

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE**

**XXII CICLO**



Triennio 2006-2009

TESI DI DOTTORATO

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI DERIVATI  
CHINONICI CON ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA**

RELATORE

**Ch.mo Prof. Daniela Montesarchio**

TUTORE

**Ch.mo Prof. Adele Bolognese**

CANDIDATA

**Dr. Anna Esposito**

ANNO ACCADEMICO 2009 / 2010

	Pag.
<b>1. INTRODUZIONE</b>	3
1.1. Protooncogeni	7
1.2. Oncogeni	9
1.3. Geni coinvolti nel DNA repair	11
<b>2. PROGETTO</b>	21
2.1. Farmaci a struttura chinonica con attività intercalante	21
<b>3. Il 5<i>H</i>-pirido- [3,2-<i>a</i>] fenossazin-5-one (PPH)</b>	27
3.1. Preparazione dell'acido 5-osso-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>a</i> ]fenossazin-9-carbossilico	36
3.2. Preparazione dell'acido 6-amino-2-(5-osso-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>a</i> ]fenossazin-9-carbossamido) esanoico e dell'acido (1) 2-amino-6-(5-osso-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>a</i> ]fenossazin-9-carbossamido)esanoico (2)	39
3.3. Parte sperimentale	46
3.3.1. Materiali e metodi	46
3.3.2. Ossidazione della 5-amino-8-idrossi-chinolina con K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	47
3.3.3. Acido 5 <i>H</i> -pirido- [3,2- <i>a</i> ] -fenossazin-5-one-9 carbossilico	47
3.3.4. Preparazione dell'acido 6-amino-2-(5-osso-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>a</i> ]fenossazin-9-carbossamido) esanoico e dell'acido (1) 2-amino-6-(5-osso-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>a</i> ]fenossazin-9-carbossamido)esanoico (2).	49
<b>3.4. Basidiomiceti</b>	52

<b>4. L'etil 3-amino-4,9-dioxo-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]quinoline-3-carbossilato (QQAS)</b>	54
4.1. Spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]quinolina]-tetraoni (STQT) e Spiro[tieno[2,3-g]quinolina-3,5'-[1,2,4]triazinane]-tetraoni (STQ)	57
4.2. Proprietà di legame al DNA	66
4.3. Parte sperimentale	70
4.3.1. Materiali e metodi	70
4.3.2. Risoluzione degli enantiomeri (+)-1 e (-)-1	71
4.3.3. Preparazione del .2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2, 2a-n) e 2H –spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1, 2, 4] triazin]-3', 4, 6', 9-tetraone (3, 3a-e).	73
<b>5. Conclusioni</b>	81
<b>6. Biologia</b>	85
<b>7. Bibliografia</b>	90
<b>8. Abbreviazioni</b>	

## 1. INTRODUZIONE

La chemioterapia, o l'uso di agenti chimici per distruggere le cellule tumorali, è un passaggio nodale nel trattamento dei tumori maligni. Il maggior vantaggio della chemioterapia è la possibilità di trattare tumori molto estesi e le metastasi tumorali, laddove la chirurgia e la radioterapia consentono di trattare principalmente tumori che sono confinati in aree specifiche<sup>1</sup>.

Pertanto la chemioterapia è in continua ricerca di molecole dotate del livello massimo di potenza e selettività di azione.

I chemioterapici che hanno come effetto terapeutico la distruzione di una popolazione cellulare avranno tanto maggiori probabilità di successo quanto maggiori sono le differenze biologiche esistenti tra le cellule bersaglio e le cellule dell'organismo ospite.

Queste differenze, che sono minime tra la popolazione cellulare neoplastica rispetto a quella dell'organismo da cui essa si è originata, rendono ragione del fatto che un agente antitumorale, raramente potrà, da

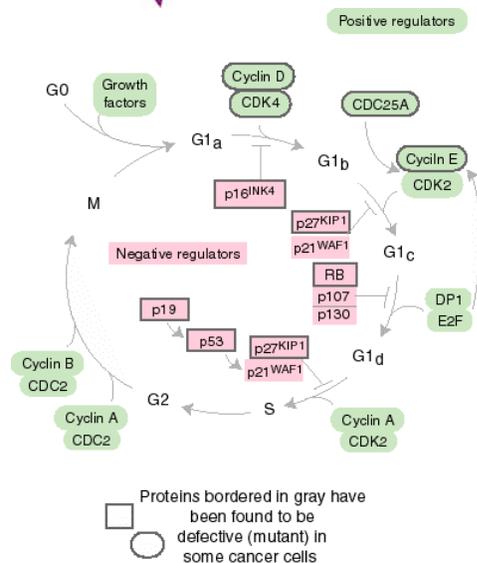
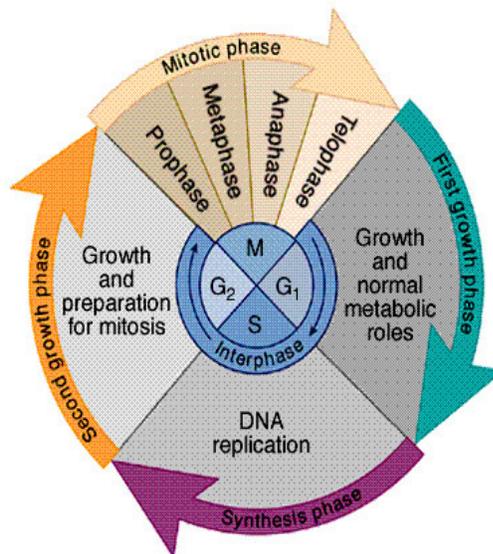
solo, eliminare tutte le cellule cancerose senza dare effetti tossici collaterali per il paziente.

La chemioterapia antitumorale è infatti fortemente limitata dalla sua tossicità, cioè da un indice terapeutico molto ristretto. Tuttavia, enormi progressi sono stati fatti anche in questo campo, grazie allo studio dei fattori che interagiscono tra loro nel corso di una malattia neoplastica, come la natura del paziente e i cambiamenti del suo stato metabolico, endocrino, immunologico, la neoplasia e la sua peculiare biologia ed infine il meccanismo d'azione dei farmaci antitumorali.

Comprendere il ciclo riproduttivo della cellula normale e il comportamento di cellule maligne o cancerose è quindi necessario per comprendere come la chemioterapia possa distruggerle.

Di seguito è riportato un esempio del ciclo riproduttivo della cellula eucariota dove è possibile distinguere cinque fasi:

- ✓ nella **fase G0** la cellula non è impegnata nell'attività riproduttiva e quindi svolge la sua normale funzione all'interno dell'organismo.
- ✓ nella **fase G1** la cellula inizia la sintesi delle proteine e dell'RNA necessari per la duplicazione dei cromosomi.
- ✓ nella **fase S** la cellula duplica i cromosomi.
- ✓ nella **fase G2** c'è una nuova fase di sintesi di proteine e di RNA in cui la cellula si prepara alla divisione.
- ✓ nella **fase M** si ha la divisione cellulare o *mitosi*.



**Figura 1**-Schema delle fasi del ciclo riproduttivo della cellula. Si distinguono almeno quattro fasi, in ognuna delle quali la cellula si prepara per una successiva mitosi. Errori in questo processo possono compromettere la vitalità cellulare e per tale motivo esistono dei punti di controllo (*checkpoints*), localizzati a livello delle transizioni G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M. L'omeostasi tissutale viene controllata da numerosi geni, i quali codificano proteine che fungono o da regolatori positivi o da regolatori negativi del ciclo cellulare. Mutazioni a carico di tali geni possono portare ad alterazioni del ciclo cellulare e quindi a proliferazione incontrollata.

Fisiologicamente, l'omeostasi tissutale è garantita da un continuo equilibrio tra cellule proliferanti e cellule in necrosi in modo tale che la

densità cellulare sia sempre costante. Non tutte le cellule sono nello stesso ciclo replicativo: alcune sono in *fase G0*, sono cioè quiescenti perché non si replicano per un periodo di tempo indeterminato ma possono in qualsiasi momento rientrare in azione, mentre altre, una volta differenziate, perdono definitivamente la capacità proliferativa. Queste ultime sono escluse dal target terapeutico dei farmaci citotossici ma ciò non significa che lo siano anche per quanto riguarda gli effetti tossici (es: le *antracicline* possono danneggiare irreversibilmente i miocardiociti)<sup>2,3,20</sup>.

La maggior parte dei farmaci chemioterapici attualmente disponibili distruggono le cellule del cancro bloccando, per diverse vie, la sintesi del DNA o alterando altre funzioni del ciclo cellulare.

Il tumore, che è un processo multifasico<sup>1</sup>, si sviluppa di solito nel corso di diversi anni, durante i quali si verificano alterazioni geniche multiple. Nella maggior parte dei casi si tratta di mutazioni somatiche (*traslocazioni cromosomiche, inversioni, amplificazioni o mutazioni puntiformi*), alcune delle quali sono ritenute responsabili dell'attivazione di oncogeni, effettori della trasformazione neoplastica, mentre altre sono considerate promotrici della perdita funzionale dei geni oncosoppressori, regolatori negativi della crescita.

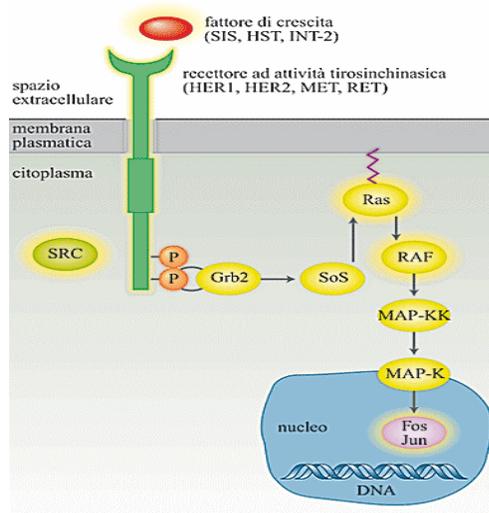
Tre tipi di geni principali controllano la proliferazione cellulare:

**1.1. Protooncogeni:** geni coinvolti nella stimolazione, crescita e proliferazione cellulare. Mutazioni a carico di questi geni comporta un processo di attivazione (*oncogene*) che a sua volta provoca un aumento di tali funzioni e quindi dei processi di trasformazione ed invasività. Gli oncogeni hanno funzione dominante: una sola copia genica mutata è sufficiente a produrre il cancro per acquisizione di funzione (“*gain of function*”).

GENE	FUNZIONE	TUMORI ASSOCIATI
<i>Catena β del PDGF</i>	fattore di crescita	Osteosarcomi
<i>Int2</i>	fattore di crescita dei fibroblasti	carcinoma vescica e mammella
<i>Erb1</i>	recettore per EGF	carcinoma polmone
<i>Erb2</i>	recettore per EGF	carcinoma ovaio, stomaco, mammella, polmone
<i>Ret</i>	recettore per GDNF	carcinoma papillifero, tiroide, MEN2A/B, midollare tiroideo familiare
<i>Fms</i>	recettore per CSF-1	leucemie
<i>Ras</i>	GTP-binding protein trasduttrice del segnale	carcinoma colon, pancreas, vescica, tiroide
<i>c-myc, N-myc, L-myc</i>	fattori trascrizionali	linfomi, Neuroblastoma, carcinoma polmone
<i>Ciclina D (PRAD-1, bcl-1)</i>	proteine del ciclo cellulare	Adenoma paratiroideo, linfomi, carcinoma fegato, mammella

**Tabella 1-**Geni protooncogeni

L'oncogene è quindi una versione modificata di un gene cellulare che acquisisce funzione dominante nel promuovere la proliferazione cellulare.



**Figura 2-** Trasduzione del segnale, ossia catena di reazioni che trasmette segnali (soprattutto idrofili) dalla superficie cellulare verso bersagli intracellulari di vario tipo, al fine di controllare la trascrizione di determinate proteine e/o la crescita cellulare. Qualsiasi danno a carico dei geni codificanti tali proteine potrebbe essere causa di un processo carcinogenico.

**1.2. Oncosoppressori:** sono geni aventi un ruolo di controllo negativo della proliferazione cellulare, al fine di prevenire eventi di crescita cellulare abnorme. Normalmente questi geni inibiscono la crescita cellulare. Gli oncosoppressori sono recessivi a livello cellulare. Entrambe le copie geniche devono essere alterate perchè si sviluppi il tumore (“*loss of function*”). Infatti, la maggior parte dei tumori ereditari sono dovuti all’ereditarietà di un gene oncosoppressore mutato (*first hit*) e l’ereditarietà della predisposizione a sviluppare il cancro è dominante (50% di rischio da un genitore portatore). E’ però necessario un secondo colpo (*second hit*) per lo sviluppo del tumore, pertanto il gene agisce in modo recessivo a livello cellulare.

<b>GENE</b>	<b>FUNZIONE</b>	<b>TUMORI ASSOCIATI A MUTAZIONI SOMATICHE</b>	<b>TUMORI ASSOCIATI A MUTAZIONI EREDITARIE</b>
<i>NF-1</i>	inibizione di Ras	Shwannomi	Neurofibromatosi 1
<i>APC</i>	inibizione del segnale fitogenico	carcinoma stomaco, colon, pancreas	Polipomatosi familiare del colon, carcinoma colon
<i>WT-1</i>	fattore trascrizionale	Nefroblastomi	tumore di Wilms
<i>Rb</i>	regolazione del ciclo cellulare	Retinoblastoma, Osteosarcoma, carcinoma mammella, colon, polmone	Retinoblastoma, Osteosarcoma
<i>P16</i>	inibizione delle CDKs	carcinoma esofago, pancreas	Melanoma familiare
<i>P53</i>	risposta al danno al DNA	nei tumori maligni avanzati	Sindrome Li-Fraumeni

**Tabella.:2** Geni oncosoppressori

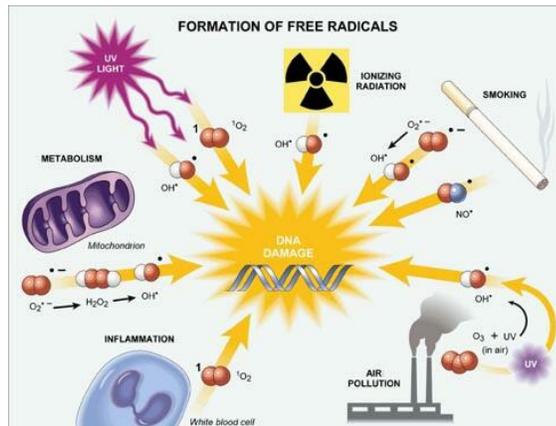
**1.3. Geni coinvolti nel “DNA repair”:** Sono geni aventi un ruolo nel riparare eventuali mutazioni o alterazioni del DNA dovute sia a fattori endogeni (es: disfunzioni enzimatiche) che esogeni (es: raggi UV). Mutazioni a carico di questi geni possono portare ad eventi di “*miss-repair*” e quindi ad un accumulo di mutazioni potenzialmente cancerogene.

GENE	FUNZIONE	TUMORI ASSOCIATI A MUTAZIONI SOMATICHE	TUMORI ASSOCIATI A MUTAZIONI EREDITARIE
<i>BRCA-1</i>	riparo del DNA	carcinoma mammella, ovaio	carcinoma mammella, ovaio
<i>BRCA-2</i>			
<i>MSH</i>	riparo del DNA miss match	carcinoma colon	carcinoma colon non polipomatoso
<i>MLH</i>			

**Tabella 3-** Mutazioni a carico del DNA potenzialmente cancerogene

La carcinogenesi, che è un processo multi-fattoriale, riconosce diverse fasi con eventi genetici multipli (*mutazioni*) che si verificano in un lungo arco temporale (almeno 10 anni nella maggior parte dei casi). Alla base della carcinogenesi<sup>21</sup> c’è quindi un danno genetico non letale, provocato dall’azione di numerosi fattori, i quali possono essere divisi in:

- ✓ **Estrinseci:** fattori ambientali (*onco-virus*, radiazioni, prodotti chimici, dieta, etc.)
- ✓ **Intrinseci:** fattori genetici o fisiologici (stato immunitario, equilibrio endocrino, etc.)



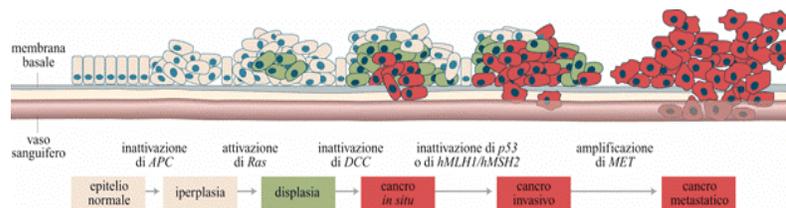
**Figura 3-** Formazione di radicali liberi, una delle cause principali del processo carcinogenico. I radicali liberi sono specie molto reattive, alcuni sono prodotti dal nostro organismo come difesa da agenti eziologici di natura principalmente batterica mentre altri sono causati da numerosi fattori ambientali (es: raggi UV). La loro pericolosità sta nel fatto che questi radicali possono interagire liberamente con il DNA e provocare danni al patrimonio genetico. Possono essere classificati in ROS (*Reacting Oxygen Species*) ed RNS (*Reacting Nitrogen Species*).

L'ipotesi genetica del cancro parte dal presupposto che una massa tumorale sia il risultato dell'espansione clonale di una singola cellula che, a seguito di una o più mutazioni e del fallimento dei meccanismi di regolazione atti a mantenere l'omeostasi del numero delle cellule dell'organismo, va incontro a proliferazione incontrollata illimitata, che rimane localizzata, nel caso di tumore benigno, mentre va incontro a metastatizzazione o disseminazione di cellule neoplastiche, nel caso di tumore maligno o cancro.

Esistono almeno tre fasi nel processo di carcinogenesi:

- ✓ **Iniziazione**, che consiste nell'acquisizione di una mutazione nel DNA di una cellula normale (modifica irreversibile), che le conferisce capacità di crescita individuali. L'agente iniziante può essere un carcinogeno ambientale o un difetto geneticamente trasmesso.
- ✓ **Promozione/Conversione**, in cui uno specifico agente (promotore) aumenta le capacità proliferative della cellula iniziata. I promotori spesso interagiscono con il DNA ed aumentano le capacità di espressione del DNA mutato. Il clone di cellule prende la forma di un tumore benigno (fisicamente coeso).
- ✓ **Progressione**, consiste nella transizione della cellula iniziata verso la malignità. Le cellule singole possono distaccarsi ed iniziare nuovi cloni che crescono a distanza (*metastasi*) avvalendosi di un processo di angiogenesi.

La carcinogenesi è quindi causata da mutazioni del materiale genetico di cellule normali, e ciò altera l'equilibrio tra proliferazione e morte cellulare. Questo dà luogo a una divisione cellulare incontrollata ed alla formazione del tumore.



**Figura4-** Evoluzione di un epitelio da normale a metastatico; a seguito di una mutazione a carico di un gene oncosoppressore (es: *APC*, inibitore del segnale mitogenico) si assiste alla comparsa di un clone cellulare potenzialmente “cancerogeno” e, di conseguenza, ad una proliferazione incontrollata *in situ* dell’epitelio; a seguito di ulteriori mutazioni a carico di altrettanti geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare (es: *Ras*, *p53*, etc.) il clone cellulare va incontro a fenomeni di invasività, ciò porta le cellule neoplastiche a distaccarsi dalla massa tumorale fisicamente coesa (*tumore benigno*) e ad iniziare nuovi cloni che crescono a distanza (*metastasi*).

#### *Siti più comuni di eventi neoplastici*    *Principali cause di neoplasie*

Men		Women	
Prostate	32%	Breast	32%
Lung	16%	Lung	13%
Colon and rectum	12%	Colon and rectum	13%
Urinary tract	9%	Uterus	8%
Leukemia and Lymphoma	7%	Leukemia and lymphoma	6%
Oral cavity	3%	Urinary tract	4%
Melanoma of skin	3%	Ovary	4%
Pancreas	2%	Melanoma of skin	3%
Stomach	2%	Pancreas	2%
All other sites	14%	Oral cavity	2%
		All other sites	13%

Lifestyle Factors	Percent
Diet	35%
Tobacco use ( <i>mainly inhaled cigarette smoke</i> )	30%
Reproductive and sexual behavior	7%
Alcohol consumption	3%

Other Factors	Percent
Infections	10%
Occupational exposures	4%
Geophysical factors ( <i>including UV; ionizing radiation</i> )	3%
Pollution	2%
Iatrogenic ( <i>drugs and medical procedures</i> )	1%
Food additives	< 1%
Industrial products	< 1%
Other	3%

**Tabella 4**

Cellule che acquistano una capacità proliferativa illimitata sono chiamate *cellule clonogeniche*, non tutte sono proliferanti, ma alcune sono temporaneamente quiescenti e possono rientrare in ciclo in qualsiasi momento.

Lo scopo della chemioterapia è proprio quello di bloccare la proliferazione neoplastica, uccidendo il maggior numero possibile di cellule tumorali proliferanti e non, requisito fondamentale per ottenere miglioramenti clinici evidenti.

Quindi è chiaro che l'obiettivo principale è quello di modificare la curva di crescita delle cellule tumorali in modo da ottenerne una regressione.

La velocità di crescita dei tumori *in vivo* è all'inizio rapida, ma quando il tumore aumenta di dimensioni, esso rallenta a causa della inadeguatezza della vascolarizzazione, che porta le cellule ad una mancanza di nutrienti e di ossigeno. La riduzione della massa tumorale mediante la chirurgia o la terapia radiante aumenta il reclutamento delle cellule che rimangono nella fase attiva del ciclo ed aumenta la loro sensibilità ai farmaci chemioterapici.

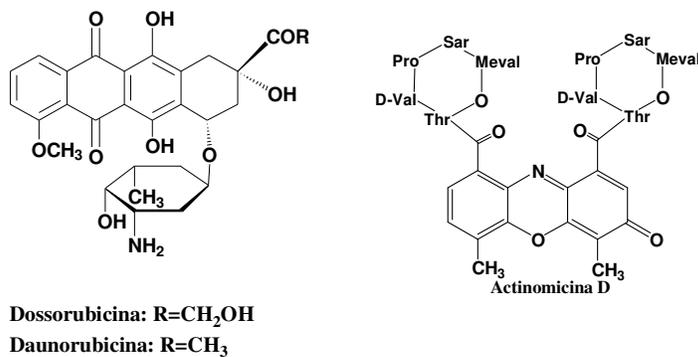
Tra i problemi associati alla chemioterapia vi è quello dovuto al fatto che non è stato ancora possibile scoprire farmaci specifici per le cellule tumorali, essendo queste molto simili da un punto di vista metabolico a quelle normali. Il cancro rappresenta dunque un problema di notevole portata, e scoprire nuovi bersagli biologici risulta fondamentale per poter utilizzare in maniera appropriata l'attuale generazione di agenti neoplastici

e fornire informazioni utili per la progettazione di nuove molecole con attività antitumorale.

I principali agenti antitumorali attualmente in uso possono essere divisi nelle seguenti categorie generali, sulla base del loro meccanismo di azione:

- **Ormoni e antagonisti ormonali:** puntano a modificare le condizioni locali di tessuti nei quali si è sviluppata una neoplasia.
- **Immunostimolanti:** tendono a stimolare la risposta immunitaria
- **Citotossici o citostatici :** intervengono nella biosintesi dei ribonucleotidi e desossiribonucleotidi, nei processi di replicazione, trascrizione e traduzione del DNA, e sul processo di formazione del fuso mitotico.

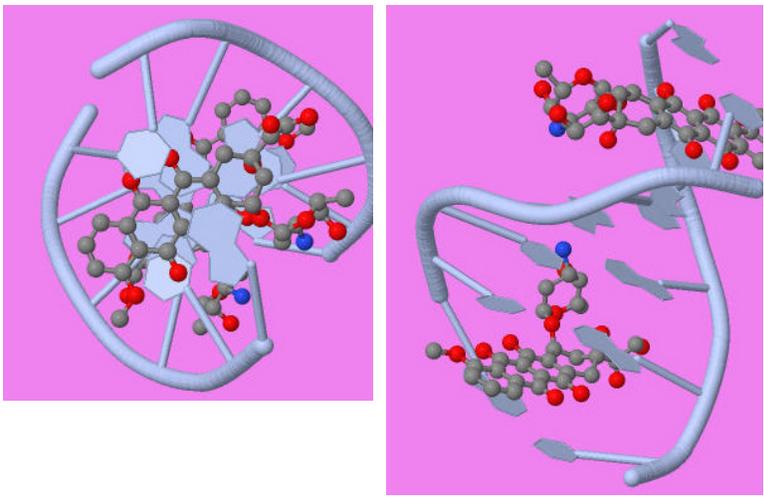
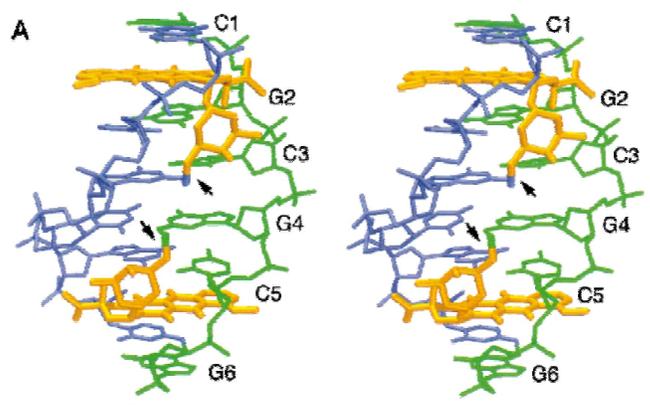
Tra i farmaci che agiscono sulle fasi del ciclo cellulare vi sono, in particolare quelli che interferiscono con il DNA in fasi non specifiche del ciclo cellulare contenenti nelle proprie strutture diversi sistemi chinonici. A questo gruppo appartengono vari antibiotici isolati da *Streptomyces* come la Dactinomicina (actinomicina D, AMD), un cromopeptide costituito da un anello fenossazonico planare e due porzioni pentapeptidiche cicliche identiche, Doxorubicina e Daunorubicina (fig.4), formate da un nucleo antraciclinico planare legato, attraverso un legame glicosidico ad un amino zucchero non usuale chiamato daunosamine.;



**Figura 5.** Struttura molecolare della Daunorubicina e Actinomicina

D

La capacità d'intercalazione di questi composti nella doppia elica del DNA è il fattore che determina la loro attività biologica e la citotossicità. I risultati ottenuti dai diversi studi di molecular modeling e cristallografici realizzati con i complessi farmaco-Sequenze nucleotidiche, hanno permesso d'ipotizzare il meccanismo d'interazione di questi composti con il DNA. Il cromoforo planare s'intercala perpendicolarmente all'asse della doppia elica, generalmente fra due paia di basi guanina-citosina vicinali, mentre i lattoni ciclici o la porzione zuccherina interagiscono con lo scheletro di zucchero e fosfato formando legami a idrogeno ed interazione idrofobiche che stabilizzano ulteriormente il complesso formato. Dopo l'intercalazione si verificano una serie d'eventi molecolari che compromettono le funzioni più importanti del DNA inclusa la sintesi e la trascrizione, per inattivazione di enzimi implicati in tali processi (RNA polimerasi, DNA polimerasi, topoisomerasi ecc) fig. 5.



**Figura 6.** *Complesso DNA – Daunorubicina*

Inoltre, l'attività citotossica di questi composti è incrementata dal verificarsi di un fenomeno di sinergismo d'azione derivante dalla contemporanea presenza della struttura planare, il cui ruolo nell'intercalazione è stato già precedentemente delineato, e del sistema ossido-riduttivo chinonico che può tradursi sia nella rottura di uno o di entrambi i filamenti, sia nello scambio di cromatidi omologhi. Tali rotture possono avvenire attraverso due differenti meccanismi:

- a) enzimatico, per inattivazione di enzimi coinvolti nei processi di riparazione iniziati dalle topoisomerasi
- b) attraverso la generazione di radicali liberi dovuta all'interazione con il citocromo P450 riduttasi in presenza di NADPH.

In questo caso si ha la formazione di intermedi semichinonici, in grado di interferire con le reazioni redox intracellulari, di generare ioni superossidi e specie radicaliche altamente lesive per la cellula.

Le neoplasie attualmente più sensibili alla chemioterapia antitumorale sono quelle con indice di crescita elevato; d'altra parte, i tessuti normali a rapida attività proliferativa (*midollo osseo, follicoli piliferi ed epitelio intestinale*) sono più soggetti ad essere danneggiati e ciò spesso pone dei limiti all'impiego di alcuni farmaci. Al contrario, i tumori con un basso indice di crescita spesso non rispondono ai farmaci citotossici.

Una delle caratteristiche biologiche più importanti delle neoplasie è la loro eterogeneità biologica presente non solo tra l'una e l'altra ma anche all'interno di una stessa popolazione neoplastica.

L'efficacia della terapia antitumorale è anche ostacolata dai diversi meccanismi di *chemioresistenza* espressi nei vari subcloni cellulari. La migliore strategia terapeutica è quindi quella di associare più farmaci insieme (*polichemioterapia*).

## 2. Progetto

### 2.1. Farmaci a struttura chinonica con attività intercalante.

Con il termine *farmaci antiproliferativi o citotossici* si indicano quei farmaci la cui attività consiste nella distruzione di cellule o nella inibizione della replicazione cellulare. Pertanto essi interagiscono con il ciclo cellulare, cioè quella serie di eventi che si verificano in successione in tutte le cellule in proliferazione. I farmaci citotossici possono agire secondo tre principali meccanismi:

- ✓ **Interazione diretta con il DNA**
- ✓ **Interazione con la via biosintetica dei precursori del DNA e dell'RNA**
- ✓ **Interazione con enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare**

Nel primo caso, l'azione del farmaco è indipendente dal tempo di esposizione delle cellule alla sua azione mentre dipende dal livello di concentrazione della sostanza. In questo caso quindi è preferibile somministrare il farmaco con un'infusione endovenosa rapida.

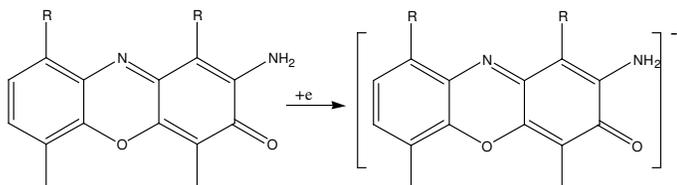
Nel secondo e terzo caso, l'effetto terapeutico dipende proprio dal tempo di esposizione perché più questo aumenta, maggiore sarà il numero di cellule ad attraversare la fase del ciclo cellulare in cui la via metabolica bloccata dal farmaco è essenziale per la sopravvivenza della cellula stessa.

Questo lavoro di tesi si è svolto all'interno di un progetto di sviluppo di nuovi agenti antineoplastici caratterizzati da meccanismo d'azione multiplo, cioè capaci di agire su differenti targets contemporaneamente. La progettazione e lo sviluppo di questi nuovi agenti antitumorali ha lo scopo di unire in un solo trattamento la capacità di azione della polichemioterapia<sup>5,6,7</sup>.

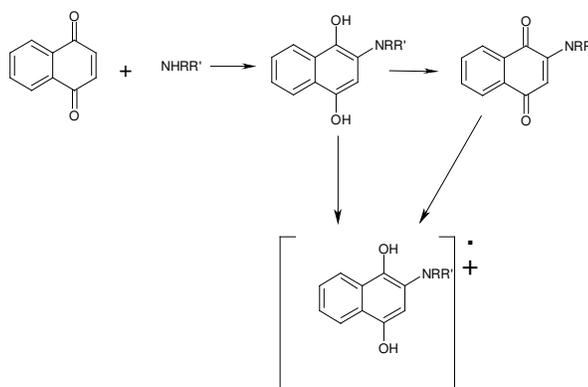
A questo scopo sono state studiate le strutture ben note della doxorubicina e dell'actinomicina D, due molecole a struttura chinonica che esplicano la loro attività antineoplastica attraverso il meccanismo di intercalazione e formazione di legami covalenti con il DNA.

Le actinomicine sono antibiotici prodotti dallo *Streptomyces parvus* e conosciute come potenti e tossici composti antiproliferativi capaci di dar luogo ad interazioni con la doppia elica del DNA, inserendosi tra tra le basi presenti nella sequenza C-G e nella sua omologa G-C attraverso un legame complesso nel quale è coinvolto anche un sito della topoisomerasi II. Inoltre la formazione di radicali superossido ed ossidrili ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ), formati nella riduzione monoelettronica del nucleo fenossazinonico ad opera di enzimi mitocondriali, determina la rottura della doppia elica e dei singoli filamenti.

Questa reattività è strettamente legata alle capacità redox dei chinoni e degli imminochinoni che danno luogo a specie radicaliche non solo per opera di reattivi redox come  $\text{Fe}^{+3}\text{-Fe}^{+2}$ ,  $\text{NADH-NADH}_2$ ,  $\text{NADPH-NADPH}_2$ ,  $\text{FAD-FADH}$ ,

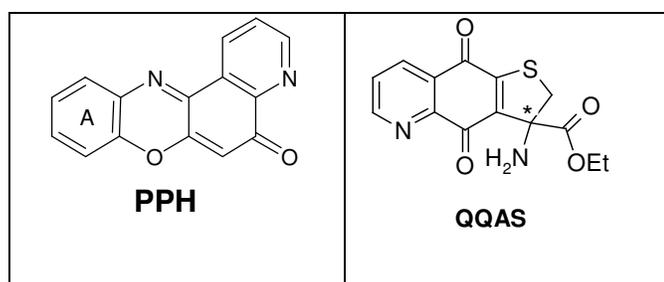


ma anche a seguito di reazioni di addizione al sistema  $\alpha,\beta$ -insaturo del motivo chinonico. All'addizione di un nucleofilo sul chinone fa infatti seguito una riduzione del sistema che poi può ancora riossidarsi passando attraverso specie radicaliche.



L'attacco di specie radicaliche è particolarmente rapido ed efficiente e porta a rotture irreparabili della doppia elica e dei singoli filamenti di DNA<sup>22</sup>.

Utilizzando le actinomicine come modello è stato possibile sviluppare due strutture PPH( 5H-pirido-[3,2-a] fenossazin-5-one e QQAS (etil-3-amino-4,9-diosso-2,3,4,9 tetraidrotieno[2,3g]quinoline-3 carbossilato), come *Lead compounds* di due serie di molecole di natura chinonica<sup>8,9,10,11,12</sup> con possibile attività antiproliferativa.



**Figura 7**-Strutture molecolari del PPH (5H-pirido-[3,2-a] fenossazin-5-one) e QQAS (etil-3-amino-4,9-diosso-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3g]quinoline-3 carbossilato),

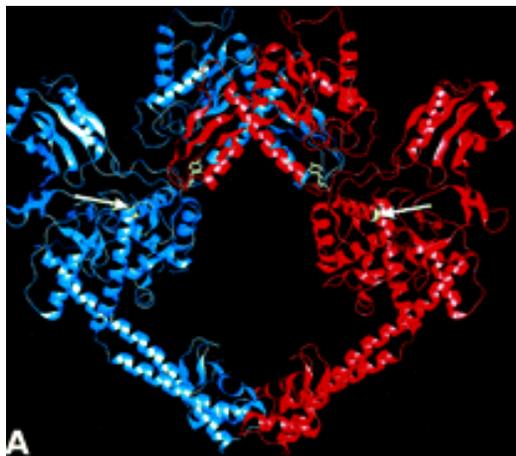
PPH e QQAS sono costituite da sistemi policiclici aromatici planari uno dei più importanti requisiti per l'intercalazione di un composto tra le coppie di basi puriniche e pirimidiniche del doppio *strand* del DNA.

Le strutture di PPH e QQAS sono state razionalizzate mediante studi computazionali su composti modello l' *Actinomicina D* e la *Doxorubicina*. L'elevata stabilità del complesso *Actinomicina D*-DNA, favorito da *forze di Van der Waals*, impedisce la trascrizione della RNA-polimerasi e quindi la sintesi dell' RNA. Inoltre, l' *actinomicina D* causa frammentazioni dei

filamenti del DNA a causa della formazione di radicali ossidrilici e blocco della duplicazione cellulare anche attraverso un' interazione con la topoisomerasi II<sup>6,8</sup>.

Le topoisomerasi sono enzimi nucleari che rilassano il DNA superavvolto attraverso tagli reversibili o ad un singolo filamento del duplex, come la *topoisomerasi I*, o ad entrambi, la *topoisomerasi II*. In tutti i casi l'elica viene reversibilmente interrotta attraverso la formazione di un legame fosfodiesterico tra l'OH della tirosina dell'enzima (Tyr<sup>805</sup> nella topoisomerasi umana) e il gruppo fosforico del DNA. Il taglio consente all'estremità libera dell'acido nucleico di ruotare, risolvendo il superavvolgimento. A questo punto l'OH dell'estremità libera del DNA può ripristinare la continuità dell'elica attaccando il fosfato<sup>17</sup>.

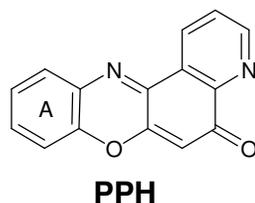
Una recente determinazione della struttura cristallina della porzione centrale (amminoacidi 410-1202) della topoisomerasi II di *Saccharomyces Cerevisiae* ha rivelato come questo enzima sia una proteina omodimerica a forma di cuore con grossi buchi di 5,5 nm entro cui potrebbero adattarsi le eliche di DNA durante la reazione di rottura e risaldatura (fig. 8).



**Figura 8-** Struttura cristallina del core (aa 410-1202) della topoisomerasi II di *Saccharomyces Cerevisiae*. La topoisomerasi II è un enzima omodimerico nucleare che rilassa il DNA superavvolto attraverso tagli reversibili ad entrambi i filamenti del dsDNA. Le frecce bianche indicano delle insenature di 5,5 nm entro cui potrebbero adattarsi le eliche di DNA durante la reazione di rottura e risaldatura.

Come risulta dal presente paragrafo, la topoisomerasi gioca un ruolo molto importante nella fisiologia della duplicazione cellulare, pertanto il mio progetto di tesi si propone, utilizzando i *lead compounds* PPH e QQAS di apportare modifiche a queste strutture in modo tale da renderle capaci di coinvolgere ed inibire l'attività delle topoisomerasi<sup>17,18,19</sup>.

### 3. Il 5*H*-pirido- [3,2-*a*] fenossazin-5-one (PPH).



Questo composto, precedentemente sintetizzato e caratterizzato nel laboratorio dove ho svolto la ricerca relativa alla mia tesi di dottorato, è stato sottoposto a test biologici da cui si è evinto che ha un'attività citotossica submicromolare ( $IC_{50} \approx 0.001 \mu\text{M}$  circa, Tab. 4) su molte linee cellulari provenienti da tumori liquidi e solidi e che intercala la doppia elica del DNA (Saggi di unwinding, Titolazioni con DNA di calf thymus e un ottamero  $[d(\text{GAAGCTTC})]_2$  analizzate mediante spettroscopia UV-VIS ed  $^1\text{H}$  NMR). Questo imminochinone ha un potenziale redox compatibile con quello dei sistemi redox biologici ed è in grado di produrre radicali (ROS) che, attaccando il DNA, ne distrugge l'assetto (Studi EPR e Saggi della cometa) .

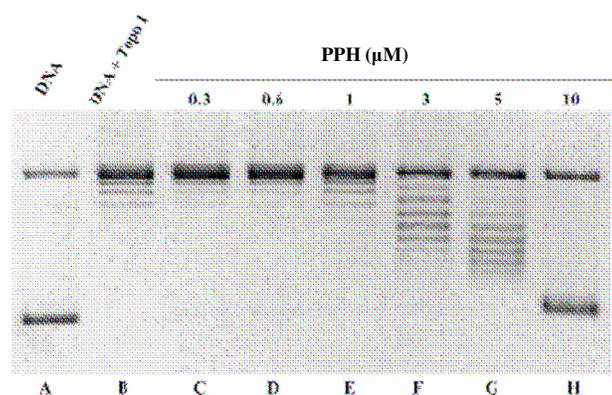
compd	$IC_{50}^a$ ( $\mu\text{M}$ )				
	CCRF-CEM	CCRF-SB	MT-4	HeLa	Hep-2
<b>PPH</b>	0.01	0.009	0.01	0.2	0.04
doxorubicin <sup>b</sup>	0.02	0.03	0.01	0.07	0.04
AMD <sup>b</sup>	0.001	0.002	0.001	0.008	0.004

Tab.:4 Attività citotossica di PPH

I saggi di unwinding (in presenza della *topoisomerasi I*) hanno dimostrato che PPH causa uno srotolamento di un plasmide superavvolto.

Il saggio consiste di una corsa elettroforetica su gel di agarosio di un plasmide, nel nostro caso è *SV40*, da solo, in presenza di topoisomerasi I e di concentrazioni crescenti di PPH.

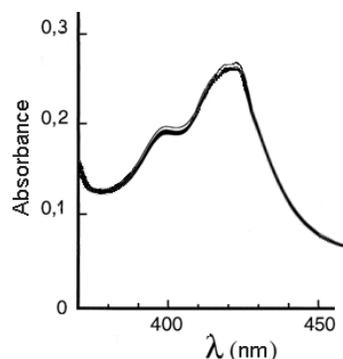
A concentrazioni 3  $\mu\text{M}$  di PPH si osserva l' annullamento dell'azione della topoisomerasi I, cioè non si vede più la presenza del DNA superavvolto (figura 9).



**Figura.: 9:** Influenza di PPH sulla topologia di DNA circolare. Nativo supercoiled SV40 DNA (A) trattato con topoisomerasi I in assenza di PPH (B) o in presenza di diverse concentrazioni di PPH (C-H) per 60 minuti a 37 °C. Le reazioni bloccate e analizzate su 1% gel di agarosio in TAE tampone. I topoisomeri vengono evidenziati con bromuro d'etidio.

L'indagine spettrofotometrica per determinare le proprietà intercalative del nostro composto è stata effettuata mediante una titolazione di una soluzione di PPH in tampone fosfato pH 7 con una soluzione di DNA di calf Thymus nello stesso tampone. Lo spettro del complesso DNA/PPH ha mostrato gli effetti caratteristici dell'intercalazione (figura 10), ipocromismo, cioè una riduzione del coefficiente di estinzione molare del 30% ed uno spostamento della banda di

assorbimento di PPH verso il rosso, da 442 nm a 447 nm e dei due punti isosbastici a 320 nm e 515 nm. La presenza dei punti isosbastici indice di una trasformazione uno a uno, suggerisce che si forma una sola specie del complesso tra il composto e il DNA.



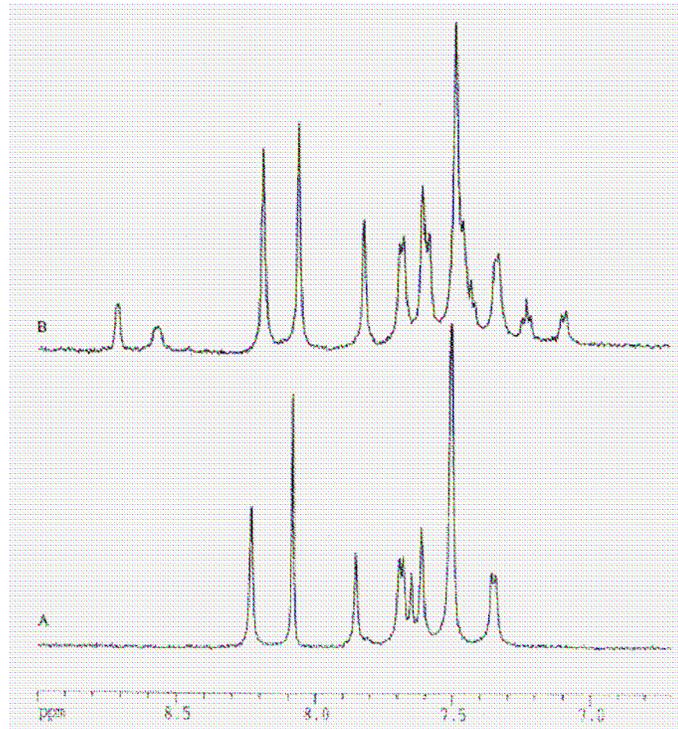
**Figura 10**-Sovrapposizione dello spettro di assorbimento del PPH e del complesso PPH/DNA di Calf Thymus eseguito in tampone fosfato a pH 7

Il processo di intercalazione di PPH nel DNA è stato ulteriormente studiato mediante spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR attraverso una titolazione in tampone fosfato deuterato di PPH con un ottametro appositamente preparato e contenente le sequenze G-C. Questo ottamero  $[\text{d}(\text{GAAGCTTC})]_2$  è noto per essere stato usato più volte nello studio del meccanismo intercalativo dell'Actinomicina D che è il nostro composto di riferimento. Le aggiunte di  $[\text{d}(\text{GAAGCTTC})]_2$  alla soluzione di PPH sono state effettuate fino al raggiungimento del rapporto 1:1 tra il composto testato e l'ottamero.

La (figura 11) mostra lo spostamento dei chemical shift dei protoni della regione aromatica dell'ottamero libero (A) rispetto a quelli del complesso PPH-[d(GAAGCTTC)]<sub>2</sub>. Viene riportata anche la tabella dei valori dei chemical shifts da cui si evince che i cambiamenti maggiori riguardo all'ottamero sono dovuti al protone H<sub>8</sub> (da δ 7,65 a 7,55) della guanina G<sub>4</sub> ed ai protoni H<sub>6</sub> e H<sub>5</sub> (da δ 7,36 a 7,31 e da δ 5,77 a 5,74 rispettivamente) della citosina C<sub>5</sub>. Questo dimostra che il sito di binding di PPH nell'ottamero interessa l'area compresa tra le due basi G<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>.

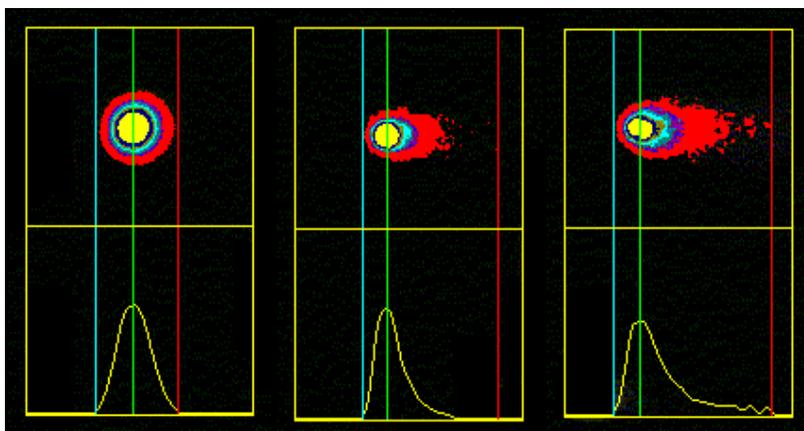
Per provare che il DNA viene demolito dall'azione di PPH è stato anche effettuato un *comet assay*, o saggio della cometa (figura 12). Questo saggio consiste nella valutazione della rottura del DNA a seguito della formazione di radicali indotti da trattamento con un composto.

Da cellule linfoblastiche umane esposte per 1 ora a 37° C a PPH, si estrae poi il contenuto nucleare con un gel alcalino e successivamente si sottopone ad analisi elettroforetica. Questo trattamento separa, in base alla carica, i frammenti di DNA formando un nucleo ed una coda simile a quella di una cometa. Per visualizzare il nucleo e lo sciame si utilizza il bromuro di etidio.



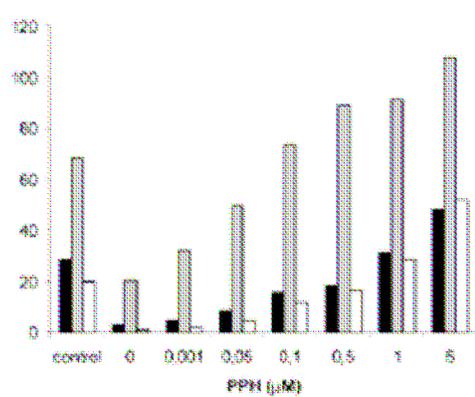
	unbounded PPH, $\delta$	PPH/d[(GAAGCTTC)] <sub>2</sub> , $\delta$	$\Delta\delta$
H-1	8.96	8.56	-0.60
H-2	7.88	7.58	-0.30
H-3	9.02	8.71	-0.31
H-6	6.54	6.25	-0.29
H-8	7.51	7.10	-0.41
H-9	7.63	7.42	-0.21
H-10	7.41	7.22	-0.19
H-11	7.88	7.43	-0.45
guanine G4 in			
	[d (GAAGCTTC)] <sub>2</sub> , $\delta$	PPH/d[(GAAGCTTC)] <sub>2</sub> , $\delta$	$\Delta\delta$
H-8	7.65	7.55	-0.10
cytosine C5 in			
	[d (GAAGCTTC)] <sub>2</sub> , $\delta$	PPH/d[(GAAGCTTC)] <sub>2</sub> , $\delta$	$\Delta\delta$
H-5	5.52	5.53	+0.01
H-6	7.36	7.31	-0.05

**Figura.11**-Assegnazione del Chemical Shift dei protoni di PPH, di Guanina G4 e Citosina C5 nel libero ottamero [(GAAGCTTC)]<sub>2</sub> e loro paragone con il complesso PPH/d[(GAAGCTTC)]<sub>2</sub>.



**Figura 12**-comet assay di cellule linfoblastiche umane trattate con PPH per 1 ora a 37° C. Il saggio ci permette di valutare la rottura del DNA a seguito della formazione di radicali indotti dal trattamento con il PPH; l'analisi elettroforetica dimostra che lo sciamme aumenta all'aumentare delle concentrazioni di PPH. Per visualizzare in nucleo e lo sciamme si utilizza l'etidio bromuro.

I risultati del comet assay effettuato con PPH sono riportati in (figura 12) e mostrano un aumento della percentuale della lunghezza della coda e della sua intensità all'aumentare delle concentrazioni di farmaco con il quale sono state incubate le cellule. Di seguito è riportata la tabella 5 con i dati numerici relativi al saggio, e la loro rappresentazione in istogramma (figura 13).

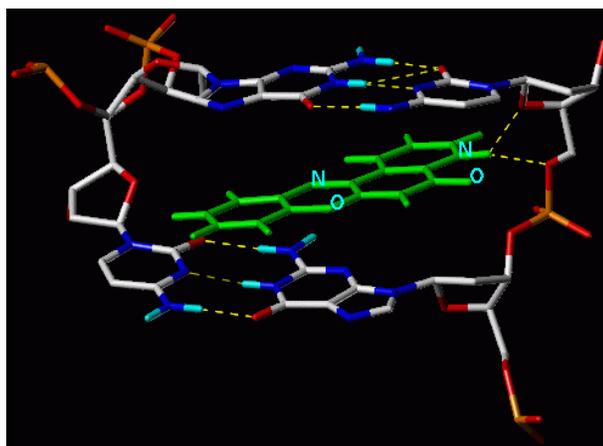
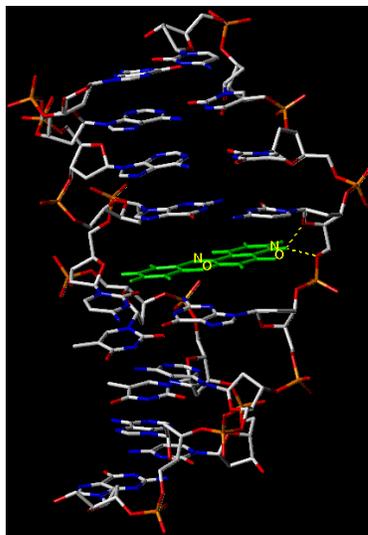


**Figura 13**-Istogramma dei dati ottenuti dal comet assay utilizzando il PPH

PPH ( $\mu\text{M}$ )	Tail DNA (%)	Tail lenght ( $\mu\text{M}$ )	Tail Moment ( $\mu\text{M}$ )
Ctrl positivo	$28.7 \pm 1.9$	$68.5 \pm 1.8$	$19.8 \pm 1.3$
0	$2.99 \pm 0.98$	$20.2 \pm 1.6$	$0.80 \pm 0.31$
0.001	$4.85 \pm 0.43$	$32.4 \pm 3.9$	$1.77 \pm 1.15$
0.05	$8.75 \pm 1.31$	$49.4 \pm 3.3$	$4.52 \pm 0.91$
0.1	$15.6 \pm 1.2$	$73.5 \pm 2.5$	$11.6 \pm 1.3$
0.5	$18.3 \pm 2.1$	$89.2 \pm 4.2$	$16.5 \pm 1.6$
1	$31.4 \pm 2.3$	$91 \pm 3$	$28.7 \pm 3.2$
5	$48.2 \pm 3.2$	$108 \pm 4$	$52.2 \pm 3.9$

**Tabella 5**-Sono riportati i dati ottenuti dal comet assay eseguito con PPH

Studi di molecular modeling<sup>23,24,25</sup> hanno inoltre permesso di costruire un modello di interazione tra l'ottamero d[(GAAGCTTC)]<sub>2</sub> ed il PPH dove si vede che l'azoto piridinico protonato a pH fisiologico (pKa= 5,6) è in grado di formare un *legame idrogeno* con l'O4' dell'anello di desossiribosio della citosina C5, nel sito di intercalazione. Lo stesso azoto piridinico protonato può formare altri due legami idrogeno con l'O5' dello scheletro fosfato presente tra la guanina G4 e la citosina C5, e con l'O1 del gruppo fosfato della citosina C5. La stabilità del complesso è incrementata da interazioni di  $\pi$ - $\pi$  staking dove le basi citosina e guanina fanno da donatori di densità elettronica al sistema immuno-chinonico elettron-povero di PPH.



**Figura 14-**Molecular Modelling dell'intercalazione del PPH nell'ottamero  $d[(GAAGCTTC)]_2$  di DNA considerato

Come già detto in precedenza l'intercalazione nel DNA non è l'unico meccanismo di azione dei piridofenossazinoni come PPH. Il sistema imminochinonico presente nella struttura di PPH, può dar luogo sia alla formazione di radicali che rompono il DNA, sia essere coinvolto nella chelazione metalli bivalenti necessari alla funzionalità del processo duplicativo cellulare.

Due elementi importanti da sottolineare riguardo al meccanismo d'azione della molecola sono anche la sua bassa citotossicità nei confronti delle cellule normali e quelle in fase di *resting*, rispetto all' *actinomicina D* ed un effetto antiproliferativo importante anche sulle cellule che hanno sviluppato resistenza verso altri farmaci antitumorali come *doxorubicina*, *actinomicina D*, *etoposide* e *vincristina*<sup>5,9,10</sup>.

	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)		
	PBL-resting <sup>b</sup>	PBL-PHA <sup>c</sup>	leukemia <sup>d</sup>
PPH	5.0 (±0.2)	0.03 (±0.003)	0.04
AMD	0.002 (±0.001)	0.005 (±0.001)	0.003
doxorubicin	0.09 (±0.03)	0.04 (±0.005)	0.02

**Tabella 6-**Attività citotossica di PPH su linfociti normali

compd	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)			
	KB <sub>WT</sub> <sup>b</sup>	KB <sup>MDR</sup> <sup>c</sup>	KB <sup>TD</sup> <sup>d</sup>	KB <sup>V20C</sup> <sup>e</sup>
PPH	0.1 (±0.1)	0.04 (±0.02)	0.02 (±0.01)	0.06 (±0.02)
doxorubicin	0.06 (±0.02)	1.8 (±0.1)	2.8 (±0.2)	0.4 (±0.1)
AMD	0.005 (±0.001)	0.2 (±0.1)	0.2 (±0.1)	0.05 (±0.01)
vincristine	0.006 (±0.001)	0.7 (±0.2)	0.05 (±0.01)	0.2 (±0.1)
etoposide	0.6 (±0.1)	>20	>20	6.2 (±1.2)

**Tabella 7-**Effetto di PPH sulla proliferazione di cellule normali e su cellule che hanno sviluppato resistenza ai trattamenti chemioterapici

Quest'ultimo dato è di grande interesse applicativo in quanto il prodotto potrebbe essere utilizzato come farmaco.

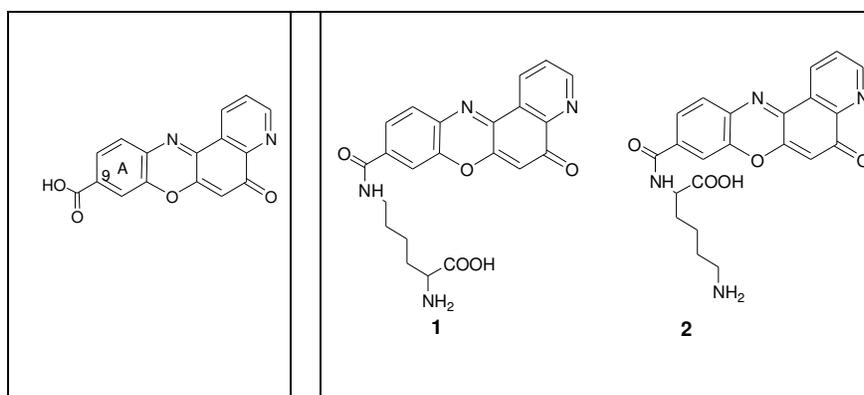
Proseguendo le nostre indagini su questa molecola così promettente abbiamo anche indagato se interferisse o meno con le *topoisomerasi* enzimi che intervengono nel processo duplicativi del DNA.

I saggi effettuati hanno dimostrato che PPH non altera l'attività catalitica di Topo 1 e Topo II.

Abbiamo allora cercato di derivatizzare PPH legandolo a catene alchilamminiche con l'obiettivo di ampliare ulteriormente il suo spettro d'azione .

### 3.1. Acido 5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossilico

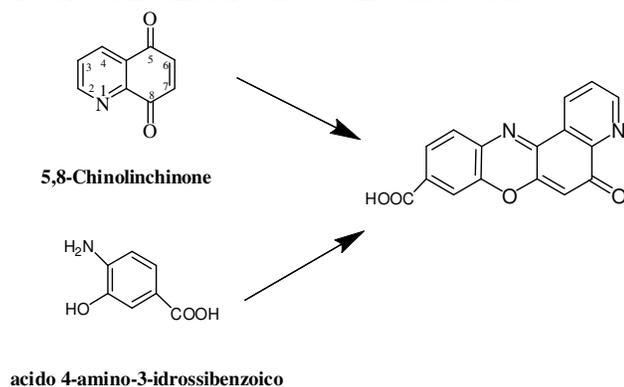
Attraverso uno studio computazionale di molecular modeling, effettuato dal Professor Antonio Lavecchia della Facoltà di Farmacia dell'Università Federico II, è stato evidenziato che vaste aree delle topoisomerasi coinvolte nel legame col DNA durante il processo replicativo contengono numerosi gruppi carbossilici liberi provenienti da residui amminoacidici acidi. Questo dato strutturale ci ha indotto a progettare una nuova serie di derivati di PPH contenenti un braccio alchilamminico costituito da un amino acido basico come la lisina capace di interagire con i siti negativi della topo. In particolare, la lisina è stata legata attraverso un legame ammidico ad un carbossile posto in posizione 3 sul sistema fenossazinonico di PPH. Questa scelta è stata effettuata in accordo con i dati progettuali provenienti dallo studio computazionale.



**Figura.15-** Acido 5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossilico;

1) Acido 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossamido)esanoico, 2) Acido 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossamido) esanoico

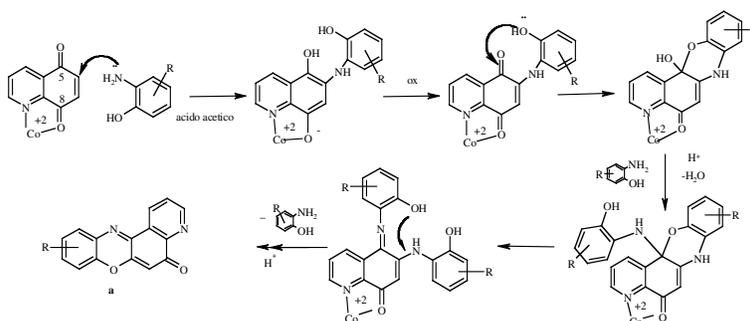
Pertanto è stato così sintetizzato il 9-carbossi derivato di PPH (PPH-COOH) attraverso una sintesi condotta in acido acetico



a partire da 5,8-chinolinchinone e da un acido 4-ammino-3-idrossi benzoico.

Il 5,8-chinolinchinone non è in commercio ed è stato da noi preparato a partire dalla 5-ammino-6-idrossi chinolina per ossidazione con dicromato di potassio in ambiente acido di HCl.

La reazione è assistita da un metallo di transizione (figura.15),  $\text{Co}^{2+}$ , che dando luogo ad un complesso tra l'azoto in posizione 1 e l'ossigeno in posizione 8 determina un parziale spostamento della carica positiva in grado di innalzare le rese e la selettività per l'isomero a.



**Figura.:15** Ipotesi del meccanismo di reazione relativo alla sintesi del PPH

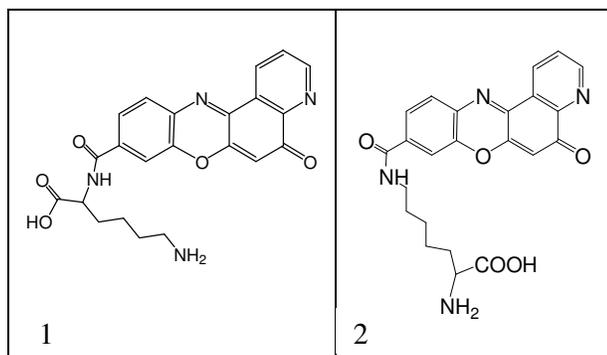
La purificazione e caratterizzazione del prodotto è stata eseguita con tecniche cromatografiche e spettroscopiche.

**3.2. Acido 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossamido) esanoico e Acido (1) 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossamido)esanoico (2).**

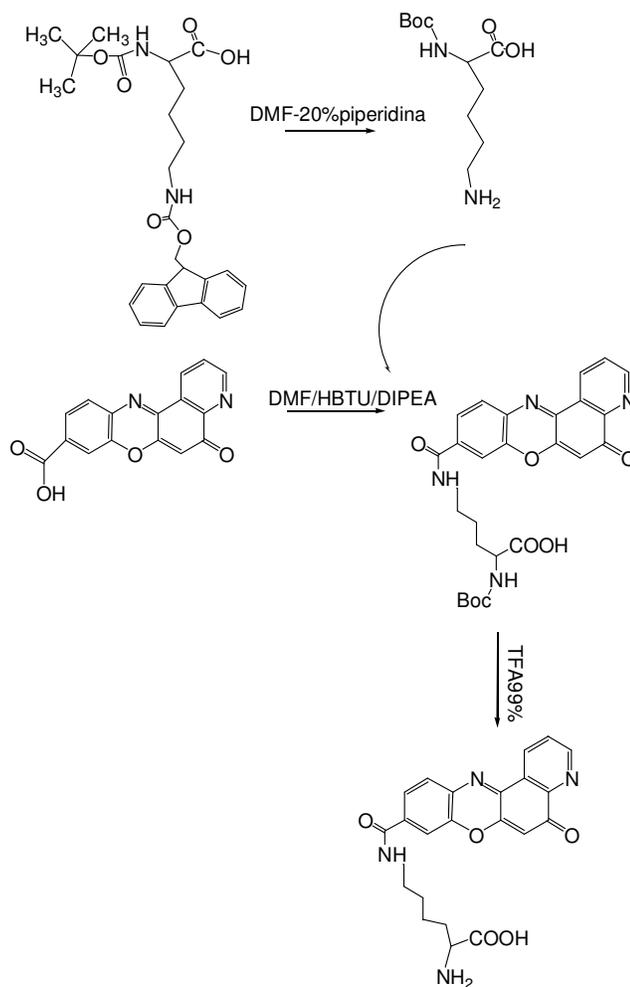
L'acido 5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbossilico, sintetizzato come precedentemente riportato, è stato derivatizzato con la lisina per formazione di un legame ammidico che ha coinvolto alternativamente l'ammino gruppo in  $\alpha$  ed in  $\epsilon$ . I due differenti derivati sono stati ottenuti utilizzando le comuni tecniche di protezione degli ammino gruppi degli amminoacidi.

Pathway della derivatizzazione del composto PPH-9-COOH con L-Lisina, figura 17.

1. Fmoc-L-Lisina-BocOH e Boc-L-Lisina-FmocOH. Le Lisine vengono deprotette idrolizzando il gruppo Fmoc in ambiente basico (piperidina 20 %)
2. Le Lisine deprotette rispettivamente all'ammino gruppo in  $\alpha$  ed  $\epsilon$ , isolate per cromatografia, sono state messe a reagire con il derivato carbossilato di PPH in DMF utilizzando HBTU e DIPEA.
3. I composti ottenuti vengono deprotetti idrolizzando il gruppo Boc in TFA, e successivamente isolati purificati con tecniche cromatografiche e caratterizzati mediante NMR e Spettrometria di Massa come acidi 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbosamido) esanoico e 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbosamido)esanoico, rispettivamente, figura 16.



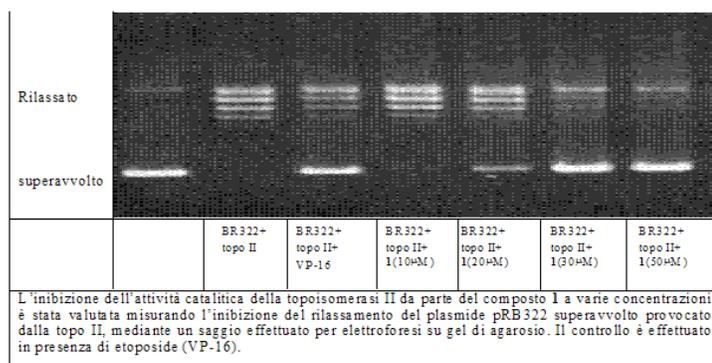
**Figura 16-1** acidi 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbosamido) esanoico **1** e **2** 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-a]fenossazin-9-carbosamido)esanoico.



**Figura 17**-Schema di sintesi dei derivati di PPH-CO-NH-Lys

I due derivati di PPH-9-COOH **1** e **2** sono stati sottoposti a valutazione biologica per la loro attività antiproliferativa su tre linee cellulari di tumori umani liquidi e solidi ed hanno dimostrato di inibire la crescita di **MT4** (*human acute T-lymphoblastic leukemia*), **Hela** (*cervix carcinoma*) ed **HT29** (*human colon adenocarcinoma*) a concentrazioni nanomolari con un  $IC_{50}= 0.00001 \mu\text{m}$  e  $IC_{50}=0.0001 \mu\text{m}$ .  $IC_{50}=0.0005 \mu\text{m}$ , rispettivamente.

E' stata anche indagata la capacità dei composti di inibire l'attività enzimatica delle Topo II. A tal fine è stato condotto un saggio utilizzando il plasmide pBR322 in presenza di topoisomerasi II e usando come controllo l'etoposide VP-16, un ben noto composto inibitore delle topoisomerasi attualmente in uso clinico.



**Figura 18**-Saggio unwinding per l'inibizione della topo II

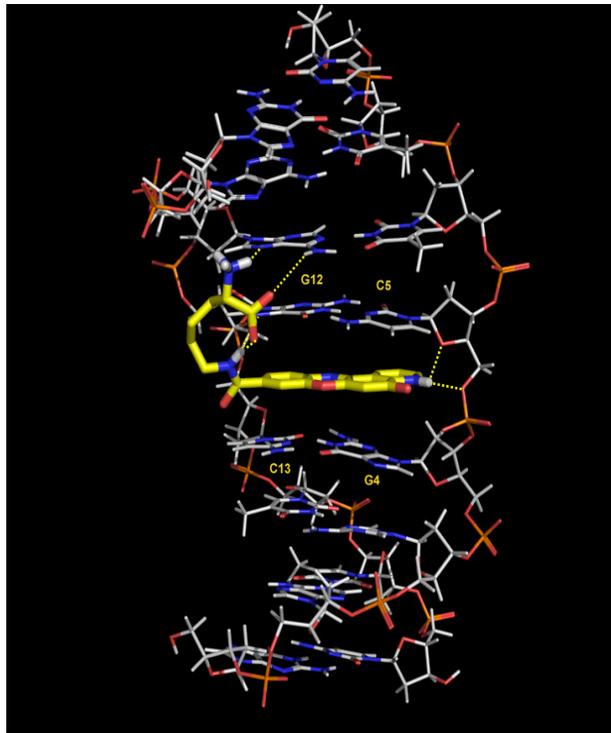
Come si vede dalla figura 18 all'aumentare della concentrazione di composto aumenta la frazione di DNA superavvolto dimostrando la capacità di queste molecole di interferire con l'attività enzimatica della topoisomerasi. I saggi sull'attività biologica dei prodotti sintetizzati sono

stati effettuati dal professor Stefano Pepe del dipartimento di *Oncologia* della *Facoltà di Medicina e chirurgia* dell'Università Federico II. Ulteriori indagini sull'attività farmacologia di questi composti e il loro meccanismo d'azione sono attualmente in corso .

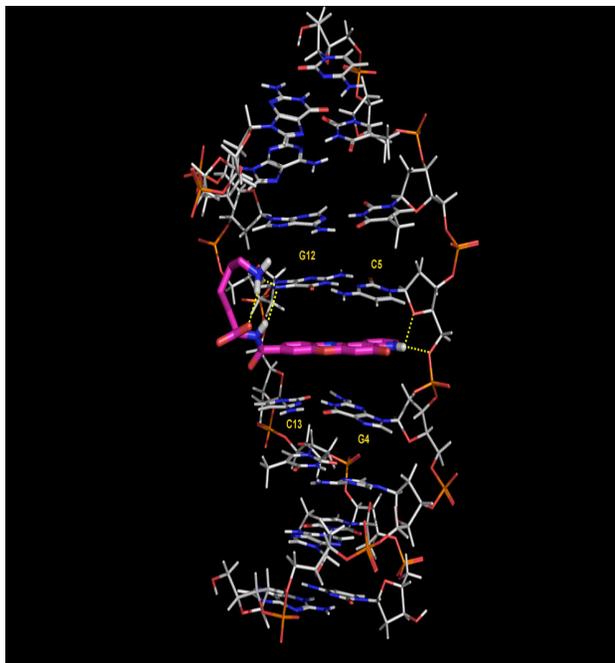
Tuttavia, i primi risultati relativi al un meccanismo di interazione tra le suddette molecole **1** e **2**, il DNA e le Topo II dovuti allo studio di modelling eseguiti al Professore Antonio Lavecchia della Facoltà di Farmacia della Federico II hanno portato ai modelli intercalativi presentati nelle figure 19 e 20 dove i composti **1** e **2** intercalano nel solco maggiore dell'ottamero d[(GAAGCTTC)]<sub>2</sub> tra la Guanina la Citosina come PPH. Inoltre, la Lisina, legata attraverso il gruppo amminico in ε è in grado di formare legami idrogeno con l'Adenina in posizione 3 attraverso l'interazione tra l'ossigeno del gruppo carbossilico ε il gruppo amminico (in posizione 6 della Adenina 3. Inoltre il gruppo amminico del carbonio in α, può formare un ulteriore legame idrogeno con l'N in posizione 7 della stessa base azotata. Infine si osserva un'ultima interazione tra l'O del gruppo carbossilico e il gruppo amminico in ε della stessa lisina.

La Lisina legata attraverso l'amino gruppo in  $\alpha$ , figura 20, invece, è in grado di formare legami che coinvolgono la Guanina in posizione 4

Tale interazione è resa possibile grazie ad un legame idrogeno che si forma tra il gruppo amminico in  $\epsilon$  e il gruppo carbossilico presenti sulla Lisina, che determina il ripiegamento su sé stessa della struttura amminoacidica. Tale conformazione consente dunque al gruppo amminico in  $\epsilon$  di formare un secondo legame idrogeno con l'N in posizione 7 della Guanina 4.



**Figura 19**-Immagine 3D della struttura del complesso Lys - $\epsilon$ NH-CO-PPH/[GAAGCTTC]<sub>2</sub> ottenuta con metodi computazionali di minimizzazione dell'energia.



**Figura 20**-Immagine 3D della struttura del complesso Lys- $\alpha$ NH-CO-PPH/[GAAGCTTC]<sub>2</sub> ottenuta con metodi computazionali di minimizzazione dell'energia.

Come già detto, la scelta dell' amminoacido Lisina per derivatizzare il carbossile in 9 i PPH è relativa al nostro interesse a coinvolgere nel legame PPH-DNA anche la topoisomerasi che contiene vaste aree caratterizzate da residui di amminoacidi acidi con i quali si potrebbero formare forti interazioni. Anche l'ingombro sterico del residuo di lisina legato allo scheletro della doppia elica può impedire il corretto posizionamento e la funzionalità della Topoisomerasi.

### 3.3. Parte Sperimentale

#### 3.3.1 Materiali e metodi

Reagenti, materiale di partenza e i solventi sono stati acquistati presso Merck, Novartis, e Carlo Erba . Sono state utilizzate TLC analitiche di spessore 0.25mm di gel di silice e TLC preparative di 0,5 mm di spessore di gel di silice e di grandezza 20x20 su lastra di vetro. Gel di silice 60 (300-400 mesh), Merck, è stata usata per le flash cromatografie. I punti di fusione sono stati ottenuti con l'apparato Kofler.

Con un polarimetro Perkin-Elmer-241 MC sono state determinate le proprietà ottiche. Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati eseguiti con uno spettrometro Bruker-500. I chemical shifts sono stati riportati in  $\delta$  relativamente al  $\text{Me}_4\text{Si}$ , a gli J riportati in Hz. Gli spettri di massa sono stati ottenuti usando un EI a 70 eV con spettrofotometri ZAB 2F e FABMS

### 3.3.2.-Ossidazione della 5-amino-8-idrossi-chinolina con $K_2Cr_2O_7$

Una soluzione di 5-amino-8-idrossichinolina (3 mole) in 30 ml di acqua è stata trattata in imbuto separatore con una soluzione di 3 ml di acido cloridrico concentrato e di potassio dicromato (2 moli) in 30 ml d'acqua. 300 ml di cloroformio sono utilizzati per estrarre il chinone. La soluzione cloroformica lavata ripetutamente con acqua ed essiccata fornisce il chinolinchinone con rese del 60%.

### 3.3.3.-Acido **5H-pirido- [3,2-a] -fenossazin-5-one-9-carbossilico**

La sintesi dell' acido **5H-pirido- [3,2-a] -fenossazin-5-one-9-carbossilico** è stata effettuata a partire dal 5,8-chinolinchinone (2mmol) e da (2mmol) un *o*-amminofenolo opportunamente sostituito in (150 mL) acido acetico a riflusso per 4 h.

Questa sintesi procede con basse rese (7-10%), e porta alla prevalente formazione dell' isomero acido **5H-pirido- [2,3-a] -fenossazin-5-one-9-carbossilico** le cui proprietà farmacologiche sono inferiori a quelle dell' isomero **a**.

Per incrementare le rese di reazione e aumentare la selettività nei confronti dell' isomero **PPH-COOH** abbiamo utilizzato un metallo di transizione bivalente ( $Co^{2+}$ ), che genera sia un aumento della resa che un aumento della selettività verso il composto **PPH-COOH**

Varie prove, effettuate impiegando diversi metalli quali  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Hg}_2^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ , hanno messo in evidenza che il Cobalto è quello che fornisce i migliori risultati, sia a livello di rese che di selettività.

La reazione è stata evaporata sotto vuoto e il residuo solido disciolto in  $\text{CH}_3\text{Cl}$  estratto in cloroformio con acqua acidificata con  $\text{HCl}$ . L'estratto è stato anidrificato con  $\text{NaHCO}_3$  e evaporato fino a secchezza. Il prodotto solido ancora grezzo è stato purificato con flash cromatografia ( $\text{CH}_3\text{Cl}$  al 10%  $\text{MeOH}$  gradiente)

Il prodotto isolato è stato caratterizzato mediante spettroscopia NMR

**3.3.4. Preparazione dell'acido 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-*a*]fenossazin-9-carbossamido) esanoico e dell'acido 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-*a*]fenossazin-9-carbossamido)esanoico.**

Partendo dal derivato PPH-COOH si è provveduto alla formazione del legame ammidico tra il carbossile in posizione 9 del PPH-COOH e l'ammino gruppo della lisina sia in posizione  $\alpha$  che in posizione  $\epsilon$ .

Abbiamo utilizzato quindi delle lisine protette ortogonalmente dal gruppo Boc (acido labile) e Fmoc (basico labile) acquistabili in commercio dalla Novabiochem: Boc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH.

La procedura di reazione generale prevede prima la deprotezione del gruppo Fmoc (basico labile) in DMF al 20% di piperidina per 20 min. sotto agitazione a temperatura ambiente.

Purificazione della L-lisina Boc-Lys-OH deprotetta con flash cromatografia su gel di silice, è eluita con gradiente di CH<sub>3</sub>Cl al 5% MeOH.

Reazione tra PPH-COOH e la Boc-Lisina(OH) risultante viene condotta in DMF in presenza di DIPEA 1/1 con aa. e HBTU 1/1 con aa. per 20min. sotto agitazione a temperatura ambiente.

Effettuata la reazione coupling si procede con la deprotezione del gruppo Boc aggiungendo al mix di reazione TFA in rapporto 2/1 con solvente. La reazione è lasciata sotto agitazione per 5 min.

Il prodotto di reazione è sottoposto ad una estrazione acqua e cloroformio per allontanare i sali di TFA e successivamente evaporata fino a secchezza.

Allontanata la DMF il grezzo di reazione è sottoposto a purificazione con gel di silice eluita con gradiente di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 50% CH<sub>3</sub>Cl.

**5H-Pirido[3,2]fenossazin-5-one** Mp 228-9 C.UV(CHCl<sub>3</sub>) $\lambda_{\max}$ , nm (log  $\epsilon$ ):452 (3.5). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 9.18 (1H, d, J=04.5Hz), 9.08 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.96 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.71 (1H, dd, J=4.5, 8.0 Hz), 7.53 (1H, t, J=8.0 Hz), 7.49 (1H, t, J=8.0 Hz), 7.45 (1H, d, J=8.0 Hz), 7.01 (1H, s<sub>5</sub>). MS-EI m/z:264 (M<sup>+</sup>), 266(M+2, 11% M<sup>+</sup>), 268(M+4, 4% M<sup>+</sup>). Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**Acido 5H-pirido- [3,2-a ] -fenossazin-5-one-9-carbossilico**

C.UV(CHCl<sub>3</sub>) $\lambda_{\max}$ , nm (log  $\epsilon$ ):452 (3.5). <sup>1</sup>H NMR (CH<sub>3</sub>OH) 9.18 (1H, d, J=04.5Hz), 9.08 (1H, d, J=4.0 Hz), 9.05 (1H, d, J=8.1 Hz), 8.1(1H,d, j=7.2Hz) ,7.92(dd, J=7.2,2.1 Hz) 7.75(1H,d ,J=2,1), 6,63(1H,d, J=2.1)MS-EI m/z:292 (M<sup>+</sup>), 294(M+2, M<sup>+</sup>), 296(M+4, M<sup>+</sup>). Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

**Acido 6-amino-2-(5-osso-5H-pirido[3,2-*a*]fenossazin-9-carbossamido)esanoico.**

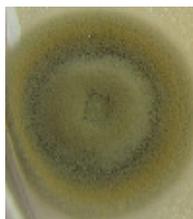
.UV(CHCl<sub>3</sub>) $\lambda_{\max}$ , nm (log  $\epsilon$ ):452 (3.5). <sup>1</sup>H NMR (CH<sub>3</sub>OH) 9.18 (1H, d, J=04.5Hz), 9.08 (1H, d, J=4.0 Hz), 9.05 (1H, d, J=8.1 Hz), 8.1(1H,d, j=7.2Hz) ,7.92(dd, J=7.2,2.1 Hz) 7.75(1H,d ,J=2,1), 6,63(1H,d, J=2.1) 3,49(1H, bt) 3.30(2H, t,) 1.78(2H,q,) 1,59(2H, q,) 1.25(2H, q,) MS-EI m/z:420 99%(M<sup>+</sup>), 422(M+2, 4%M<sup>+</sup>), Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>)

**Acido 2-amino-6-(5-osso-5H-pirido[3,2-*a*]fenossazin-9-carbossamido)esanoico** C.UV(CHCl<sub>3</sub>) $\lambda_{\max}$ , nm (log  $\epsilon$ ):452 (3.5). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 9.18 (1H, d, J=04.5Hz), 9.08 (1H, d, J=4.0 Hz), 9.05 (1H, d, J=8.1 Hz), 8.1(1H,d, j=7.2Hz) ,7.92(dd, J=7.2,2.1 Hz) 7.75(1H,d ,J=2,1), 6,63(1H,d, J=2.1)catena epsilon 4,45(1H, bt) 2.65(2H, t,) 1.82(2H,q,) 1,55(2H, q,) 1.25(2H, q,) MS-EI m/z:420 (99% M<sup>+</sup>), 422(M+2, 3.8% M<sup>+</sup>), Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 3.4 Basidiomiceti

Classificati tra gli organismi più resistenti e diffusi i funghi sono capaci di effettuare numerose reazioni di interesse biologico. Essi possono diventare vere e proprie bio-fabbriche per la produzione di svariate molecole. Inoltre, a differenza delle piante che hanno un ciclo di crescita lento, i funghi possono essere utilizzati facilmente. Una coltura per la produzione di una molecola specifica può essere pronta per iniziare la produzione in una settimana.

Nel nostro laboratorio si sta esplorando la possibilità di utilizzare una classe di *Basidiomiceti* appartenente al genere *Boletus* in collaborazione con il Professore Antonino Pollio del Dipartimento di Biologia Vegetale della Università degli Studi di Napoli Federico II.



**Figura 21**-Ingrandimento di una capsula di petri contenente coltura fungina di basidiomicete

A tal proposito il fungo è stato fatto moltiplicare su un terreno di coltura solido PDY. Successivamente è stato trasferito in un terreno liquido PDY addizionato con PPH-COOH in concentrazione 100  $\mu$ M.

Le colture sono cresciute per 20 giorni sotto agitazione a t.a. in parallelo con una cultura di controllo.

Dopo tale periodo, si è osservato che le colture contenenti PPH-COOH rispetto ai riferimenti erano cresciute di circa il 30% in meno.

Le sospensioni fungine sono state allora filtrate per separare la fase solida (massa fungina) dalla fase liquida. Le due fasi sono state analizzate separatamente



**Figura 22**-Cultura di basidiomicete in terreno liquido di PDY

Nessuna traccia del PPH-COOH aggiunto o di suoi derivati è stata rinvenuta nel filtrato, mentre la massa fungina sembrava aver assorbito il composto dal terreno di coltura.

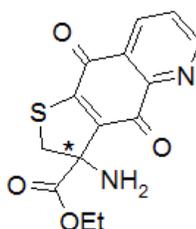
Per determinare se PPH-COOH ( $\epsilon=14000$ ) fosse adsorbito sul fungo, la massa fungina è stata lavata ripetutamente con una soluzione tampone fosfato a pH 7, tampone nel quale il nostro composto è largamente solubile. Le acque di lavaggio sono state estratte con solventi organici ma

nell' estratto non è stata rilevata alcuna traccia del PPH-COOH o di suoi derivati, con ciò permettendoci di escludere che la molecola fosse stata assorbita o depositata nelle parti più esterna del fungo.

Il fungo, in fine, è stato lavato con acetone per eliminare una parte dell'acqua contenuta nella massa e successivamente con metanolo. L'estratto metanolico si presentava di colore giallo intenso ( $\lambda$  450-60 nm), come la nostra molecola, rivelando la probabile presenza di un derivato di PPH.

L'estratto metanolico è stato concentrato a secchezza e purificato cromatograficamente su gel di silice (eluited con  $\text{CHCl}_3$ ). Il prodotto, un olio giallo, è stato sottoposto a indagine spettroscopica mediante spettrometria di massa ES. La massa rilevata è pari a  $m/z:420$  ( $M^+$ ),  $422(M+2)$ , dimostrando che la molecola presenta l'aggiunta di una catena corrispondente all'amminoacido lisina.

**4. L'etil 3-amino-4,9-dioxo-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]quinoline-3-carbossilato (QQAS)**

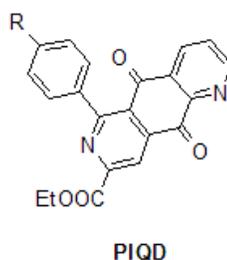


**QQAS**

I risultati finora riportati hanno evidenziato che il motivo chinolinchinonico gioca un ruolo importante nell'attività antiproliferativa nelle varie famiglie di composti esaminati. E' inoltre stato riportato che molecole contenenti dioni come imidazolin-dioni<sup>26</sup>, pirimidine-dioni<sup>27</sup>, e piperazine-dioni<sup>28</sup> svolgono la loro attività antitumorale attraverso un meccanismo di azione che include la chelazione<sup>29</sup> di metalli e l'inibizione enzimatica delle topo II<sup>30</sup>.

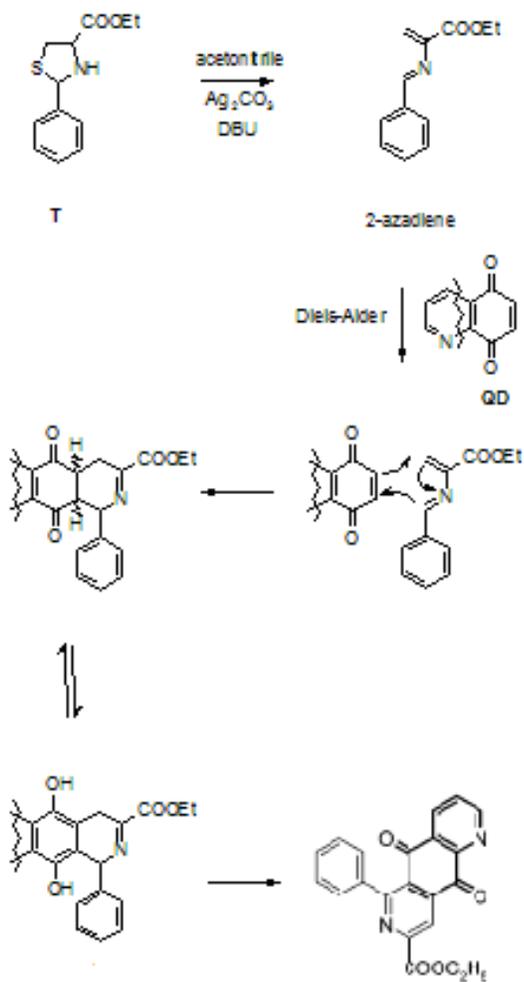
Abbiamo pertanto progettato e sintetizzato una nuova serie di composti derivati da QQAS contenenti il motivo chinolinchinonico. QQAS si ottiene dalla reazione tra il chinolinchinone e l'estere etilico della 2-aril-1,3-tiazolidina (T) in ambiente basico con DBU e Argento Carbonato. Da

questa reazione si forma, per apertura dell'anello tiazolidinico, una specie intermedia tiolata che da luogo ad un'addizione di Michael sul chinone e porta a QQAS. Accanto a questo composto si forma anche l'1-aryl-3-etossicarbonil-pirido[2,3-g]isochinolin-5,10-dione (PIQD)<sup>31</sup> di cui non tratteremo in questo lavoro.

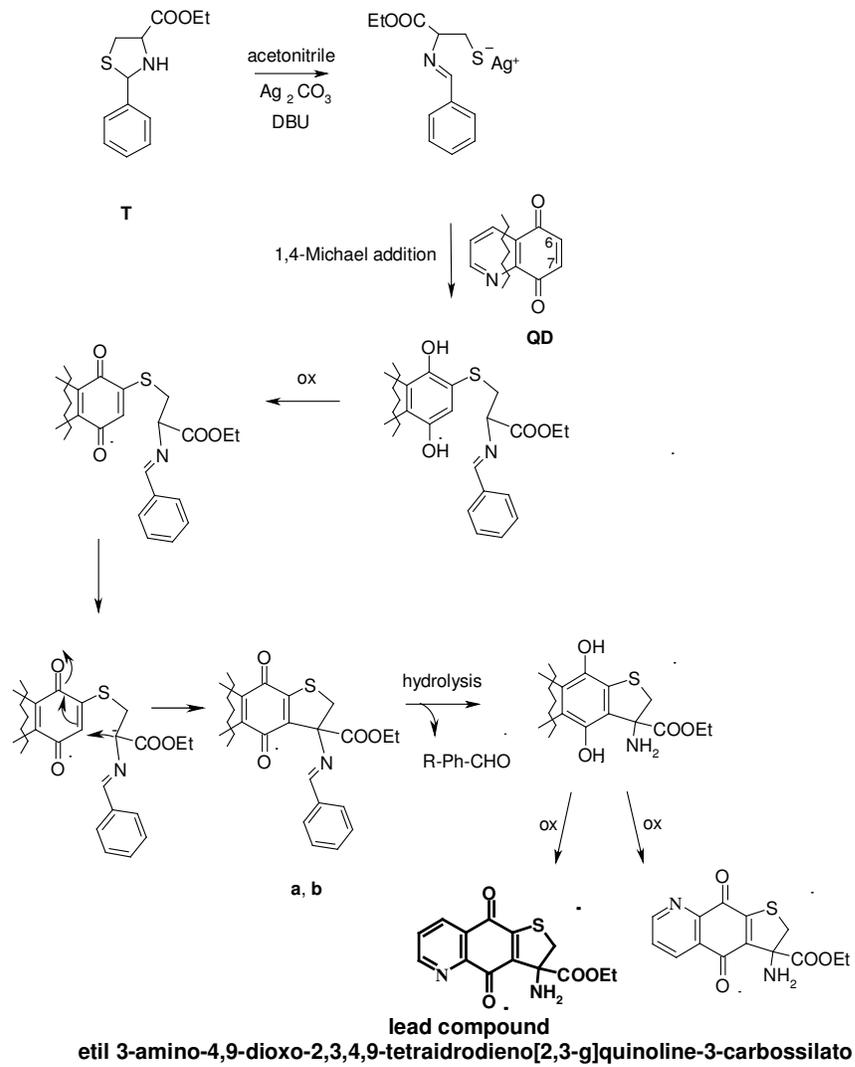


Le due serie di prodotti rispecchiano la duplice reattività dei chinoni nei confronti dei due intermedi tiolato e azadiene (figura.: 23 e 24) formatisi dalla tiazolidina in ambiente basico. Le due reazioni sono in concorrenza tra loro e la formazione di QQAS procede attraverso un'addizione di Michael del tiolato sul sistema carbonilico  $\alpha,\beta$ -insaturo del chinone. La reazione che porta a PIQD è una Diels-Alder tra il chinolinchinone e l'azadiene formatosi *in situ* dalla tiazolidina. Gli schemi di reazione sono riportati nelle figure 23 e 24.





**Figura 23**-ipotesi sul meccanismo di formazione di PIQD.

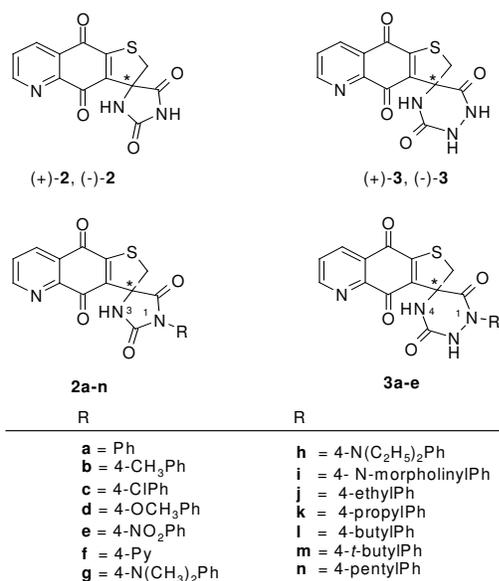


**Figura 24-**Ipotesi sul meccanismo di reazione del Etil 3-amino-4,9-dioxo-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3,-g]chinolin-3-carbossilato

#### 4.1. Spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]quinolina]- tetraoni (STQT) e Spiro[tieno[2,3-g]quinolina-3,5'- [1,2,4]triazinane]-tetraoni (STQN)

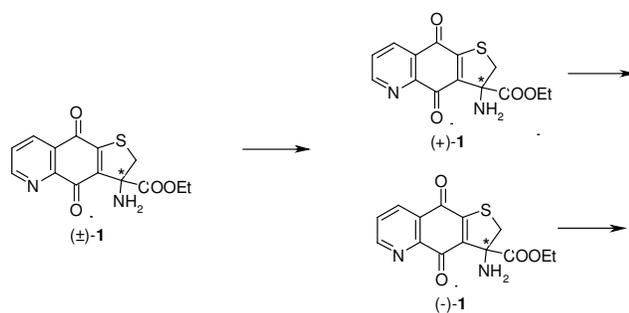
Come abbiamo già riportato, molecole contenenti dioni come imidazolidin-  
dioni, pirimidine-dioni, e piperazine-dioni svolgono la loro attività  
antitumorale attraverso un meccanismo di azione che include la chelazione  
di metalli e l'inibizione enzimatica delle topo II.

Rispettando il motivo chinolinchinonico e in accordo con l'attività  
biologica di PPH e della doxorubicina, abbiamo progettato e sintetizzato  
due serie di composti derivati da QQAS, gli Spiro[imidazolidine-4,3'-  
tieno[2,3-g]quinolina]-tetraoni **2a-n** (STQT) e gli Spiro[tieno[2,3-  
g]quinolina-3,5'-[1,2,4]triazinane]-tetraoni **3a-e** (STQN)



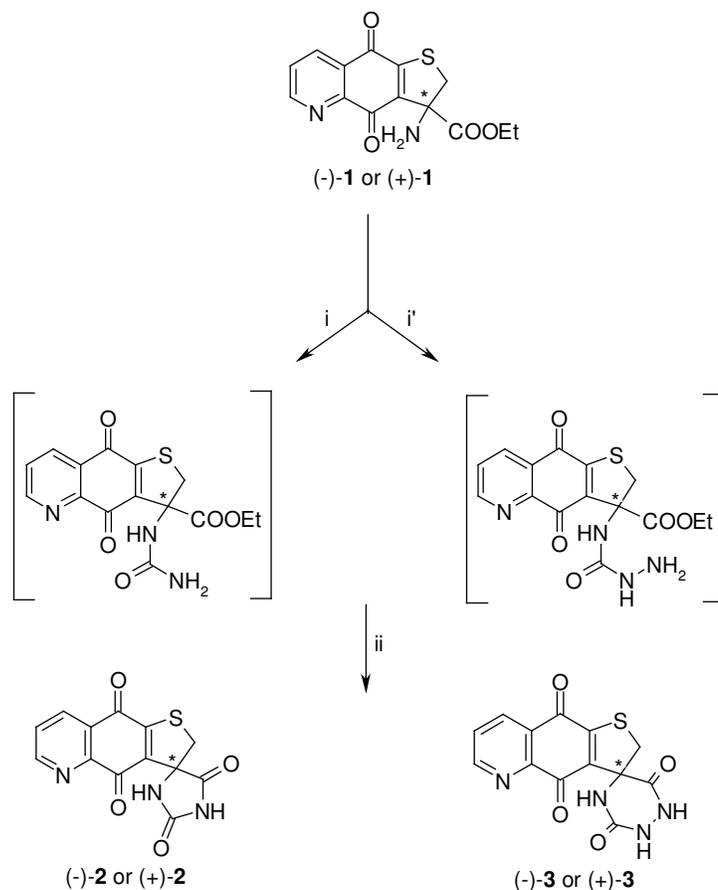
**Figura 25-**Composti STQT e STQN

QQAS (**1**) miscela racemica ,preparato come precedentemente riportato, è stato separato con il metodo di Evans negli enantiomeri (+)-**1** e (-)-**1** puri che sono stati utilizzati per la sintesi dei composti capostipiti delle due serie STQT e STQN, (+/-)-**2** e (+/-)-**3**.



**Figura 26**-Enantiomeri (±)-1

I composti (+)-**1** e (-)-**1** sono stati trattati rispettivamente con bis(triclorometil)carbonato, in presenza di TEA e cloruro di ammonio o idrazina in THF. I primi steps di queste reazioni sono abbastanza favoriti poiché coinvolgono un attacco nucleofilo di un ammina ad un carbonio carbonilico povero di elettroni come quello del bis-triclorometil carbonato, contrariamente all'ultimo step ha bisogno di maggiore calore in quanto prevede la ciclizzazione di un estere con un'urea (figura 27)



**Figura 27**-Schema sintetico degli enantiomeri (+)-2, (-)-2, (+)-3, (-)-3

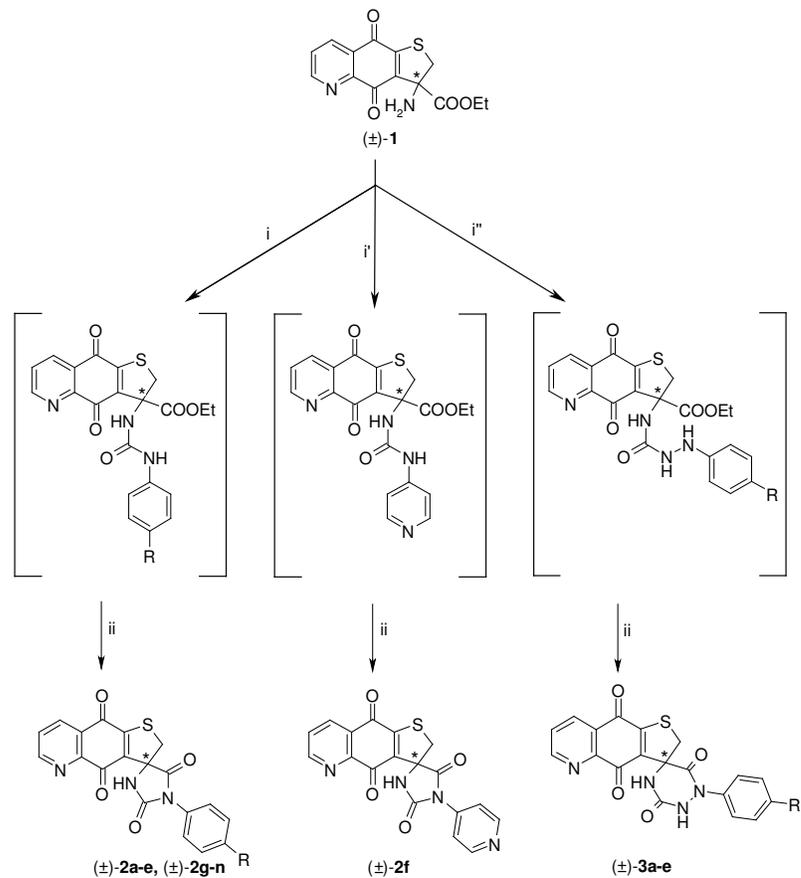
Nella tabella 8 è riportata l'attività citotossica degli enantiomeri separati dei composti **2** e **3** e della doxo testati su cellule provenienti dal linfoma MT-4 e dal carcinoma HT-29. I risultati suggeriscono che entrambi gli enantiomeri di **2** e di **3** sono attivi a concentrazioni micromolari e che l'attività non dipende dalla chiralità del composto (Tabella.:8).

IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>		
Compd	MT-4 <sup>b</sup>	HT-29
(+)- <b>2</b>	0.13±0.02	0.19±0.02
(-)- <b>2</b>	0.12±0.004	0.18±0.04
(+)- <b>3</b>	0.55±0.03	1.58±0.05
(-)- <b>3</b>	0.50±0.09	1.60±0.03
doxo <sup>b</sup>	0.003±0.001	0.002±0.001

**Tabella 8**-Attività citotossica dei composti (±)-**2** e (±)-**3**

Non avendo osservato differenze nell'attività antiproliferativa tra gli antipodi ottici dei composti **2** e **3**, i successivi derivati sono stati testati come miscele racemiche.

In accordo con la precedente procedura sintetica e utilizzando gli opportuni sostituenti rispettivamente aniline e idrazine si è proceduto alla sintesi dei derivati dei composti **2 a-n** e **3 a-e**.



**Figura 28**-Schema sintetico dei composti **2(±) a-n**, **2(±) f**, **3(±) a-e**

I composti ottenuti **2**, **2a-n**, **3** e **3a-e** sono stati saggiati su nove linee cellulari provenienti da tumori liquidi e solidi così come mostrato nella tabella 9

**Tabella 9.** Attività antiproliferativa dei composti (±)-**2**, (±)-**2a-n**, (±)-**3** and (±)-**3a-e**.

compd	R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>										
		CCRF-CEM	CCRF-SB	MT-4	HT-29	MCF-7	HeLa	ACHN	SF-268	XF-498	MRC-5 normal cells	
<b>2</b>	H	0.12	0.15	0.13	0.19	0.12	0.15	0.08	3.10	3.12		
<b>2a</b>	Ph	0.01	0.03	0.025	0.002	0.001	0.003	0.021	1.70	1.51		
<b>2b</b>	4-CH <sub>3</sub> Ph	0.02	0.02	0.027	0.001	0.002	0.002	0.012	0.66	1.35		
<b>2c</b>	4-ClPh	0.01	0.01	0.01	0.002	0.004	0.002	0.004	0.58	0.59	0.80	
<b>2d</b>	4-OCH <sub>3</sub> Ph	0.05	0.01	0.07	0.002	0.05	0.001	0.05	0.65	0.65		
<b>2e</b>	4-NO <sub>2</sub> Ph	0.001	0.002	0.008	0.25	0.35	0.10	0.10	1.52	1.03		
<b>2f</b>	4-Py	0.002	0.001	0.003	0.002	0.01	0.01	0.08	1.10	1.12		
<b>2g</b>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ph	0.001	0.001	0.015	0.02	0.01	0.01	0.09	0.95	0.80	1.00	
<b>2h</b>	4-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> Ph	0.020	0.009	0.008	0.05	0.03	0.05	0.02	0.96	0.73		
<b>2i</b>	4-N-morpholinylPh	0.60	0.65	0.80	0.75	0.75	0.20	0.14	1.98	1.70		
<b>2j</b>	4-ethylPh	0.01	0.01	0.001	0.001	0.05	0.005	0.005	0.45	1.20		
<b>2k</b>	4-propylPh	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.005	0.001	0.30	0.45	0.85	
<b>2l</b>	4-butylPh	0.15	0.19	0.20	0.05	0.07	0.09	0.05	0.40	0.95		
<b>2m</b>	4- <i>t</i> -butylPh	0.20	0.20	0.20	0.15	0.13	0.10	0.15	0.50	0.85		
<b>2n</b>	4-pentylPh	0.25	0.15	0.19	0.25	0.25	0.20	0.25	0.52	0.83		
<b>3</b>	H	0.45	0.048	0.55	1.60	1.25	0.98	1.05	4.82	5.00		
<b>3a</b>	Ph	0.09	0.039	0.15	0.55	0.15	0.21	0.94	2.20	4.55		
<b>3b</b>	4-CH <sub>3</sub> Ph	0.07	0.037	0.10	0.20	0.41	0.21	0.50	2.10	3.80		
<b>3c</b>	4-ClPh	0.05	0.051	0.15	0.22	0.11	0.15	0.36	2.00	2.50		
<b>3d</b>	4-OCH <sub>3</sub> Ph	0.035	0.035	0.08	0.65	0.23	0.15	0.43	2.85	3.80		
<b>3e</b>	4-NO <sub>2</sub> Ph	0.002	0.002	0.005	1.01	0.55	0.61	0.65	3.55	4.80		
doxo <sup>b</sup>		0.02	0.03	0.01	0.01	0.05	0.07	0.04	0.20	0.16	0.30	
VP-16		1.20	0.10	1.25	2.50	1.00	3.00	2.15	3.25	3.45	3.90	

Il composto più attivo è stato inoltre valutato su MRC-5, una linea di cellule fibroblastiche umane normali. I dati relativi alla doxo ed a VP-16 sono inseriti come controllo. I risultati indicano che il composto **3** è dieci volte meno attivo del composto **2** e che i derivati contenenti gruppi fenilici sostituiti **2a-e** e **3a-e** sono più citotossici di **2** e di **3** rispettivamente. In generale la serie **2a-e** è più attiva della serie **3a-e**. Sulla base dei valori medi di  $IC_{50}$  vediamo che l'attività citotossica sembra diminuire in accordo con la natura dei sostituenti:  $4-NO_2Ph < 4-OCH_3 Ph < Ph < 4-CH_3Ph < 4-ClPh$  in entrambe le serie **2 a-e** e **3a-e**. Notiamo inoltre che le linee cellulari del sistema nervoso centrale (CNS), SF-268 e XF 498, sono dalle 10 alle 1000 volte meno sensibili delle altre linee tumorali all'effetto antiproliferativo dei composti **2a-e** e **3a-e**. Nella serie **2a-e** il fenilderivato **2a** che ha un  $IC_{50}=0.02 \mu M$ , il 4-metil-fenil derivato **2b** che ha un  $IC_{50}=0.02 \mu M$ , e il 4-clorofenil derivato **2c** che ha un  $IC_{50}=0.01 \mu M$ , sono i composti più citotossici con un'attività paragonabile o superiore alla doxo che ha un  $IC_{50}=0.03 \mu M$  e superiore a VP-16 che presenta un  $IC_{50}=2.15 \mu M$ . I composti **2a-d** mostrano una migliore specificità come agenti antiproliferativi su carcinomi rispetto a linee cellulari provenienti da leucemie. Un effetto di inibizione selettiva è stato osservato sulla proliferazione di cellule HT-29 con un  $IC_{50}$  compreso tra 0.001 e 0.002  $\mu$ . Sorprendentemente il 4-nitrofenil derivato **2e** che è poco citotossico su cellule proveniente da carcinoma mostra una specifica attività su cellule provenienti da linfomi con un  $IC_{50}$  nell'intervallo compreso tra 0.001-0.008  $\mu M$ .

Come illustrato in tabella 9, le cellule normali MRC-5 risultano 100 volte meno sensibili all'attività inibitoria di molti composti citotossici come **2c**, **2g** e **2k** scelti come rappresentativi della serie **2**. Questi ultimi mostrano un'attività maggiore di VP16 contro le cellule normali ma minore se paragonata alla doxo. La tabella 9 mostra inoltre che i composti sono più attivi contro linfomi e leucemie che carcinomi.

Le linee cellulari provenienti da linfomi CCRF-CEM e CCRF-SB sono più suscettibili all'effetto antiproliferativo di **3a-e**. Il 4-nitrofenil derivato **3e** mostra una distinta specificità contro CCRF-CEM, CCRF-SB e MT-4. L'attività su cellule di linfomi e leucemie dei composti **2e** e **3e** appare dieci volte più grande di quella della doxo ( $IC_{50}=0.002-0.005 \mu M$ ). Entrambi i composti contengono un nitrogruppo riducibile che potrebbe aumentare il danno cellulare generando specie amminiche radicaliche a partire da alcuni processi bio-riduttivi. In ogni caso per sostenere questa ipotesi sarà opportuno approfondire le nostre indagini. Dimostrata la maggiore attività della serie **2a-e** rispetto alla serie **3a-e**, lo scaffold di **2** è stato selezionato per sviluppare gli altri derivati **2f-n**. I composti **2f-i** che contengono gruppi protonabili, sono stati progettati sulla base del fatto che molti chinoni o composti policarbonilici portano catene cationiche come le intoplicine, TAS-103 e BBR-2778 e sono potenti inibitori delle topo I e II, importanti target nel blocco del sistema proliferativo.

Inoltre, considerato che la lipofilia è un parametro fisico che contribuisce all'attività citotossica *in vitro*, sono stati sintetizzati e valutati per la loro attività antiproliferativa i composti **2j-n** che contengono sostituenti

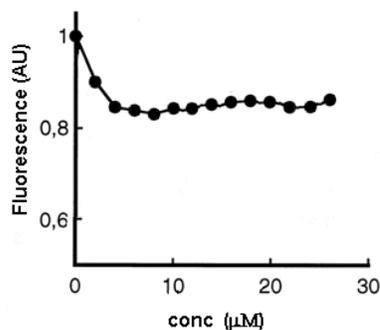
altamente apolari. Nella tabella 9 sono riportati i dati relativi a questi nuovi composti **2j-n**.

I composti **2f**, **2g**, **2h**, caratterizzati dai sostituenti piridin-, 4-N-dimetilfenil- e 4-N-dietilfenil, paragonati con quelli della serie **2a-e** mostrano un'attività citotossica nanomolare su cellule di linfomi e leucemie e una bassa attività antiproliferativa su cellule di carcinoma. Solo il composto **2f** mostra un'elevata citotossicità su cellule HT-29 di carcinoma con un  $IC_{50}=0.002 \mu M$ . Il 4-morfolinofenil derivato **2i** è stato il meno attivo della serie, suggerendo che probabilmente l'ossigeno elettronegativo posizionato lontano dall'anello fenilico diminuisce l'attività della molecola. Tra i composti altamente lipofili **2j-n**, gli etil e i propil derivati **2j** e **2k** sono i più potenti e agiscono su quasi tutte le linee cellulari testate, includendo le cellule del CNS, SF-268 e XF-498. Estendendo la lunghezza della catena da metile, etile e propile (composti **2b**, **2j** e **2k**) si ha un incremento della potenza ma catene più lunghe (composti **2l**, **2m** e **2n**) diminuiscono vertiginosamente la potenza di queste molecole. Questo risultato può significare che composti troppi lipofili, vengono intrappolati nel bi-layer e non possono raggiungere il loro target dove esplicare la loro attività biologica.

## 4.2. Proprietà di legame al DNA

I composti più rappresentativi della serie **2**, **2c**, **2g** e **2k** sono stati ulteriormente esaminati per testare la loro capacità di interagire con il DNA mediante titolazioni spettrofotometriche del complesso prodotto/DNA di calf thymus e di fluorescenza, oltre che mediante saggi di unwinding.

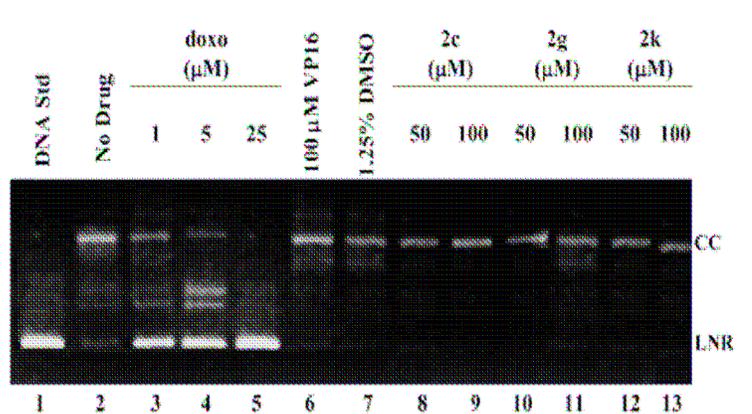
Gli spettri di assorbimento dei composti **2c**, **g**, **k** non sono stati influenzati dall'aggiunta del DNA, suggerendo che non c'è una significativa interazione con il DNA. Mediante la spettroscopia di fluorescenza si è esaminata l'abilità dei composti di intercalare DNA. In questo caso il ligando fluorescente usato come intercalante è il bromuro di etidio. Non è stato osservato alcun quenching per i composti **2c**, **2g** e **2k** come si può vedere nella figura 29.



**Figura 29**-studio di interazione ligando(**2c**, **2g** e **2k**)/DNA

Per investigare l'intercalazione del DNA con la serie **2** è stato condotto un saggio di unwinding usando il plasmide linearizzato pBR322 e la T<sub>4</sub> DNA ligasi. Nella figura 30 è riportata la corsa su gel d'agarosio in cui le linee 3-5 mostrano l'inibizione dell'attività della T<sub>4</sub> ligasi da parte della doxo<sup>32</sup>.

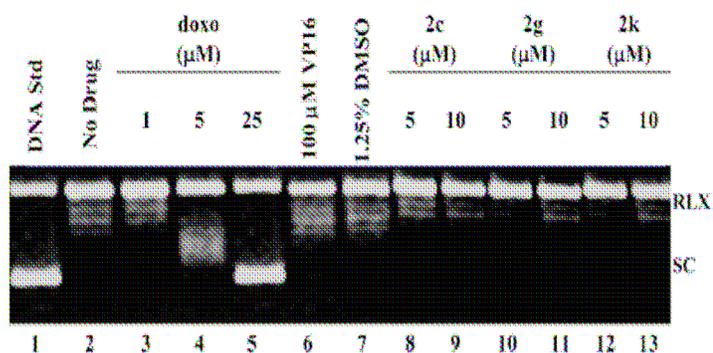
Il controllo negativo VP16 e i composti **2c**, **2g** e **2k** non hanno evidenziato particolare influenza sui topoisomeri di DNA, anche a concentrazione di 100  $\mu\text{M}$



**Figura 30**-Effetto dei composti **2c**, **2g** e **2k** in un saggio di unwinding con DNA Ligasi T<sub>4</sub>. In questo saggio il DNA plasmidico lineare è stato incubato con T<sub>4</sub> DNA Ligasi in presenza dei composti da testare. Viene indicata la posizione del DNA rilassato (RLX) e di quello superavvolto (SC).

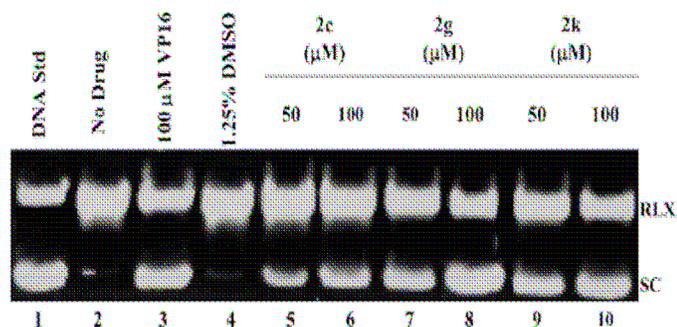
Per verificare queste informazioni è stato condotto un ulteriore saggio di unwinding. In questo esperimento il DNA superavvolto viene rilassato dalla topo I in presenza dei composti testati. Come si può vedere dalla figura. 31, i nostri composti, così come VP 16, non mostrano attività intercalante.

In seguito a questi due esperimenti possiamo concludere che i composti **2c**, **2g** e **2k** rappresentativi della serie **2** non sono agenti intercalanti.



**Figura 31**-Effetto dei composti **2c**, **2g** e **2k** in un saggio di unwinding con DNA e Topo I. In questo saggio, il DNA plasmidico superavvolto è stato incubato con Topo I. Il plasmide pBR322 superavvolto negativamente è mostrato come riferimento (DNA std). Viene indicata la posizione del DNA rilassato (RLX) e di quello superavvolto (SC).

Per testare la capacità dei nostri composti **2c**, **2g** e **2k** di inibizione dell'attività catalitica della topoisomerasi II  $\alpha$ , i prodotti sono stati testati a diverse concentrazioni sul plasmide pBR322 in presenza di topoisomerasi II, usando come confronto VP16. La corsa elettroforetica mostra che **2c**, **2g** e **2k** sono potenti inibitori della Topoisomerasi II e che il composto **2g** è il più attivo della serie. Questo risultato sembra avvalorare l'ipotesi da noi avanzata che la presenza di gruppi protonabili (gruppi cationici) potesse promuovere l'interazione con l'enzima, bloccandone l'attività catalitica.



**Figura 32**-Effetto dei composti 2c 2g 2k su Topo II mediante rilassamento di pBR322 superavvolto. I superavvolgimenti negativi di pBR322 (DNA Std) e pBR322 rilassato (no farmaco) sono mostrati come riferimento. Le posizioni rilassate (RLX) e superavvolto (SC) sono riportate.

### 4.3. Parte Sperimentale

#### 4.3.1. Materiali e metodi

Reagenti, materiale di partenza e i solventi sono stati acquistati presso la Merck. Sono state utilizzate TLC analitiche di spessore 0.25mm di gel di silice e TLC preparative di 2mm di spessore di gel di silice e di grandezza 20x20 su lastra di vetro. Gel di silice 60(300-400 mesh), Merck, è stata usata per le flash cromatografie. I punti di fusione sono stati ottenuti con l'apparato Kofler. Con un polarimetro Perkin-Elmer-241 MC sono state determinate le proprietà ottiche. Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati eseguiti con uno spettrometro Bruker-500. I chemical shifts sono stati riportati in  $\sigma$  relativamente al  $\text{Me}_4\text{Si}$ , a gli J riportati in Hz. Gli spettri di massa sono stati ottenuti usando un EI a 70 eV con spettrofotometri ZAB 2F e FABMS.

#### 4.3.2. Risoluzione degli enantiomeri (+)-1 e (-)-1.

(±)-1 (1 mmol, 304 mg) sono stati sciolti in una soluzione di THF/DMF (20 mL; 2:1 v/v), e aggiunti L-Boc-Phe (1 equiv), HBTU (1.2 equiv), HOBt (1.2 equiv), e DIEA (2 equiv), a temperatura ambiente sotto agitazione per 48 h. La reazione è stata evaporata sotto vuoto, il residuo solido disciolto in  $\text{CHCl}_3$  e lavato con 10% acido citrico (2x25 mL), 10%  $\text{NaHCO}_3$  (2x25 mL) e  $\text{H}_2\text{O}$  25 mL. La soluzione organica è stata privata dall'acqua con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ed evaporata. Flash cromatografia (20-50% gradiente di EtOAc in esano) il residuo solido conteneva la miscela di diastereoisomeri di etil 3-(2-(terz-butossicarbonilamino)-3-fenilpropanamido)-4,9-diosso-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]chinolin-3-carbossilato (1a,1a'). La miscela trattata con TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente per 2 ore, è stata neutralizzata con TEA e il solvente evaporato. È stato aggiunto Fenilisotiocianato (60 mg, 0.44 mmol) e TEA (88 mg, 0.8 mmol) alle rispettive soluzioni di 1b e 1b' (170 mg, 0.35 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Dopo un'ora a riflusso il solvente fu evaporato e il residuo analizzato con una flash cromatografia utilizzando  $\text{CHCl}_3$  come eluente. Il residuo solido etil 4,9-diosso-3-(3-fenil-2-(3-feniltioureido)propanamide)-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]chinolin-3-carbossilato **1c** e **1c'** (~106 mg) è stato trattato con TFA (2 mL). Dopo 1 h a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata neutralizzata con TEA ed evaporata. In fine è stata utilizzata una flash cromatografia eluita con etere etilico per ottenere gli

enantiomeri (+)-1 (olio arancio,  $[\alpha]_{20}^D = +31.0^\circ$  (c 1.2, MeOH)) e (-)-1 (olio arancione,  $[\alpha]_{20}^D = +30.1^\circ$  (c 1.0, MeOH)).

**Etil 4,9-diosso-3-(3-fenil-2-(3-feniltioureido)propanamide)-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]chinolin-3-carbossilato (1c).** Solido giallo (70%): mp. dec>220; MS m/z 586 (M+);  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.90 (1H, dd; J= 4.3, 2.2 Hz), 8.36 (1H, dd; 7.3, 2.2 Hz), 7.70 (1H, bs; NH), 7.57 (1H, dd; J=7.3,4.3 Hz), 7.35 (5H, m), 7.10 (6H, m; 5H+NH), 6.32 (1H, bs; NH), 5.25 (1H, m;  $\alpha\text{CH}$ ), 4.25 (2H, q;  $\text{CH}_2$ ), 3.81 (1H, d; J=12.5 Hz), 3.70 (1H, d; J=12.5 Hz), 3.10 (2H, m;  $\beta\text{CH}_2$ ), 1.22 (3H, t;  $\text{CH}_3$ ). Anal. ( $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$ ) C, H, N, S.

**Etil 4,9-diosso-3-(3-fenil-2-(3-feniltioureido)propanamide)-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-g]chinolin-3-carbossilato (1c').** Solido giallo (70%): mp. dec>220; MS m/z 586 (M+);  $^1\text{H NMR}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.90 (1H, dd; J= 4.3, 2.2 Hz), 8.36 (1H, dd; 7.3, 2.2 Hz), 7.71 (1H, bs; NH), 7.57 (1H, dd; J=7.3,4.3 Hz), 7.35 (5H, m), 7.10 (6H, m; 5H+NH), 6.32 (1H, bs; NH), 5.27 (1H, m;  $\alpha\text{CH}$ ), 4.25 (2H, q;  $\text{CH}_2$ ), 3.81 (1H, d; J=12.5 Hz), 3.70 (1H, d; J=12.5 Hz), 3.12 (2H, m;  $\beta\text{CH}_2$ ), 1.22 (3H, t;  $\text{CH}_3$ ). Anal. ( $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$ ) C, H, N, S.

**4.3.3. Preparazione del 2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2, 2a-n) e 2H -spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1, 2, 4] triazin]-3', 4, 6', 9-tetraone (3, 3a-e).**

Bis(triclorometil) carbonato (118mg, 0.4mmol) sono stati aggiunti alla soluzione di chinolin-dione 1, (300mg, 1mmol) in THF anidro (25ml) a temperatura ambiente.

TEA(0.3ml, 2mmol) sono stati aggiunti goccia a goccia sotto agitazione.

Dopo 10 minuti una soluzione in THF anidro (5ml) di TEA (0.3ml, 2 mmol) e cloruro di ammonio, o aniline, o aniline sostituite ( 4-metil-, 4-cloro-, 4-metossi- e 4-nitro) o 4-aminopiridina (2 equiv.) sono stati aggiunti sotto agitazione. Dopo 1 ora le miscele di reazione sono state diluite con cloroformio, lavate con acqua, anidificate con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e evaporate fino a secchezza ottenendo i composti grezzi **2** e **2a-n**, rispettivamente. Tutti i composti sono stati purificati con flash cromatografia (80%CHCl<sub>3</sub>, 20MeOH). Per preparare i composti (**3**, **3a-e**), in accordo con la precedente procedura, sono stati utilizzati idrazina, fenilidrazina ed il corrispondente sostituito fenilidrazina (4- metil, 4-cloro, 4-metossi-4-nitro).

**2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone**

(2). solido giallo pallido (43%), mp 188-189 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 10.5 (1H, s; NH-1), 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 5.90 (1H, s; NH-3), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 301; trovato. Anal. (C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S. (+)-2 ([α]<sub>20</sub><sup>D</sup> = +29.9° (c, 1.2, MeOH)), (-)-2 ([α]<sub>20</sub><sup>D</sup> = -30.1° (c, 1.1, MeOH)).

**1-fenil-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-**

**tetraone (2a).** Solido giallo pallido (45%), mp 193-194 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.64 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.57 (2H, t; J=6.9 Hz), 7.30 (1H, t; J=6.5 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 377; found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S.

**1-p-tolil-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-**

**tetraone (2b).** Solido giallo pallido (44%), mp 196-197 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.58 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.35 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 2.32 (3H, s). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 391; found. Anal. (C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S.

**1-(4-clorofenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-**

**2,4',5,9'-tetraone (2c).** Solido giallo pallido (43%), mp 197-198 °C. <sup>1</sup>H

NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.50 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.30 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 411, 413 (M+2); found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) C, H, N, S.

**1-(4-metossifenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2d)**. Solido giallo pallido (46%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.40 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.15 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.75 (3H, s), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H),. MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S: 407; found. Anal. (C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S) C, H, N, S.

**1-(4-nitrofenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2e)**. Solido arancio pallido (23%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 8.05 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.70 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 5,90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H),. 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S: 422; found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S) C, H, N, S.

**1-(piridin-4-yl)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2f)**. Solido gillo pallido (45%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.70 (2H, d; J=5.8 Hz), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.61

(2H, d; J=5.8 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{18}H_{10}N_4O_4S$ : 378; found. Anal. ( $C_{18}H_{10}N_4O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-(dimetilamino)fenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2g).** Solido giallo pallido (40%), mp >200 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  9.03 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.67 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.50 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.15 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 2.32 (6H, s). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{21}H_{16}N_4O_4S$ : 420; found. Anal. ( $C_{21}H_{16}N_4O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-(dietilamino)fenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2h).** Solido giallo pallido (39%), mp >200 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  9.03 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.67 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.50 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.15 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (5H, m), 1.15 (6H, t; J=7.4 Hz). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{23}H_{20}N_4O_4S$ : 448; found. Anal. ( $C_{23}H_{20}N_4O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-morfolinofenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2i).** Solido giallo giallo (39%), mp >200 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  9.03 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.67 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.50 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.15 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.65 (4H, m), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 3.32 (4H, m),.

MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{23}H_{18}N_4O_5S$ : 462; found. Anal. ( $C_{23}H_{18}N_4O_5S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-etilfenil)-2'*H*-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-*g*]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2j).** Solido giallo pallido (44%), mp 198-199 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , 9.02 (1H, d;  $J=4.2$  Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d;  $J=7.7$  Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd;  $J=7.7,4.2$  Hz, 7'-H), 7.58 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 7.35 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'a-H), 2.58 (2H, q;  $J=6.7$  Hz), 1.20 (3H, t;  $J=6.7$  Hz). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{21}H_{15}N_3O_4S$ : 405; found. Anal. ( $C_{21}H_{15}N_3O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-propilfenil)-2'*H*-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-*g*]chinoline]-2,4',5,9'-tetraone (2k).** Solido giallo pallido (44%), mp 196-197 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , 9.02 (1H, d;  $J=4.2$  Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d;  $J=7.7$  Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd;  $J=7.7,4.2$  Hz, 7'-H), 7.58 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 7.35 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'a-H), 2.54 (2H, t;  $J=6.7$  Hz), 1.60 (2H, m), 0.98 (3H, t;  $J=6.7$  Hz). MS [ $M^+$ ] calcd for  $C_{22}H_{17}N_3O_4S$ : 419; found. Anal. ( $C_{22}H_{17}N_3O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-butilfenil)-2'*H*-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-*g*]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2l).** Solido giallo pallido (44%), mp 198-199 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , 9.02 (1H, d;  $J=4.2$  Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d;  $J=7.7$  Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd;  $J=7.7,4.2$  Hz, 7'-H), 7.58 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 7.35 (2H, d;  $J=7.2$  Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d;  $J=12.9$  Hz, 2'a-H), 2.60 (2H, t;  $J=6.7$  Hz), 1.58 (2H,

m), 1.36 (2H, m), 0.90 (3H, t; J=6.7 Hz). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ : 433; found. Anal. ( $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-terz-butilfenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2m)**. Solido giallo pallido (44%), mp 198-199 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.48 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.30 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 1.35 (9H, s). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ : 433; found. Anal. ( $C_{23}H_{19}N_3O_4S$ ) C, H, N, S.

**1-(4-pentilfenil)-2'H-spiro[imidazolidine-4,3'-tieno[2,3-g]chinolin]-2,4',5,9'-tetraone (2n)**. Solido giallo pallido (44%), mp 198-199 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , 9.02 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.42 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.58 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.35 (2H, d; J=7.2 Hz), 5.90 (1H, s; NH-3), 4.12 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.40 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 2.62 (2H, t; J=6.7 Hz), 1.60 (2H, m), 1.34 (4H, m), 0.95 (3H, t; J=6.7 Hz). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{24}H_{21}N_3O_4S$ : 447; found. Anal. ( $C_{24}H_{21}N_3O_4S$ ) C, H, N, S.

**2H-spiro[tieno[2,3-g]chinoline-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3)**. Solido giallo pallido (40%), mp 198-199 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ , 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7, 4.2 Hz, 7'-H), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H). MS [ $M^+$ ] calcd per  $C_{13}H_8N_4O_4S$ : 316; found. Anal. ( $C_{13}H_8N_4O_4S$ ) C, H, N, S. (+)-**3** ( $[\alpha]_{20}^D = +27.5^\circ$  (c, 1.2, MeOH)), (-)-**3** ( $[\alpha]_{20}^D = -28.1^\circ$  (c, 1.2, MeOH)).

**1'-fenil-2H-spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3a).** Solido giallo pallido (32%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ, 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (3H, m), 7.57 (2H, t; J=6.9 Hz), 7.30 (1H, t; J=6.5 Hz), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S: 392; found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S.

**1'-p-tolil-2H-spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3b).** Solido giallo pallido (32%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ, 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7, 4.2 Hz, 7'-H), 7.38 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.20 (2H, d; J=7.2 Hz), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H), 2.30 (3H, s). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S: 406; found. Anal. (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S.

**1'-(4-clorofenil)-2H-spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3c).** Solido giallo pallido (32%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ, 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7, 4.2 Hz, 7'-H), 7.43 (2H, d; J=7.2 Hz), 7.20 (2H, d; J=7.2 Hz), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S: 426, 428 (M+2); found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S) C, H, N, S.

**1'-(4-metossifenil)-2H-spiro[tieno[2,3-g]chinolin-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3d).** Solido giallo pallido (32%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ, 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 7.65 (1H, dd; J=7.7, 4.2 Hz, 7'-H), 7.43

(2H, d; J=7.2 Hz), 7.20 (2H, d; J=7.2 Hz), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.98 (3H,s), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S: 422; found. Anal. (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) C, H, N, S.

**1'-(4-nitrofenil)-2*H*-spiro[tieno[2,3-*g*]chinolin-3,5'-[1,2,4]triazinane]-3',4,6',9-tetraone (3e)**.solido arancio pallido (32%), mp >200 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ, 9.01 (1H, d; J=4.2 Hz, 6'-H), 8.40 (1H, d; J=7.7 Hz, 8'-H), 8.20 (2H, t; J=7.2 Hz), 7.65 (1H, dd; J=7.7,4.2 Hz, 7'-H), 7.53 (2H, d; J=7.2 Hz), 4.20 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'b-H), 3.52 (1H, d; J=12.9 Hz, 2'a-H). MS [M<sup>+</sup>] calcd per C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S: 437; found. Anal. (C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S) C, H, N, S.

## 5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi si riporta la progettazione, la sintesi, e l'attività biologica di due famiglie di chinoni, i derivati del 5*H*-pirido- [3,2-*a*] fenossazin-5-oni e dell' etil 3-amino-4,9-dioxo-2,3,4,9-tetraidrotieno[2,3-*g*]quinoline-3-carbossilato, strutturalmente correlati all'actinomicina D e alla doxorubicina, e caratterizzate da una potente attività antiproliferativa con IC<sub>50</sub> dell'ordine submicromolare.

Mentre i piridofenossazinoni si intercalano nel DNA agendo nel sito specifico definito dalle coppie di basi guanina-citosina ed esplicano la loro azione citotossica anche attraverso la produzione di radicali ossidrilici, i derivati aminoacidici presentati in questa tesi, pur conservando queste caratteristiche, hanno mostrato la proprietà di inibire anche l'attività catalitica della topoisomerasi II. Quest'enzima, che ha un ruolo cruciale nel blocco della proliferazione cellulare, è un importante bersaglio dei farmaci impiegati in chemioterapia come per esempio l'Etoposide. I prodotti da noi sviluppati si legano allo

scheletro del DNA costituendo un ingombro sterico che inibisce l'attacco della tenaglia della Topoisomerasi al DNA.

L'ampliamento dei targets d'azione di questa classe di composti è di grande importanza perchè può contribuire al superamento della *drug resistance* un fenomeno che è in larga parte causa dei fallimenti della chemioterapia tumorale. Per superare questo problema, la moderna chemioterapia interviene aggredendo il tumore primario e le sue metastasi con cocktails di farmaci attivi su differenti bersagli biologici.

Il grande interesse destato dall'azione di questi potenziali farmaci ci anche ha spinto a esperire una nuova via sintetica biotecnologia. Infatti il legame tra l'amminoacido lisina è stato effettuato utilizzando l'apparato sintetico di una cultura fungina, basidiomiceti, nel cui terreno di cultura sono stati aggiunti il PPH-COOH e la lisina. E' ancora in studio l'estensione di questa metodologia a un ampio spettro di composti per poter trarre considerazioni il più possibile generali.

Anche la famiglia dei derivati di QQAS, che esibisce una attività antiproliferativa di grado nanomolare, è in grado di inibire l'attività della Topoisomerasi II senza però intercalare il

DNA. Di grande interesse è il fatto che alcuni termini di questa serie esibiscono attività inibitoria anche su cellule di tumori del sistema nervoso centrale come SF-268 e XF-498, due tumori molto resistenti ad ogni tipo di chemioterapia.

## 6. Biologia

I composti testati sono stati disciolti in DMSO a una concentrazione iniziale di 200 $\mu$ M e successivamente diluiti nel mezzo di coltura.

**Cellule.** Le linee cellulari provengono da American Type Culture Collection(ATCC). MRC-5 fibroblasti polmonari umani normali, cellule derivate da linfomi e carcinomi sono cresciute in RPMI 1640 contenente 10% siero fetale di bovino (FCS), 100U/mL penicillina G, e 100  $\mu$ g/mL streptomina.

Le cellule derivate da tumori solidi sono state cresciute nel loro mezzo di coltura specifico con aggiunta 10% FCS e antibiotico. Le colture cellulari sono state incubate a 37°C e umidificate, atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. le colture cellulari sono state controllate periodicamente per l'assenza di contaminazioni di micoplasmi con l'utilizzo del metodo Hoechst stainig.

### **Saggi antiproliferativi.**

Cellule di leucemia e linfomi sono state risospese ad una densità di 1x10<sup>5</sup> cellule/ml in RPMI contenente serie diluite dei farmaci testati. La risposta cellulare è stata determinata dopo 97 ore a 37°C con il metodo MTT. L'attività contro cellule derivate da tumori solidi è stata valutata su colture con crescita esponenziale fermate al 5x10<sup>4</sup> cellule/ml e fatte crescere per 16 ore su capsule prima di aggiungere i farmaci. La risposta cellulare è stata determinata con il metodo MTT dopo 4 giorni.

### **Analisi della regressione lineare.**

La crescita delle cellule tumorali è stata espressa ad ogni concentrazione di farmaco in percentuale al controllo, e la concentrazione dell'inibizione della crescita, del 50% ( $IC_{50}$ ), è stata determinata con regressione lineare.

### **Spettrofotometria.**

Il coefficiente di estinzione molare e la lunghezza d'onda del massimo di assorbimento nello spettro del visibile è stato determinato per **2c** in soluzione, e legato al DNA di timo di vitello (Sigma- Aldrich, Milano, Italia) usando uno spettrofotometro Cary 5000 UV-Vis-NIR. La misura è stata effettuata in un tampone 0.1 SHE [2 mM 4-(2-idrossietil)-1-acido piperazinetanosolfonico, 10 mM EDTA, e 99.4 mM NaCl, pH 7.0] a 25°C. L'analisi di **2c**, **2g**, e **2k** in presenza di DNA sono state condotte aggiungendo aliquote di soluzione di DNA ad una soluzione molecolare di ligando (20 $\mu$ M).

Una soluzione contenente DNA alla stessa concentrazione della precedente è stata usata come bianco di riferimento nel registrare gli spettri di assorbimento.

### **Misure di fluorescenza.**

Le misure di fluorescenza sono state eseguite con uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS50B. Tutte le misure sono state eseguite utilizzando cuvette con un cammino ottico di 10 mm ed un tampone con forza ionica 0.01 M (9.3 mM NaCl, 2 mM acetato Na, e 0.1 mM EDTA) usando 20

$\mu\text{M}$  DNA e 2  $\mu\text{M}$  di Bromuro di etidio. Il complesso DNA-etidio è stato eccitato a 546 nm e la fluorescenza misurato a 595 nm<sup>33</sup>.

### **Materiali.**

DNA superavvolto di plasmide pBR322, endonucleasi di restrizione EcoR1, T<sub>4</sub> DNA Ligasi, e SDS sono state acquistate dal New England Biolab (UK). DNA Topo I e II sono stati acquistati dal TopoGen (Columbus, OH, U.S.A.). VP16 e Doxo sono state fornite da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). **2c**, **2g**, **2k** e i farmaci di controllo sono stati solubilizzati a una concentrazione di 10<sup>4</sup>  $\mu\text{M}$  in DMSO.

Tutte le soluzioni di partenza sono state conservate a -20°C e diluite con acqua distillata prima dei test.

Due microlitri del composto da testare (o di DMSO come controllo degli effetti del solvente) sono stati aggiunti alla miscela di reazione.

### **Saggio di Unwinding.**

Gli effetti dei campioni **2c**, **2g** e **2k** nel saggio di DNA Unwinding sono stati valutati con il metodo descritto da Yamashita et al<sup>34</sup>. Il DNA plasmidico è stato linearizzato dall'endonucleasi di restrizione EcoR1 e recuperato con estrazione in fenolo e precipitato in etanolo. La miscela di reazione (20 $\mu\text{L}$ ) contenente 30 mM Tris HCl (pH 7.8), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5mM ATP, 0,1 $\mu\text{g}$  del DNA linearizzato e i campioni testati sono stati tenuti a 20°C per 30min e successivamente incubati con un eccesso di T<sub>4</sub> DNA Ligase a 20°C per 30 min. Le reazioni sono state fermate attraverso uno shift della temperatura a 55°C. In fine i campioni

sono state estratti dalla miscela di reazione con fenolo Le bande di DNA sono state analizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1%.

Un altro saggio di unwinding è stato effettuato per valutare il rilassamento del plasmide supeavvolto pBR322 mediato dalla TopoI. Il complesso DNA/Ligando è stato dissociato con estrazione dalla miscela di reazione con uguali volumi di fenolo/cloroformio/isoamilalcohol (25:24:1,v/v/v).

Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi e fotografati con lampada UV.

### **Rilassamento del DNA superavvolto pBR322 mediato dalla Topo II.**

Il saggio di rilassamento del DNA è stato effettuato secondo la procedura Osheroff et al<sup>35</sup>. Il tampone di reazione contiene 10mM Tris.HCl (pH 7.9), 50 mM KCl, 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EDTA, e 15µg/mL di BSA, 1mM ATP, 0,15µg di pBR322 superavvolto, 4 unità di Topo II in un totale di 20µL. Il rilassamento è stato investigato a 37°C per sei min. e fermato con l'aggiunta di 3 µL della soluzione stop (100mM EDTA, 0,5% SDS, 50% di glicerolo, 0,05% di blu bromofenolo). L'elettroforesi è stata effettuata in gel di agarosio all'1% in 0.5 x TBE (89mM Tris base, 89mM di acido borico e 2mM di EDTA) a 4 V/cm per 1h. Le bande di DNA fissate con 0.5µg/mL di soluzione di Bromuro di Etidio e fotografate sotto luce UV.

### **Terreno di coltura solido PDY**

25mL di acqua sono stati mischiati con 0,600g di patata destrosio, 0,125g di estratto di lievito e 0,375g di agar. La miscela è stata mescolata fino al completo scioglimento di tutti gli elementi. Successivamente è stato posto a sterilizzazione in Autoclave e in fine piastrato in capsule di petri d.15x15

### **Terreno di coltura liquido PDY**

25mL di acqua sono stati mischiati con 0,600g di patata destrosio e 0,125g di estratto di lievito. La miscela è stata mescolata fino al completo scioglimento di tutti gli elementi. Successivamente è stato sterilizzato in Autoclave. Al terreno liquido sono stati aggiunti 100 $\mu$ M di PPH-COOH.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Chabner, B. A.; Allegra, C. J.; Curt, G. A.; Calabresi, P.; Antineoplastic Agents. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed.; Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1996; pp 1233-1287.
- (2) Zucchi, R.; Danesi, R. Cardiac Toxicity of Antineoplastic Anthracyclines. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2003**, *3*, 151-171.
- (3) Thomas, X.; Le, Q. H.; Fiere, D. Anthracycline-Related Toxicity Requiring Cardiac Transplantation in Long-Term Disease-Free Survivors with Acute Promyelocytic Leukemia. *Ann. Hematol.* **2002**, *81*, 504-507.
- (4) Roitt I.; Brostoff J.; Male D. Tumors immunology: Tumor-associated antigens identified by antibody. *Immunology* **2007**, 294-295
- (5) Begleiter, A. Clinical Applications of Quinone-Containing Alkylating Agents. *Front. Biosci.* **2000**, *5*, E153-E171.
- (6) Wakelin, L. P. G.; Waring, M. J. DNA Intercalating Agents. In Comprehensive Medicinal Chemistry; Sammes. P. G., Ed.; Pergamon Press: Oxford, U.K., 1990; Vol 2, pp 703-724. b) Carter, S. K.; Crooke, S. T. In Mitomycin C: Current Status and New Developments; Academic Press: New York, 1979.

- (7) Rao, K. V., Cullen, W. P. Streptonigrin, an Antitumor Substance, I. Isolation and Characterization. *Antibiot. Ann.* **1959**, 950-953.
- (8) Di Marco, A.; Cassinelli, G.; Arcamone, F. The Discovery of Daunorubicin. *Cancer Treat. Rep.* **1981**, 65 (Suppl. 4), 3-8.
- (9) Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; Barone, V.; La Colla, P.; Loddo, R.; Murgioni, C.; Pani, A.; Serra, I.; Setzu, G. Antitumor Agents. 1. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling of 5*H*-Pyrido[3,2-*a*]phenoxazin-5-one, a New Compound with Potent Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5205-5216.
- (10) Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; Barone, V.; La Colla, P.; Loddo, R. Antitumor Agents. 2. Synthesis, Structure-Activity Relationships and Biological Evaluation of Substituted 5*H*-Pyridophenoxazin-5-ones with Potent Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5217-5223.
- (11) Matsumoto, S. S.; Sidford, M. H.; Holden, J. A.; Barrows, L. R.; Copp, B. R. Mechanism of Action Studies of Cytotoxic Marine Alkaloids: Ascidiemin Exhibits Thiol-Dependent Oxidative DNA Cleavage. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1667-1670.
- (12) Shaikh, I. A.; Johnson, F.; Grollman, A. P. Streptonigrin 1. Structure-Activity Relationships Among Simple Bicyclic

Analogues. Rate Dependence of DNA Degradation on Quinone Reduction Potential. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1329-1340.

- (13) Waring, M. J. Drugs and DNA: Uncoiling of the DNA Double Helix as Evidence of Intercalation. *Humangenetik* **1970**, 9, 234-6.
- (14) Pommier, Y.; Covey, J. M.; Kerrigan, D.; Markovits, J.; Pham, R. DNA Unwinding and Inhibition of Mouse Leukemia L1210 DNA Topoisomerase I by Intercalators. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 25, 6713-31.
- (15) SYBYL Molecular Modelling System (version 6.2), Tripos Inc., St.Louis, MO, USA.
- (16) Vinter, J. G.; Davis, A.; Saunders, M. R. Strategic Approaches to Drug Design. 1. An Integrated Software Framework for Molecular Modelling. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **1987**, 1, 31-55.
- (17) Chow, K.-C.; Ross, W. E. Topoisomerase-Specific Drug Sensitivity in Relation in Cell Cycle Progression. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 3119-23. b) Sleiman, R. J.; Catchpoole, D. R.; Stewart, B. W. Drug-Induced Death of Leukaemic Cells after G2/M Arrest: Higher Order Dna Fragmentation as an Indicator of Mechanism. *Br. J. Cancer* **1998**, 77, 40-50.
- (18) Bailly, C. DNA Relaxation and Cleavage Assays to Study Topoisomerase I Inhibitors. *Methods Enzymol.* **2001**, 340, 610-623.

- (19) Dassonneville, L.; Bonjean, K.; De Pauw-Gillet, M. C.; Colson, P.; Houssier, C.; Quetin-Leclercq, J.; Angenot, L.; Bailly, C. Stimulation of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by Three DNA-Intercalating Plant Alkaloids. Cryptolepine, Matadine and Serpentine. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7719-7726.
- (20) Lown, J. W. Anthracycline and Anthracenedione-based Anticancer Agents; Elsevier: Amsterdam, 1988.
- (21) Miller, E. C.; Miller, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* **1981**, *47*, 1055-1064.
- (22) Morton, R. A., Ed. *Biochemistry of Quinones*; Academic Press: New York, 1965.
- (23) Adamo, C.; Cossi, M.; Rega, N.; Barone, V. In *New Computational Strategies for the Quantum Mechanical Study of Biological Systems in Condensed Phases*, in *Theoretical Biochemistry Processes and Properties of Biological Systems, Theoretical and Computational Chemistry*; Eriksson, L. A. Ed.; Elsevier *Science B. D.* New York, vol 9, 2001, pp 467-538.
- (24) SYBYL Molecular Modelling System (version 6.2), Tripos Inc., St. Louis, MO, USA.
- (25) Vinter, J. G.; Davis, A.; Saunders, M. R. Strategic Approaches to Drug Design. 1. An Integrated Software Framework for Molecular Modelling. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **1987**, *1*, 31-55.

- (26) Pan, H.L.; Fletcher, T.L. Derivatives of Fluorene. XXIV. Synthesis and Antitumor Activities of Some Imidazoline-2,5-diones. *J Med Chem*, **1967**, *10*, 957-8.
- (27) Nakamura, K.; Sugumi, H.; Yamaguchi, A.; Uenaka, T.; Kotake, Y.; Okada, T.; Kamata, J.; Nijima, J.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Yoshino, H.; Kitoh, K.; Yoshimatsu, K. Antitumor Activity of ER-37328, a Novel Carbazole Topoisomerase II Inhibitor. *Mol Cancer Ther*. **2002**, *3*, 169-175.
- (28) Ishida, R.; Miki, T.; Narita, T.; Yui, R.; Sato, M.; Utsumi, K.R.; Tanabe, K.; Andoh, T. Inhibition of Intracellular Topoisomerase II by Antitumor Bis(2,6-dioxopiperazine) Derivatives: Mode of Cell Growth Inhibition Distinct from that of Cleavable Complex-Forming Type Inhibitors. *Cancer Res*. **1991**, *51*, 4909-4916.
- (29) a) Creighton, A. M., Hellmann, K., and Whitecross, S. Antitumor Activity in a Series of Bisdiketopiperazines. *Nature* (Lond.), **1969**, *222*, 384-385, b) Inhibition of DNA synthesis by bifunctional alkylation c-Sharpe, H.B.A.; Field, E.O.; Hellmann, K. Mode of Action of the Cytotoxic Agent ICRF-159. *Nature* (Lond.), **1970**, *226*, 524-526.
- (30) Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R., Andoh, T. Inhibition of Topoisomerase II by Antitumor Agent Bis(2,6-dioxopiperazine) Derivatives. *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 4903-4908.

- (31) Bolognese, A.; Correale, G.; Mandra, M.; Lavecchia, A.; Mazzoni, O.; Novellino, E.; La Colla, P.; Sanna, G.; Loddo, R. Antitumor Agents. 3. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Pyridoisoquinolindione and Dihydrothienoquinolindione Derivatives with Potent Cytotoxic Activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 849-858
- (32) Montecucco, A.; Pedrali-Noy, G.; Spadari S.; Zanolin, E.; Ciarrocchi, G. DNA Unwinding and Inhibition of T<sub>4</sub> DNA Ligase by Anthracyclines. *Nucleic Acids Res.* **1988**; *16*, 3907-3918.
- (33) Baguley, B. C., Denny, W. A., Atwell, G. J., and Cain, B. F. Potential antitumor agent. 34. Quantitative relationships between DNA binding and molecular structure for 9-anilino-acridines substituted in the anilino ring. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 170–177.
- (34) Yamashita, Y.; Fujii, N.; Murakata, C.; Ashizawa, T.; Okabe, M.; Nakano, H. Induction of mammalian DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage by antitumor indolocarbazole derivatives. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12069-12075.
- (35) Osheroff, N.; Shelton, E.R.; Brutlag, D.L. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9536-9543

## **8.Abbreviazioni**

DMF:dimetilformammide

HBTU:O-Benzotriazolo-N,N,N',N'-esafloruro-fosfato-tetrametil-uronio

HOBt:N-idrossibenzotriazole

HBT:1-idrossibenzotriazolo

Dipea:diisopropiletilammina

Doxo:doxorubicina

PDY:patata destrosio ed estratto di lievito

LNR: DNA lineare

CC: DNA circolare

SC: DNA superavvolto tipo americano

RLX: DNA rilassato

ATCC: collezione di colture tipo americano

ACHN: adenocarcinoma renale umano

CCRF-CEM: cellule T leucemia acuta linfoblastica

CCRF-SB: cellule B leucemia acuta linfoblastica

MT-4: cellule T CD4<sup>+</sup> che esprimono il gene TAT di HTLV-1

MRC-5:fibroblasti polmonari umani normali

MCF-7: carcinoma del seno

HeLa : carcinoma della cervice

BSA: albumina di siero bovino

FCS: siero fetale di vitello

SAR: relazione struttura attività

HT-29: adenocarcinoma di colon

VP-16:etposide

TOPO: topoisomerasi