genetiche hanno come risultato un aumento delle funzioni enzimatiche, un'attivazione dei segnali di AKT con conseguenti trasformazioni oncogeniche<sup>41</sup>.

L'attività di PI3K è inibita da PTEN, attraverso la defosforilazione del fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3), il segnale lipidico prodotto dalla classe I delle PI3K.

Nessuna modificazione o mutazione del gene AKT è stata trovata nei mammiferi. Tuttavia, diversi studi hanno riscontrato amplificazioni di AKT nei tumori umani. Il primo lavoro di ricerca, che descrive AKT come potenziale oncogene umano, ha individuato AKT1 nel carcinoma gastrico.

Amplificazioni del gene AKT2 sono state trovate in tumori maligni di ovaie, pancreas, seno e stomaco<sup>42</sup>.

Dato che la via PI3K/AKT è alterata in diversi tipi di tumori, si suppone che gli inibitori sviluppati contro di essa abbiano ampia utilità terapeutica. Molte componenti di questo "pathway" sono chinasi, pertanto sono bersagli ideali per lo sviluppo di piccole molecole inibitrici, che vadano a bloccare la loro attività alterata. Bloccando la via PI3K/AKT, si può, simultaneamente, inibire la proliferazione e la crescita delle cellule tumorali e sensibilizzarle alla morte cellulare.

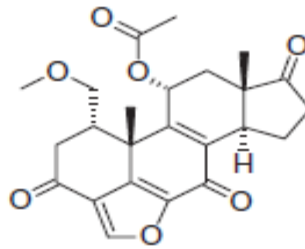
## **FARMACI INIBITORI DELL'ASSE PI3K/AKT/mTOR**

### ➤ **INIBITORI PI3K**

Due degli inibitori più conosciuti di PI3K sono: Wortmannin<sup>43</sup> e LY294002<sup>44</sup>. Questi due composti bloccano l'attività enzimatica di PI3K attraverso differenti meccanismi.

Wortmannin è un metabolita micotico, inibitore irreversibile, che forma legami covalenti tra la subunità catalitica p110 e un residuo di lisina, coinvolto nella reazione di legame col fosfato<sup>45</sup>.

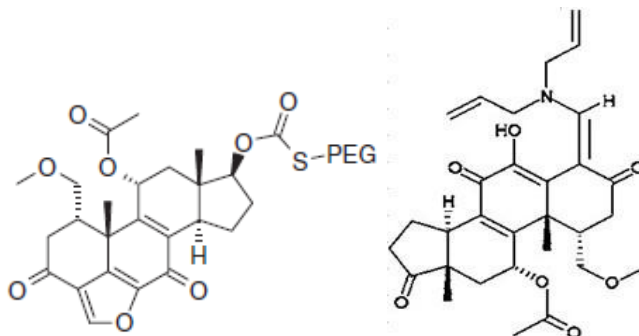
L'uso di wortmannin è stato limitato a studi pre-clinici a causa dei suoi effetti tossici, delle scarse proprietà farmaceutiche e della mancanza di selettività per le isoforme della classe I delle PI3K<sup>44</sup>. Un altro svantaggio nell'utilizzo di wortmannin è la sua scarsa solubilità in ambiente acquoso e ciò ne limita l'impiego terapeutico.



**Fig.7:** Struttura wortmannin

Ulteriori studi di questa molecola hanno portato allo sviluppo di alcuni suoi derivati:

- PWT-458, ha dimostrato alti indici terapeutici<sup>46</sup>;
- PX-866, un derivato viridinico semi-sintetico, con miglior stabilità e ridotta epatotossicità<sup>47</sup>;

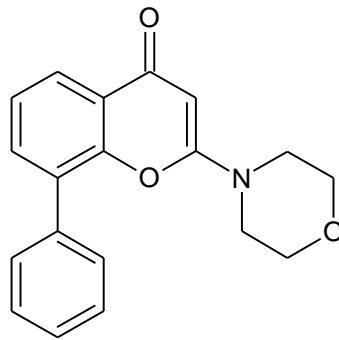


**Fig.8:** Strutture di PWT-458 e di PX-866

Il derivato flavonoide, LY294002, è un inibitore competitivo e reversibile del sito di legame di PI3K per l'ATP. Diversi studi, *in vitro*, hanno mostrato che LY294002, da solo, ha attività antiproliferativa e pro-apoptotica.

Come per il wortmannin, la combinazione di LY294002 con alcuni farmaci citotossici e con le radiazioni, incrementano il suo effetto terapeutico<sup>48</sup>.

Gli inibitori di PI3K danno risultati significativi come antitumorali in neuroblastoma, mieloma, carcinomi del colon e del rene.



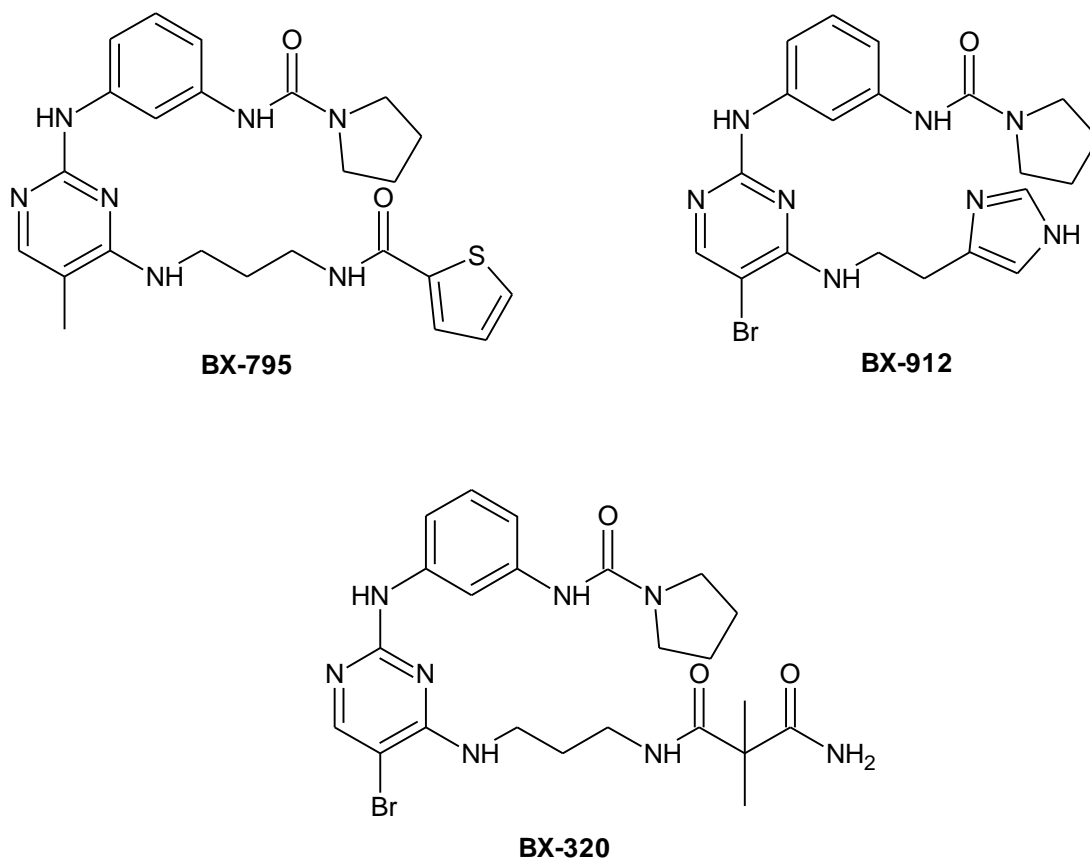
**Fig.9:** Struttura di LY294002

## ➤ INIBITORI PDK1

La chinasi fosfoinositide dipendente di tipo 1 è la proteina responsabile della fosforilazione di AKT sulla Thr308, che porta ad una sua attivazione. Per questo motivo, inibitori di PDK1 possono bloccare in modo significativo l'azione di AKT.

Recentemente, sono stati identificati tre potenti inibitori di PDK1, BX-795, BX-912 e BX-320, a struttura amminopirimidinica. Tali inibitori bloccano PDK1 nelle cellule tumorali, dando come risultato un'inibizione della crescita e l'induzione dell'apoptosi<sup>49</sup>.

Gli effetti di BX-320, sulla crescita di cellule cancerogene, sia *in vivo* che *in vitro*, indicano che gli inibitori di PDK1 possono avere utilità clinica come agenti anticancerogeni<sup>18</sup>.

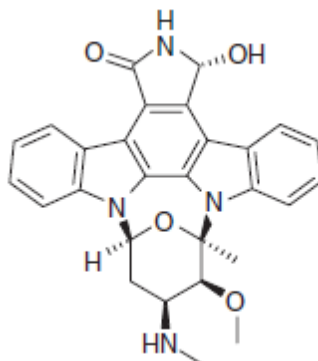


**Fig.10:** Strutture di BX-795, BX-912 e BX-320

Uno dei più potenti, inibitori di PDK1 è UCN-01 (7-hydroxy-staurosporine)<sup>50</sup>. Questo composto, derivato della staurosporina, isolato da colture di *Streptomyces*, fu originariamente sviluppato come inibitore della proteina chinasi C. Analisi strutturali mostrarono che la staurosporina e UCN-01 formano complessi col dominio chinasi di PDK1. Sebbene entrambi i composti siano in grado di interagire col sito attivo di PDK1 in maniera del tutto simile, il gruppo 7-idrossi di UCN-01, che non è presente nella staurosporina, genera legami a idrogeno con i residui del sito attivo.

UCN-01 inibisce un ampio range di proteine chinasi, inclusi altri membri della famiglia delle AGC<sup>51</sup>.

UCN-01 è stato testato nelle fasi cliniche I e II, sia come singolo agente, sia in combinazione con altri farmaci chemioterapici convenzionali (ad esempio fludarabina e topotecan), ma non sono state riportate significative attività antitumorali<sup>52</sup>.



**Fig.11:** Struttura di UCN-01

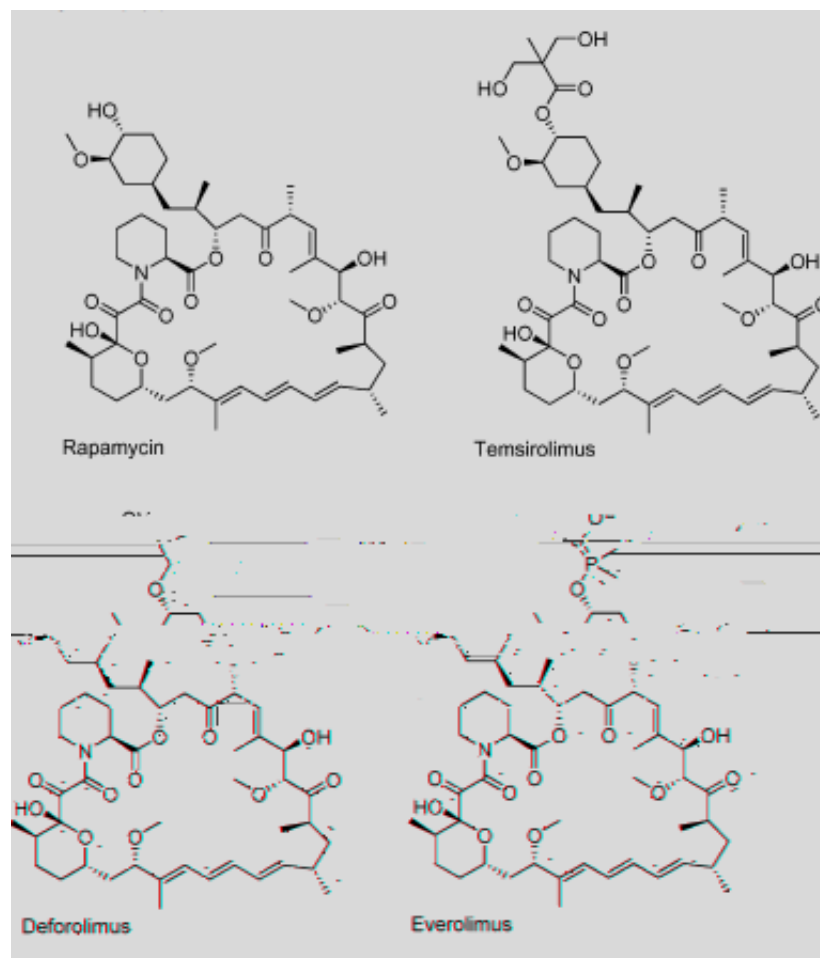
## ➤ INIBITORI mTOR

Essendo mTOR il maggiore substrato a valle della via PI3K/AKT, una nuova strategia alternativa è quella dello sviluppo di inibitori di questa chinasi.

Rapamicina (sirolimus) ed i suoi analoghi Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD-001) e Deforolimus (AP23537) si legano con le proteine FKBP-12 e formano complessi che inibiscono mTOR<sup>53</sup>.

Questi composti possiedono attività anti-proliferativa ed antitumorale, come singoli agenti, sia *in vivo* che *in vitro*; dimostrano anche elevata attività in combinazione con i chemioterapici convenzionali, ad esempio paclitaxel, e con agenti ormonali, come il tamoxifene<sup>54</sup>.

La rapamicina è un antibiotico macrolide prodotto da *Streptomyces hygroscopicus*; può essere usato da solo o in combinazione con la ciclosporina, come immunosoppressore per prevenire il rigetto renale dopo un trapianto<sup>18</sup>. Studi di fase 1 sui tre analoghi della rapamicina hanno dimostrato che sono generalmente ben tollerati.



**Fig.11:** Struttura della rapamicina e dei suoi derivati

## ➤ INIBITORI AKT

Tutte le tre isoforme di AKT sono implicate nella formazione dei tumori; non è ancora del tutto chiaro se l'inibizione di una specifica isoforma sia sufficiente a garantire una buona efficacia terapeutica.

Sono state sviluppate alcune classi chimiche di molecole inibitrici di AKT, con diversa efficacia e specificità per le differenti isoforme, tali classi includono:

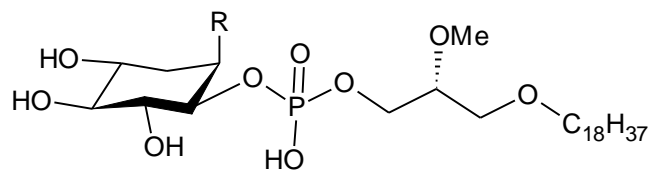
- inibitori a struttura fosfatidil-inositolo simile (antagonisti del dominio PH)
- inibitori ATP-competitivi (antagonisti del sito chinamico)
- inibitori allosterici<sup>18</sup>.

### ***INIBITORI A STRUTTURA FOSFATIDIL INOSITOLO SIMILE***

Per l'attivazione di AKT è richiesto il legame tra il dominio PH, di AKT e PDK1, con il fosfatidil-inositolo-3,4,5-trifosfato, pertanto la nascita di analoghi del PIP3 potrebbe essere un ragionevole approccio per lo sviluppo di inibitori di AKT. Questo tipo di inibizione previene il legame tra il PIP3 e il dominio PH, bloccando l'attivazione delle chinasi.

Un recente studio ha esaminato 24 analoghi lipidici modificati del fosfatidilinositol etere (PIAs) ed ha riscontrato che 5 di loro (ad esempio PIA5 e 6), con modificazioni su 2 siti dell'anello inositolico, inibiscono AKT<sup>55</sup>.

I PIAs riducono la fosforilazione di alcuni substrati di AKT senza coinvolgere le chinasi a monte, PI3K e PDK1.

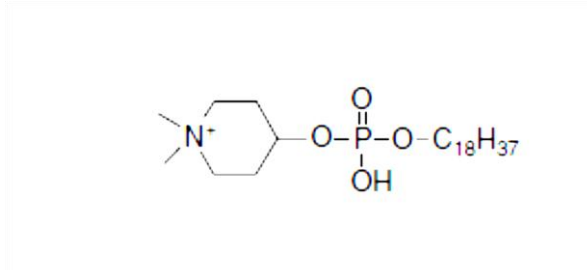


**R=OMe, PIA5**

**R=H, PIA6**

**Fig.13:** Struttura degli inibitori PIAs

Un altro composto appartenente a questa classe di inibitori, è la perifosina, un nuovo alchilfosfolipide, conosciuto come inibitore delle CDK (chinasi ciclina dipendenti) che previene la migrazione di AKT verso la membrana cellulare e che dimostra una significativa attività anti-proliferativa, sia *in vivo* che *in vitro*, in diversi modelli di tumore<sup>56</sup>.



**Fig.14:** Struttura della perifosina

Per questo composto sono stati osservati effetti sinergici con i chemioterapici convenzionali<sup>57</sup>, ed effetti citotossici su alcune linee cellulari tumorali, in particolare nel carcinoma della laringe, nel cancro al seno, nei tumori del colon e della prostata. Malgrado questi promettenti studi pre-clinici, risultati clinici sperimentali della fase I e della fase II, della perifosina, su un ampio range di tumori, sono stati deludenti, con una modesta risposta<sup>58</sup>. Al termine di studi di fase II in pazienti in stadio avanzato di tumore pancreatico, è stata rilevata una certa tossicità gastrointestinale<sup>59</sup>.

Vista la poca efficacia osservata con una mono-terapia della perifosina in molti tipi di tumore, è stato deciso di combinare questo farmaco con chemioterapici, radiazioni e altri agenti antitumorali, in modo da aumentare la citotossicità e di superare la farmaco resistenza. Studi di fase I hanno confermato la sicurezza di questa combinazione con i diversi agenti, incluse radiazioni, gemcitabina, sunitinib e sorafenib<sup>60</sup>.



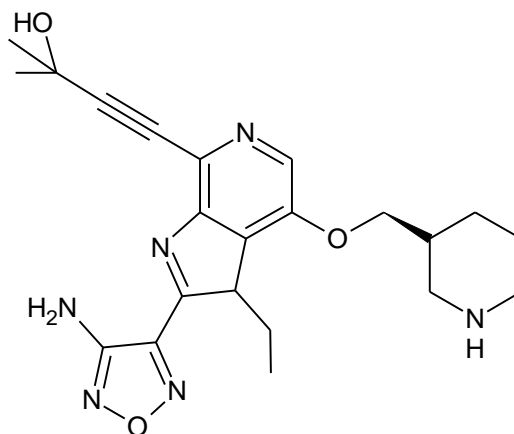
**INIBITORI ATP-COMPETITIVI**

Questa classe di inibitori agisce principalmente sul sito chinasi di AKT; infatti con la delucidazione della sequenza e della struttura di tale sito attivo e dei complessi che i ligandi ATP-competitivi formano con i residui amminoacidici della chinasi, ha permesso di sviluppare inibitori più selettivi.

Tale sviluppo non si ha solo nel caso delle chinasi, che divergono nella struttura primaria, ma anche per quelle isoforme con simile struttura e siti di legame per l'ATP.

Esistono molte analogie tra il sito di legame per l'ATP di AKT, PKA e PKC, alcuni degli inibitori tipici di PKA e PKC sono stati identificati anche come inibitori di PKB<sup>61</sup>.

GSK690693 è un esempio di inibitore competitivo; esso è selettivo per tutte e tre le isoforme di AKT ed ha mostrato attività antiproliferativa sia *in vivo* che *in vitro*, mentre induce apoptosi *in vitro*.



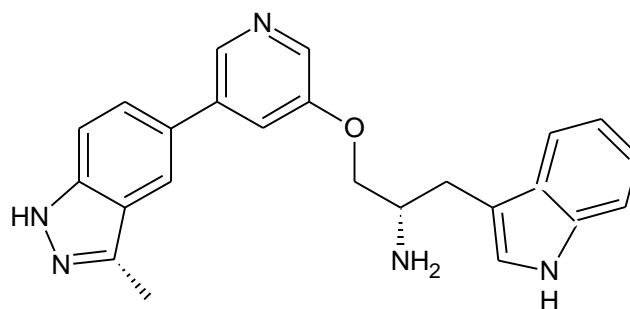
**Fig.15:** Struttura di GSK690693

Altri inibitori ATP-competitivi sono AT13148 e A-443654.

AT13148 inibisce la via di AKT sia *in vivo* che *in vitro*, è disponibile per via orale e inibisce la crescita tumorale *in vivo*<sup>62</sup>.

Esso inibisce inoltre l'AGC chinasi ROCKII e PKA a simili concentrazioni.

A-443654 è un inibitore che ha uguale potenza sulle tre isoforme di AKT, inibisce inoltre altre proteine appartenenti alla famiglia delle AGC chinasi, come p70S6, PKA e la chinasi Rho.



**Fig.16:** Struttura di A-443654

### ***INIBITORI ALLOSTERICI***

Recenti studi hanno permesso di identificare nuovi inibitori allosterici della chinasi AKT; tali inibitori dimostrano un livello di specificità senza precedenti. Essi non sono solo specifici per tutte le altre chinasi, ma anche per le tre isoforme di AKT<sup>63</sup>.

I bersagli di questi inibitori sono AKT1, AKT2 o entrambi, e sono stati chiamati AKTi-1, AKTi-2 e AKTi-1,2, rispettivamente.

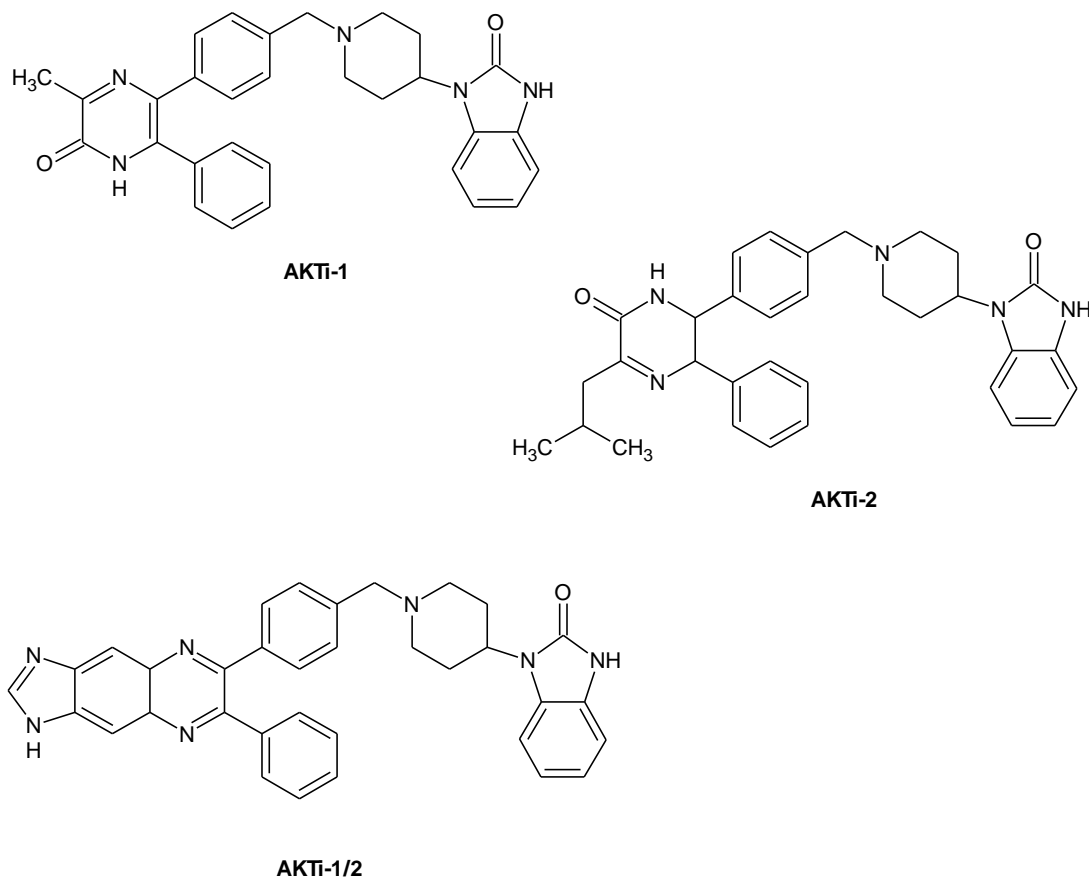
Oltre all'inibizione dell'attività chinasica, gli inibitori allosterici bloccano la fosforilazione e l'attivazione, da parte di PDK1, delle corrispondenti isoforme di AKT.

AKTi-1, AKTi-2 e AKTi-1,2 sono inibitori reversibili, ma non hanno effetti inibitori sulle isoforme mutate di AKT, ossia su quelle a cui manca il dominio PH. Infatti il legame con le chinasi non avviene se non c'è tale dominio.

Il legame tra le chinasi e l'inibitore allosterico promuove la formazione di una conformazione inattiva della proteina, la quale non verrà fosforilata da PDK1.

Per quanto riguarda questi inibitori, sono state fatte osservazioni interessanti:

- ✓ Essi sensibilizzano le cellule tumorali, ma non le cellule normali, agli stimoli apoptotici, e ciò è fondamentale per una terapia contro il cancro.
- ✓ Gli inibitori allosterici hanno ampia attività chemiosensibilizzante. Quando vengono usati come singoli agenti, gli inibitori duali di AKT1 e 2 (AKTi-1/AKTi-2 o AKTi-1,2) mostrano un'attività proapoptotica limitata, mentre in associazione con agenti chemioterapici dimostrano un'attività più elevata<sup>18</sup>.



**Fig.17:** Struttura degli inibitori allosterici AKTi-1, AKTi-2, AKTi-1/2

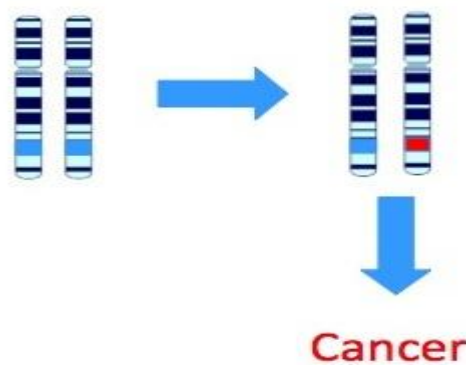
Sebbene AKTi-1, AKTi-2 e AKTi-1,2 abbiano mostrato un grande potenziale farmacologico nei confronti di AKT, sono stati richiesti ulteriori test, sulla loro efficacia antitumorale, negli animali.

Sono stati effettuati, infatti, studi farmacodinamici sui topi per determinare se AKTi-1,2 può inibire la fosforilazione di AKT anche *in vivo*.

Questi esperimenti dimostrano che AKTi-1,2 inibisce la fosforilazione di AKT1 e AKT2, ma non ha effetti su AKT3. Non possono essere condotti studi addizionali, *in vivo*, data la poca solubilità e farmacocinetica del composto<sup>64</sup>.

***INTRODUZIONE ALLA PARTE  
SPERIMENTALE***

Il processo di carcinogenesi, spesso, è il risultato di danni chimici o fisici a carico del genoma: la perdita di regolazione è il risultato di geni alterati, mutazioni, delezioni o duplicazioni sia dei segnali di crescita autocrini, coinvolti nella comunicazione tra cellula e cellula, sia dei fattori che controllano il ciclo cellulare (ad esempio una diminuzione dei geni soppressori dei tumori, quali p53 e PTEN, o un aumento di oncogeni come Ras, PKB o ABL).



**Fig.1:** Mutazione cromosomica

I tradizionali trattamenti del cancro consistono nella rimozione chirurgica delle cellule maligne, seguita da radioterapia e chemioterapia, le quali risultano molto tossiche e possono causare gravi effetti collaterali.

Recenti ricerche, dimostrano come si abbiano trattamenti più efficaci con l'uso di agenti chemioterapici che legano direttamente e inattivano i fattori di controllo del ciclo cellulare, come avviene ad esempio per l'inibizione dell'oncogene ABL da parte del Gleevec. In questo modo il danno riportato dalle cellule sane rispetto a quelle tumorali diminuisce e gli effetti collaterali sono meno gravi<sup>65</sup>.

Esempi di questi agenti chemioterapici sono gli inibitori della via PI3K/AKT/mTOR. Tale via di trasduzione ha una funzione critica nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo, inoltre è correlata con la resistenza alla radioterapia, chemioterapia, terapia endocrina e nuove terapie antitumorali<sup>66</sup>. Per questo motivo, tale via di trasduzione sembra avere tutte le caratteristiche per essere un buon target di una terapia contro il cancro.

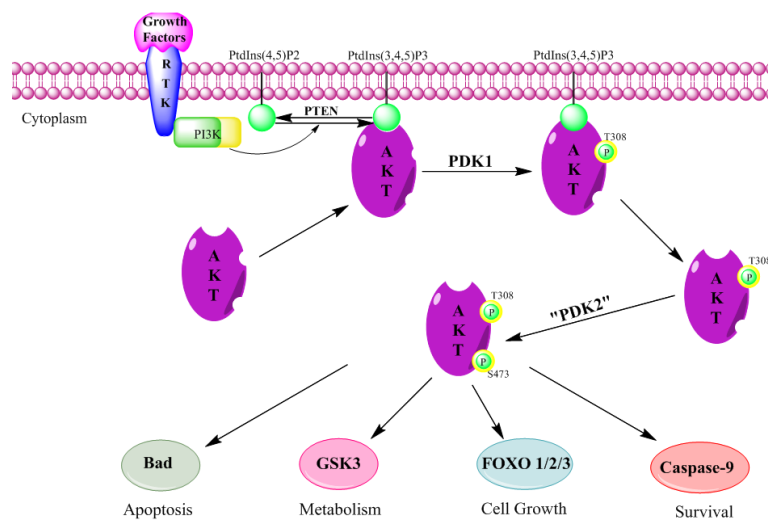
AKT o PKB è una serina-treonina chinasi appartenente alla famiglia di chinasi AGC; la cui inibizione stimola l'apoptosi in differenti tipi di cellule.

L'enorme potenziale terapeutico della via AKT è sottolineato anche dal fatto che questo enzima, oltre ad essere attivato in numerose forme tumorali (glioblastoma, tumore al polmone), contribuisce alla progressione della patologia e all'insorgere della farmaco-resistenza.



**Fig.2:** struttura di Akt1

In seguito all'aumento dei livelli di PIP3 (ad opera di PI3K), AKT migra dal citosol verso la membrana plasmatica; l'interazione tra il dominio PH di AKT e il PIP3, provoca un cambiamento conformazionale della chinasi, con il risultato dell'esposizione dei due siti di fosforilazione, treonina 308 e serina 473, da parte di PDK1 e PDK2, rispettivamente. PDK1 fosforila AKT sulla treonina 308, situata nel dominio chinamico, promuovendone la parziale attivazione. Per la completa attivazione è necessaria anche la fosforilazione della serina 473, localizzata nel dominio carbossi terminale.

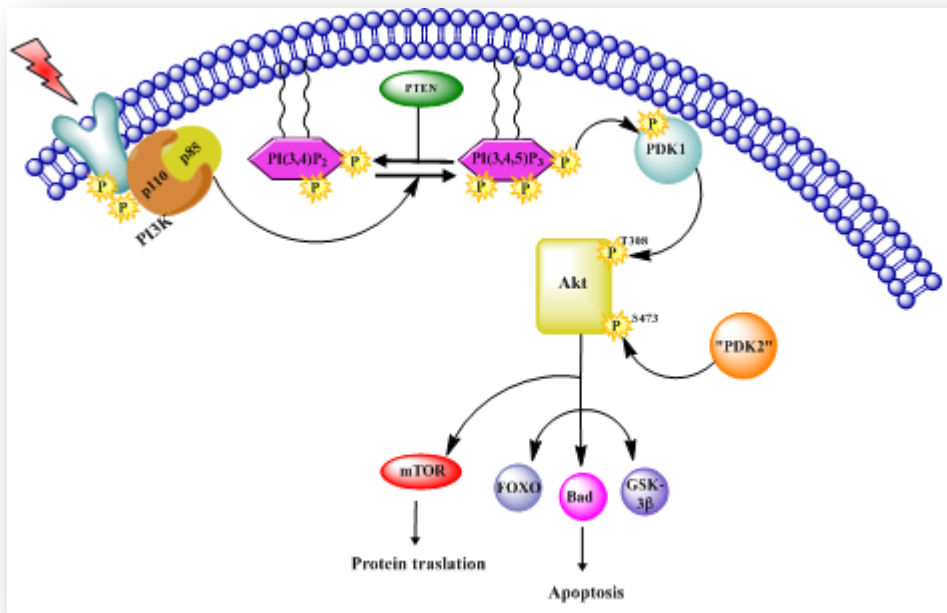


**Fig.3:** Schema dell'attivazione di AKT e dei suoi bersagli cellulari.

A seguito della sua completa attivazione, AKT fosforila numerosi substrati implicati nella crescita, proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Le cellule utilizzano diversi meccanismi per regolare l'attività di AKT: la fosfatasi lipidica PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) riduce i livelli intracellulari di PIP3, prevenendo così l'attivazione di AKT.

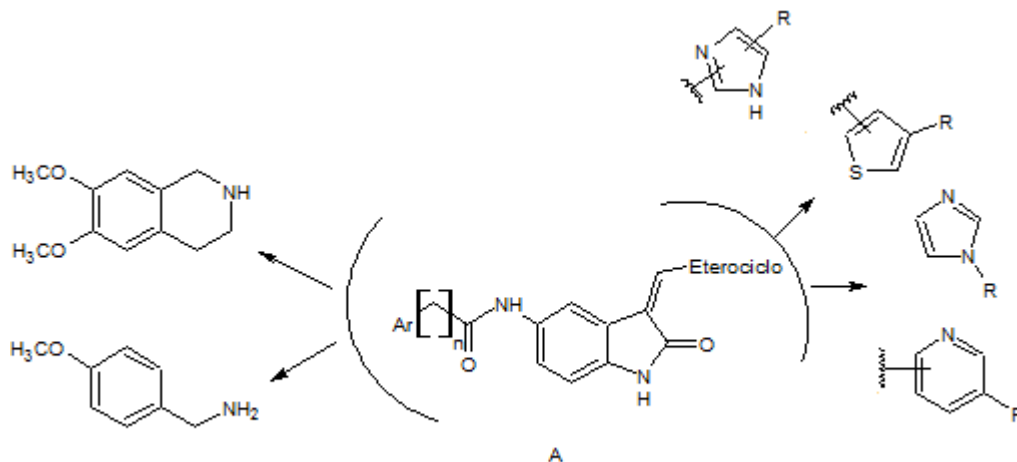
L'azione di AKT risulta aumentata in tumori in cui il soppressore del tumore PTEN è mutato. In assenza delle funzioni svolte da PTEN, le cellule dimostrano un'elevata attività di AKT e sono meno sensibili agli stimoli apoptotici<sup>67</sup>.



**Fig.4:** Schema della via PI3K/AKT/PDK1 ed effetti biologici della sua attivazione.

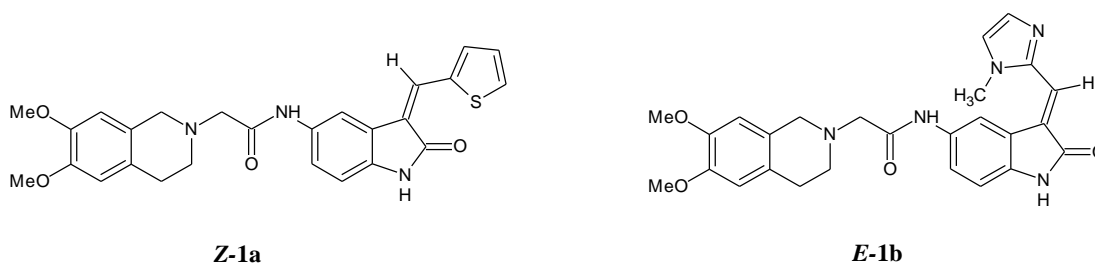
Negli ultimi anni la ricerca di molecole capaci di interagire con i bersagli farmacologici, presenti in questo complesso sistema di trasduzione del segnale, ha portato allo sviluppo di inibitori che hanno come target le chinasi PI3K, PDK1 e AKT. Promettenti candidati sono gli inibitori lipidici che competono con il PIP3 nel legarsi al dominio PH di AKT, tra cui la perifosina (in fase di studi clinici I e II), gli inibitori del sito chinamico ATP-competitivi e gli inibitori allosterici.

Nel laboratorio presso il quale ho svolto questo lavoro di tesi, è stata intrapresa la progettazione e sintesi di nuove molecole a struttura 2-ossi-indolica A, che sono risultate capaci di inibire la via di AKT.



**Fig.5:** Struttura generale dei composti indolonici di tipo A

La valutazione in vitro di questi composti su linee cellulari di cancro al polmone A549 (carcinoma bronco alveolare umano) e HCC827 (adenocarcinoma polmonare umano) ha permesso di identificare i derivati **1a** e **1b** come lead per l'ulteriore sviluppo chimico farmaceutico di nuovi ligandi capaci di interagire con tale pathway.



**Fig.6:** Strutture dei composti **1a** e **1b**

In particolare, è stato dimostrato che il composto **1a** è in grado di:

- Ridurre la fosforilazione della Thr308 e della Ser473, necessarie per l'attivazione di AKT;

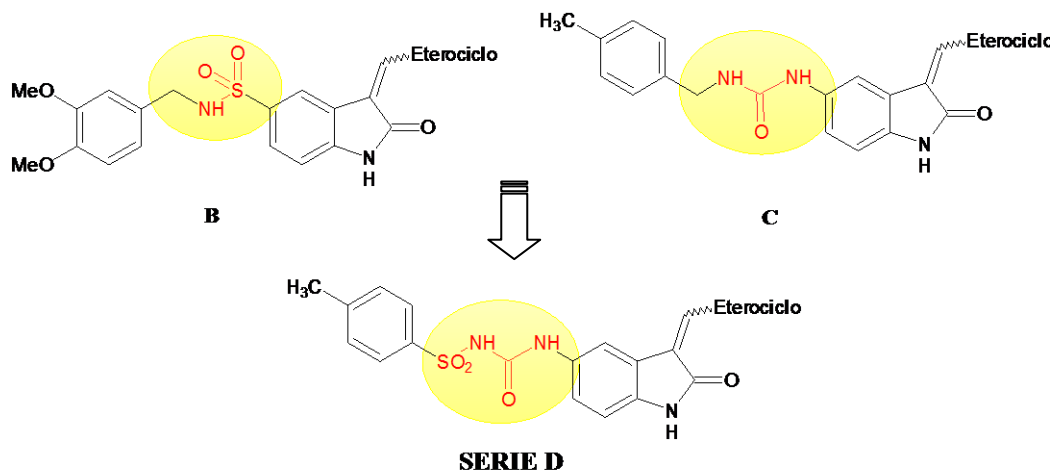


- Interferire con il ciclo cellulare nelle cellule tumorali attraverso il blocco in fase G1, causando così un aumento della concentrazione di cellule in fase quiescente;
- Possedere, inoltre, interessanti proprietà citotossiche e proapoptotiche.

Sulla base dei risultati positivi ottenuti con le molecole di tipo A, è stato osservato che la sostituzione della catena arilalchilammidica con catene arilalchilamminosolfoniche (B) e arilalchilureidiche (C) incrementa l'effetto inibitorio di tali composti sulla via AKT/PDK1.

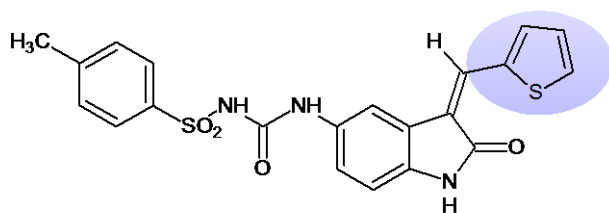
L'obiettivo di questa tesi di laurea è stato quello di approfondire le conoscenze SAR di tali derivati apportando modifiche strutturali a carico della catena presente in posizione 5, andando a coniugare la funzione sulfonammidica con quella ureidica.

Su questa base, sono stati progettati e sintetizzati i composti con struttura indolonica di formula generale D, che presentano in posizione 5 un raggruppamento solfonilureidico.

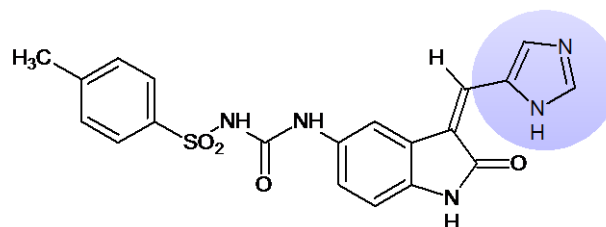


**Fig.7:** Manipolazioni chimiche a carico della posizione 5 del nucleo 2-ossi-indolico

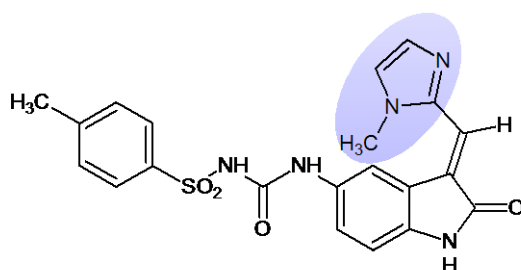
In particolare, i derivati di tipo D, in posizione 3 presentano un sostituito eterociclico aromatico, quale il tiofene per il composto **2a**, l'imidazolo e il metil-imidazolo nel composto **2b** e **2c**, rispettivamente.



**Z-2a**



**Z-2b**



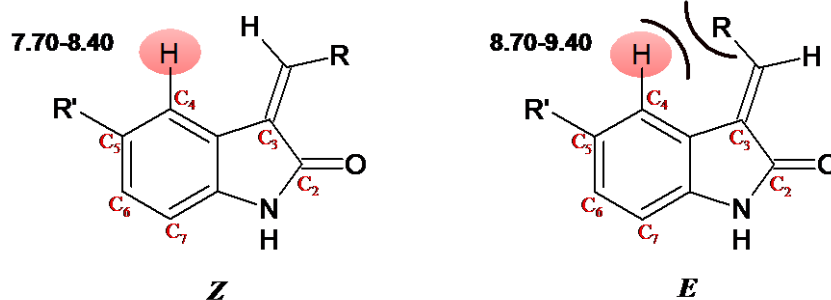
**E-2c**

Il derivati solfonilureidici **2a-c** sono stati sintetizzati seguendo la procedura descritta nello **schema 1**.

Il 5-nitro-2-ossindolo commerciale è stato fatto reagire con l'appropriata aldeide (2-tiofencarbossialdeide, imidazolo-carbossialdeide, 1-metil-5-imidazolo-carbossialdeide) in presenza di EtOH assoluto ed una quantità catalitica di piperidina. La reazione di condensazione, ha fornito gli intermedi **3a-c**, sottoforma di un unico isomero.

Dall'analisi dei dati di NMR, è stato possibile affermare che l'isomero ottenuto per i derivati **3a** e **3b**, è l'isomero *Z* e che per il derivato **3c** è l'isomero *E*.

Tale risultato si evidenzia dai valori di chemical shift dei segnali del protone in posizione 4 dell'indolone.

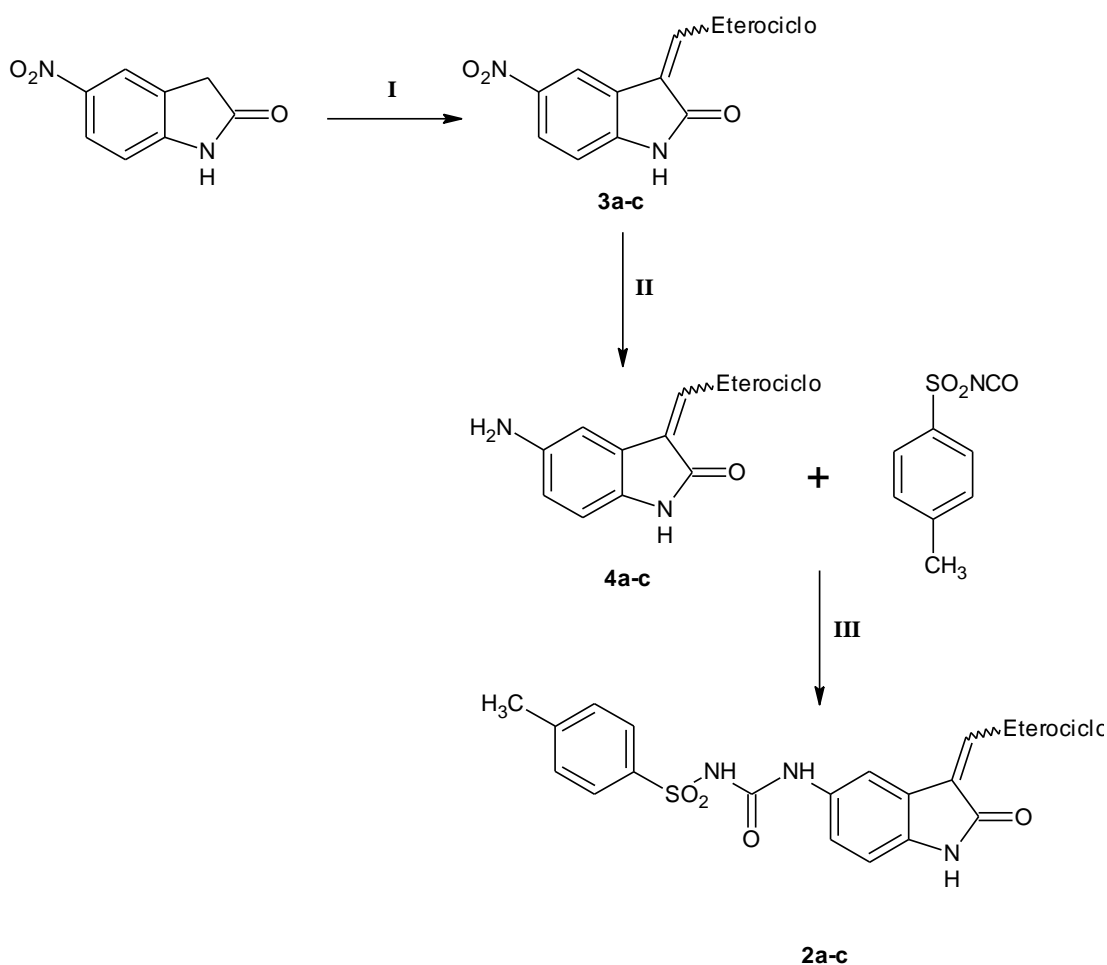


L'isomero *Z* presenta valori di chemical shift compresi nell'intervallo 7.70-8.40 ppm, mentre nell'isomero *E* il protone risuona a valori superiori di 1 ppm rispetto all'intervallo indicato. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura per analoghe strutture di uguale configurazione.

Tali intermedi sono stati ridotti nei corrispondenti derivati amminici (**4a-c**) tramite una reazione di riduzione con idrazina monoidrata e FeCl<sub>3</sub>, in presenza di carbone.

La successiva reazione delle ammine **4a-c**, con *p*-toluen-solfonilisocianato, in MeOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ha condotto ai composti finali **2a-c**.

**SCHEMA 1:**



	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
<b>Ar</b>			

**Reagenti e condizioni:**

**I:** Aldeide appropriata, piperidina, EtOH assoluto, 110°C, 24h.

**II:** NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Carbone, 60°C, MeOH, 24h.

**III:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1), t.a, 1h.

# ***PARTE SPERIMENTALE***

## MATERIALI E METODI

La struttura dei composti è stata controllata per mezzo della spettrometria <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR. Degli spettri <sup>1</sup>H-NMR sono stati riportati i particolari più significativi. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Varian Gemini 200 operante a 200 MHz in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>; i chemical shift  $\delta$  sono espressi in ppm.

I punti di fusione sono stati determinati al microscopio di Kolfler e non sono stati corretti.

Le evaporazioni sono state eseguite sotto vuoto in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Le TLC analitiche sono state effettuate usando lastre MERCK di gel di silice (G60) contenenti un indicatore fluorescente 20.2 mm; le varie macchie sono state evidenziate per mezzo di una lampada UV (256 nm).

Per le cromatografie su colonna è stato usato gel di silice MERCK 70-230 mesh.

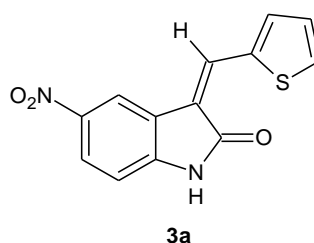
Per la filtrazione su celite è stata usata celite<sup>®</sup> 521.

Per le idrogenazioni è stato usato il generatore d'idrogeno HG 2000 CLAIND<sup>®</sup>.

**PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI  
DERIVATI 5-NITRO-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE 3  
ETEROCICLO SOSTITUITI (3a-c)**

Ad una soluzione di 5-nitro-ossi-indolo commerciale (0,561 mmoli, 100 mg) in EtOH assoluto (10 mL) è stata aggiunta l'opportuna carbossialdeide (0,561 mmoli) ed una quantità catalitica di piperidina. La miscela è stata posta a riflusso per 12 h. Trascorso tale periodo, la reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente; il solido formato è stato separato per filtrazione su setto, lavato con EtOH e lasciato ad asciugare.

**3a:** (3Z)-5-NITRO-3-(TIOFEN-2-ILMETILINDENE)-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE



**C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S**

**P.f= 215-217°C**

**RESA: 82%**

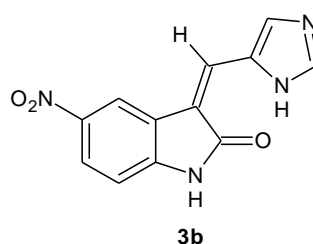
**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 7.02 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Ar); 7.27-7.31 (m, 1H, Ar); 7.99-8.03 (m, 2H, Ar); 8.15 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, Ar); 8.57 (s, 1H, H-vinyl); 8.67 (s, 1H, Ar); 11.31 (br s, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 167.40, 145.60, 141.85, 139.15, 137.00, 136.04, 131.85, 127.81, 125.12, 124.57, 119.18, 115.10, 109.33 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE:

<b>C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	57.35	2,96	10.29
<b>Trov.%</b>	57.02	2.85	10.11

**3b:** (3Z)-3-(1H-IMIDAZOL-5-ILMETILINDENE)-5-NITRO-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE



**C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>**

**P.f.**= 214-216°C

**RESA:** 80%

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 7.05 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, Ar); 7.15-7.16 (m, 1H, Ar); 7.57 (s, 1H, H-vinyl); 7.68 (s, 1H, Ar); 8.10 (s, 1H, Ar); 8.40 (s, 1H, Ar); 8.62 (s, 1H, Ar); 11.27 (br s, 1H) ppm.

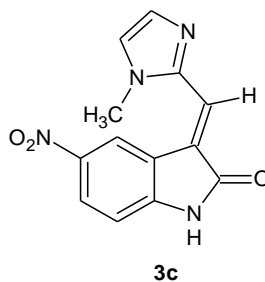
**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 168.40, 145.85, 142.15, 136.90, 135.08, 129.85, 127.80, 125.15, 123.57, 122.18, 120.10, 118.33 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE

<b>C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	56.25	3.15	21.87
<b>Trov.%</b>	56.20	3.12	21.76



**3c:** (3E)-3-[(1-METIL-1H-IMIDAZOL-5-IL)METILINDENE]-5-NITRO-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE



**C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>**

**P.f.**= 210-212°C

**RESA:** 81%

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 3.94(s, 3H, NMe); 7.04 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, Ar); 7.49 (s, 1H, Ar); 7.51 (s, 1H, H-vinyl); 7.61 (s, 1H, Ar); 8.22 (dd, 1H, *J* = 2.4, 8.7 Hz, Ar); 10.40 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar); 11.30 (br s, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 169.49, 147.95, 142.07, 141.87, 130.98, 126.12, 122.89, 122.46, 121.85, 120.33, 109.93, 33.30 ppm.

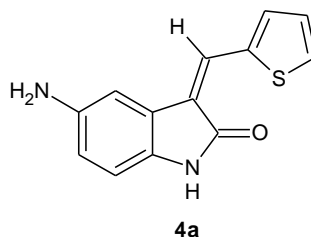
**ANALISI ELEMENTARE**

<b>C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	57.78	3.73	20.73
<b>Trov.%</b>	58.06	3.98	20.79

## PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI DERIVATI 5-AMMINO-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE 3 ETEROCICLO SOSTITUITI (4a-c)

Ad una soluzione dell'appropriato composto **3a-c** (4mmoli) in MeOH (50 mL) è stato aggiunto carbone (0,216 mg) e FeCl<sub>3</sub>. La miscela di reazione è stata riscaldata a 60°C e l'idrazina monoidrata (3,22 mL, 66 mmoli) è stata aggiunta goccia a goccia; la reazione è stata lasciata a riflusso per tutta la notte. Trascorso tale periodo, la miscela è stata trattata filtrando su celite ed evaporando la soluzione.

**4a:** (3Z)-5-AMMINO-3-(TIOFEN-2-ILMETILINDENE)-1,3-DIIDRO-2-H-INDOL-2-ONE



**C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS**

**P.f.**= 190-192°C

**RESA:** 60%

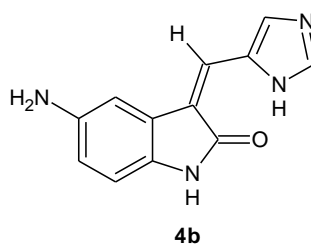
**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 6.63-6.65 (m, 2H, Ar); 7.07-7.10 (m, 1H, Ar); 7.12 (s, 1H, Ar); 7.58-7.64 (m, 2H, Ar); 8.05 (s, 1H, H-vinyl); 10.20 (br s, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 168.50, 144.92, 140.85, 139.15, 138.07, 136.04, 131.75, 127.71, 124.12, 123.47, 119.10, 114.10, 109.15 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE:

<b>C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	64.44	4.16	11.56
<b>Trov.%</b>	64.81	4.32	11.84

**4b:** (3Z)-3-(1H-IMIDAZOL-5-ILMETILINDENE)-5-AMMINO-1,3-DIIDRO-2H-INDOL-2-ONE



**C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O**

**P.f.**= 194-196°C

**RESA:** 59%

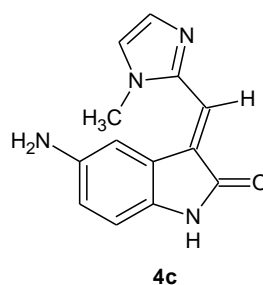
**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 6.95 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar); 7.13-7.15 (m, 1H, Ar); 7.27 (s, 1H, H-vinyl); 7.42 (s, 1H, Ar); 7.97 (s, 1H, Ar); 8.04 (s, 1H, Ar); 8.42 (s, 1H, Ar); 10.97 (br s, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 169.01, 146.50, 142.15, 136.65, 134.89, 129.72, 127.80, 124.95, 123.72, 123.01, 120.10, 119.33 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE

<b>C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	63.71	4.46	24.76
<b>Trov.%</b>	63.40	4.06	24.14

**4c:** (3*E*)-3-[(1-METIL-1*H*-IMIDAZOL-5-IL)METILINDENE]-5-AMMINO-1,3-DIIDRO-2*H*-INDOL-2-ONE



**C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O**

**P.f=** 200-202°C

**RESA:** 65%

**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 3.96 (s, 3H, NMe); 7.04 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.51 (s, 1H, Ar); 7.63 (s, 1H, H-vinyl); 7.71 (s, 1H, Ar); 7.92 (dd, 1H, *J* = 1.9, 8.4 Hz, Ar); 10.39 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar); 11.30 (br s, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO): δ 168.18, 147.82, 142.07, 141.87, 130.98, 126.12, 122.89, 122.46, 121.85, 120.73, 108.95, 33.29 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE**

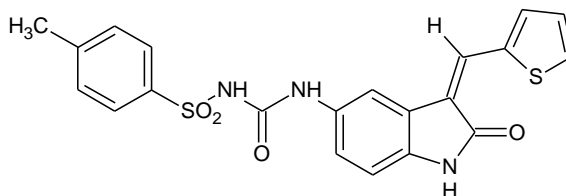
<b>C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	64.99	5.03	23.32
<b>Trov.%</b>	65.05	5.09	23.41

**PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI DEI  
COMPOSTI FINALI 4-METIL-N-(2-OXO-INDOLIN-5-  
IL)CARBAMOIL)BENZENSOLFONAMMIDICI 3-  
ETEROCICLO SOSTITUITI (2a-c)**

Al composto **4a-c** appropriato (1.0 mmoli), solubilizzato in 10 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90:10), è stato aggiunto lentamente il p-toluensolfonilisocianato (1.1 mmoli, 235 mg) a 10°C. la miscela è stata lasciata sotto agitazione a t.a. per 12 h.

Il solido formato (**2a-c**) è stato separato per filtrazione, lavato con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lasciato ad asciugare.

**2a:** (3Z)-4-METIL-N-[(2-OXO-3-(TIOFEN-2-ILMETILENE)INDOLIN-5-IL)CARBAMOIL] BENZENSOLFONAMMIDE



**Z-2a**

**C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>**

**P.f= 212-214°C**

**RESA: 87%**

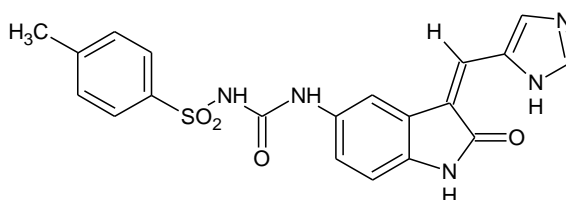
**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO): δ 2.34 (s, 3H, Me); 6.98 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar); 7.12 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar); 7.36 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.65 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.84-7.92 (m, 3H, Ar, H-vinyl); 7.97-8.02 (m, 1H, Ar); 8.03 (s, 1H, Ar); 8.48 (br s, 1H); 8.68 (br s, 1H); 10.49 (br s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO):  $\delta$  170.17, 152.60, 138.53, 137.01, 135.18, 134.93, 133.16, 130.54, 130.01, 129.35, 129.23, 128.78, 128.46, 127.91, 122.75, 121.08, 120.87, 110.28; 21.10 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE

$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$	C	H	N
Calc. %	57.39	3.90	9.56
Trov. %	57.58	3.92	9.37

**2b:** (3Z)-N-[(3-((1H-IMIDAZOL-5-IL)METILENE)-2-OXOINDOLIN-5-IL)CARBAMOIL]-4-METILBENZENESOLFONAMMIDE.



Z-2b

$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$

P.f= 219-221°C

RESA: 80%

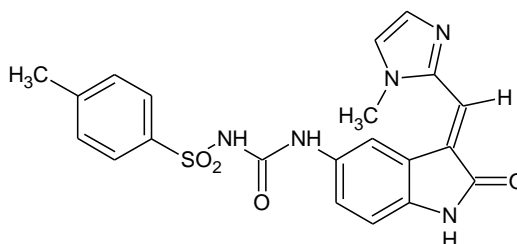
$^1\text{H}$  NMR (DMSO):  $\delta$  2.46 (s, 3H, Me); 6.88 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Ar); 7.12 (dd, 1H,  $J = 1.2, 8.2$  Hz, Ar); 7.42 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, Ar); 7.54 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, Ar); 7.72 (s, 1H, H-vinyl); 7.81 (s, 1H, Ar); 7.85 (d, 1H,  $J = 1.2$  Hz, Ar); 8.04 (s, 1H, Ar); 8.54 (br s, 1H); 8.70 (br s, 1H); 10.90 (br s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO):  $\delta$  170.58, 152.08, 139.60, 137.91, 137.42, 136.90, 136.27, 135.54, 130.41, 129.03, 128.93, 128.07, 125.49, 122.01, 120.58, 119.35, 112.15; 21.03 ppm.

## ANALISI ELEMENTARE

$C_{20}H_{17}N_4O_4S_2$	C	H	N
Calc. %	56.73	4.05	16.54
Trov. %	56.52	3.97	16.09

**2c:** (3*E*)-4-METIL-*N*-[(3-((1-METIL-1*H*-IMIDAZOL-2-IL)METILENE)-2-OXOINDOLIN-5-IL)CARBAMOIL]BENZENESOLFONAMMIDE

**E-2c**

$C_{21}H_{19}N_5O_4S$

P.f= 225-227°C

RESA: 84%

$^1H$  NMR (DMSO):  $\delta$  2.43 (s, 3H, Me); 3.90 (s, 3H, NMe); 6.79 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar); 7.25 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, Ar); 7.37 (s, 2H, Ar); 7.48 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz, Ar); 7.52 (s, 1H, H-vinyl); 7.68 (dd, 1H,  $J = 2.0, 8.3$  Hz, Ar); 8.49 (br s, 1H); 8.64 (br s, 1H); 9.15 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, Ar); 10.45 (br s, 1H) ppm.

$^{13}C$  NMR (DMSO):  $\delta$  169.27, 153.45, 139.86, 139.14, 137.80, 136.86, 135.66, 130.56, 129.42, 128.77, 128.52, 127.70, 122.04, 121.95, 120.78, 119.57, 115.97; 35.25, 21.20 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE**

<b>C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	57.66	4.38	16.01
<b>Trov.%</b>	57.40	4.62	16.36



# ***BIBLIOGRAFIA***

1. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf> AMERICAN CANCER SOCIETY. Li Q. (2007). Recent progress in the discovery of Akt inhibitors as anticancer agents *Expert Opin. Ther. Patents*, 17(9):1077-1130.
2. J.A. Fresno Vara, E. Casado, J. De Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, M. González-Barón (2004) PI3K/ Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* 30, 193-204.
3. Covelli, I.; Veneziani, (2000) B.M. *Principi di Patologia Generale*, Napoli.
4. Chial, H. (2008) Proto-oncogenes to oncogene to cancer. *Nature Education* 1 (1)
5. Harris T.K. (2003). PDK1 and PKB/Akt: Ideal Targets for Development of New Strategies to Structure-Based Drug Design. *Life*, 55(3): 117–126.
6. Li Q. (2007). Recent progress in the discovery of Akt inhibitors as anticancer agents *Expert Opin. Ther. Patents*, 17(9):1077-1130.
7. Staal SP.(1987) Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84:5034–7.
8. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tschlis PN. (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*; 254:274–7.
9. Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, Testa JR. (2000) Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*; 88:38–40.

10. Z.Z. Yang, O. Tschopp, M. Hemmings-Mieszczak, J. Feng, D. Brodbeck, E. Perentes, B.A. Hemmings, (2003) Protein kinase B $\alpha$ /Akt1 regulates placental development and fetal growth, *J. Biol. Chem.* 278, 32124– 32131.
11. M. Hanada, J. Feng, B.A. Hemmings (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target *Biochimica et Biophysica Acta* 1697 3 – 16
12. Fruman, D. A., Rameh, L. E., and Cantley, L. C. (1999) Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell* 97, 817 – 820.
13. Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., and Lemmon, M. A. (2000) Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* 6, 373 – 384.
14. M. Frech, M. Andjelkovic, E. Ingley, K.K. Reddy, J.R. Falck, B.A. Hemmings, (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the Pleckstrin homology domain of RAC protein kinase B and their influence on kinase activity, *J. Biol. Chem.* 272 8474–8481.
15. R.T. Peterson, S.L. Schreiber, (1999) Kinase phosphorylation: keeping it all in the family, *Curr. Biol.* 9, R521– R524.
16. M. Andjelkovic, D.R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N.J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J.M. Lucocq, B.A. Hemmings, (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B, *J. Biol. Chem.* 272, 31515– 31524.
17. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB and Cohen P. (1997). *Curr. Biol.*, 7, 261–269.
18. Cheng J.Q., Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. (2005). The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*;24(50):7482-92. Review

19. B. Burgering, P.J. Coffey, (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction, *Nature* 376, 599– 602.
20. Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355– 365.
21. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499– 3511.
22. T. Kitamura, Y. Kitamura, S. Kuroda, Y. Hino, M. Ando, K. Kotani, H. Konishi, H. Matsuzaki, U. Kikkawa, W. Ogawa, M. Kasuga, (1999) Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt, *Mol. Cell. Biol.* 19, 6286– 6296.
23. Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., & Hung, M. C. (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3, 245– 252.
24. Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., & Burgering, B. W. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip 1. *Nature* 404, 782– 787.
25. Martin DE, Hall MN. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(2):158–166.
26. P.H. Scott, G.J. Brunn, A.D. Kohn, R.A. Roth, J.C. Lawrence Jr., Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signalling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 7772–7777.
27. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Master, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couple survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

28. Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905–2927.
29. Fujita, E., Jinbo, A., Matuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U., & Momoi, T. (1999). Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 550– 555.
30. Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342– 348.
31. W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J.* 357 (2001) 593–615.
32. B.J. Michell, J.E. Griffiths, K.I. Mitchelhill, I. Rodriguez-Crespo, T. Tiganis, S. Bozinovski, P.R. de Montellano, B.E. Kemp, R.B. Pearson, The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase, *Curr. Biol.* 9 (1999) 845– 848.
33. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:481–507.
34. C Garcia-Echeverria and WR Sellers; Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* (2008) 27, 5511-5526.
35. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., & Hawkins, P. T. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710– 714.
36. Mora A, Komander D, van Aalten DMF, Alessi DR. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Sem Cell Dev Biol* 15: 161–170.
37. Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F., & Hawkins, P. T. (1997). Dual role of

phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567–570.

38. Currie, R. A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P., Cohen, P., Alessi, D. R., & Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* 337, 575–583.

39. Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR. (1999). Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J* 342: 287–292.

40. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW: PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 1999, 21:99-102.

41. Sarker D, Workman P: Pharmacodynamic biomarkers for molecular cancer therapeutics. *Adv Cancer Res* 2007, 96:213-268.

42. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 1995;64:280–5.

43. Brian PW, Hemming HG, Norris GLF. (1957). Wortmannin, an antibiotic produced by penicillium wortmanni. *Br Mycol Soc Trans* 40: 365–368.

44. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241–5248.

45. Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD et al. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16: 1722–1733.

46. Zhu T, Gu J, Yu K, Lucas J, Cai P, Tsao R, Gong Y, Li F, Chaudhary I, Desai P et al.: Pegylated wortmannin and 17-hydroxywortmannin conjugates as phosphoinositide 3-kinase inhibitors active in human tumor xenograft models. *J Med Chem* 2006, 49:1373-1378.
47. Ihle NT, Paine-Murrieta G, Berggren MI, Baker A, Tate WR, Wipf P, Abraham RT, Kirkpatrick DL, Powis G: The phosphatidylinositol- 3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 2005, 4:1349-1357.
48. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001;61:3986–97.
49. Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA, Kochanny MJ, Dinter H, Zhu D, Biroc SL, Alicke B, Bryant J, Yuan S, Buckman BO, Lentz D, Ferrer M, Whitlow M, Adler M, Finster S, Chang Z and Arnaiz DO. (2005). *J. Biol. Chem.*, 280, 19867–19874.
50. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. (2002). Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene* 21: 1727–1738.
51. Komander D, Kular GS, Bain J, Elliott M, Alessi DR, van Aalten DMF. (2003). Structural basis for UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) specificity and PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) inhibition. *Biochem J* 375: 255–262.
52. Welch S, Hirte HW, Carey MS, Hotte SJ, Tsao MS, Brown S et al. (2007). UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium. *Gynecol Oncol* 106: 305–310.
53. Harding MW: Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003, 9:2882-2886.

54. Ito D, Fujimoto K, Mori T, Kami K, Koizumi M, Toyoda E, Kawaguchi Y, Doi R: In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006, 118:2337-2343.
55. Castillo SS, Brognard J, Petukhov PA, Zhang C, Tsurutani J, Granville CA, Li M, Jung M, West KA, Gills JG, Kozikowski AP and Dennis PA. (2004a). *Cancer Res.*, 64, 2782–2792.  
Castillo SS, Brognard J, Petukhov PA, Zhang C, Tsurutani J, Granville CA, Li M, Jung M, West KA, Gills JG, Kozikowski AP and Dennis PA. (2004b). *Cancer Res.*, 64, 2782–2792.
56. Senderowicz AM. (2003a). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52, S61–S73.  
Senderowicz AM. (2003b). *Oncogene*, 22, 6609–6620.
57. Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG et al.: Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006, 107:4053-4062.
58. Posadas EM, Gulley J, Arlen PM, Trout A, Parnes HL, Wright J, Lee MJ, Chung EJ, Trepel JB, Sparreboom A et al.: A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2005, 4:1133-1137.
59. Marsh Rde W, Rocha Lima CM, Levy DE, Mitchell EP, Rowland KM Jr, Benson AB III: A phase II trial of perifosine in locally advanced, unresectable, or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 2007, 30:26-31.
60. Schreeder M, Figlin R, Stephenson J, Campos L, Chawla S, Spigel D, Spira A, Sportelli P, Gardner L, Birch R et al.: Phase I multicenter trial of perifosine in combination with sorafenib for patients with advanced cancers including renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2008, 26: [May 20 suppl; abstr 16024].
61. Reuveni H, Livnah N, Geiger T, Klein S, Ohne O, Cohen I, Benhar M, Gellerman G and Levitzki A. (2002). *Biochemistry*, 41, 10304–10314.



62. Lyons J, Grimshaw K, Woodhead S, Feltell R, Reule M, Smyth T, Seavers L, Harada I, Higgins J, Smith D et al.: AT13148, an orally bioavailable AKT kinase inhibitor with potent anti-tumor activity in both in vitro and in vivo models exhibiting AKT pathway deregulation [Abstract B251]. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 2007.
63. Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, Kahana JA, Kral AM, Leander K, Lee LL, Malinowski J, McAvoy EM, Nahas DD, Robinson RG and Huber HE. (2005b). *Biochem. J.*, 385, 399–408.
64. DeFeo-Jones D, Barnett SF, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Leander KR, McAvoy E, Robinson RG, Duggan ME, Lindsley CW, Zhao Z, Huber HE and Jones RE. (2005). *Mol. Cancer Ther.*, 4, 271–279.
65. Druker, B. J. (2002) STI571 (Gleevec™) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 8, S14 – S18.
66. Guerreiro AS, Fattet S, Fischer B, et al. Targeting the PI3K p110alpha isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6761–6769.
67. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., & Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39.