



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE

XXI CICLO

## ***Sintesi e caratterizzazione di inibitori delle topoisomerasi I e II***

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Giuseppe Zagotto

**Dottorando:** Erika Martina

02 Febbraio 2009







|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 1.1       | Riassunto .....  | VII       |
| 1.2       | English abstract.....                                    | XIII      |
| 1.3       | Abbreviazioni.....                                       | XIV       |
| 1.4       | Indice delle figure.....                                 | XV        |
| <b>2.</b> | <b>Introduzione .....</b>                                | <b>1</b>  |
| 2.1       | Premessa .....   | 1         |
| 2.2       | Terapie antitumorali .....                               | 2         |
| 2.3       | Il DNA.....  | 3         |
| 2.3.1     | <i>I solchi</i> .....                                    | 5         |
| 2.3.2     | <i>Polimorfismo del DNA</i> .....                        | 6         |
| 2.3.3     | <i>Il superavvolgimento del DNA</i> .....                | 8         |
| 2.4       | Gli enzimi che interagiscono con il DNA.....             | 9         |
| 2.4.1     | <i>Nucleasi e ligasi</i> .....                           | 9         |
| 2.4.2     | <i>Polimerasi</i> .....                                  | 9         |
| 2.4.3     | <i>Elicasi</i> .....                                     | 10        |
| 2.4.4     | <i>Le Topoisomerasi</i> .....                            | 10        |
| 2.5       | Le interazioni DNA-Proteina .....                        | 17        |
| 2.5.1     | <i>Contatti tra DNA e proteina</i> .....                 | 19        |
| 2.6       | Interazione DNA-farmaco .....                            | 20        |
| 2.6.1     | <i>Interazioni elettrostatiche</i> .....                 | 20        |
| 2.6.2     | <i>Interazione con i solchi o "groove binding"</i> ..... | 20        |
| 2.6.3     | <i>Intercalazione</i> .....                              | 21        |
| 2.6.4     | <i>Threading intercalators</i> .....                     | 22        |
| 2.6.5     | <i>Inibitori delle topoisomerasi</i> .....               | 23        |
| 2.6.6     | <i>La Camptotecina</i> .....                             | 25        |
| <b>3.</b> | <b>Scopo del lavoro: .....</b>                           | <b>29</b> |
| 3.1       | Derivati semplificati della camptotecina.....            | 30        |
| 3.2       | Derivati della alkannina/shikonina.....                  | 35        |
| 3.3       | Derivati ibridi di mitoxantrone e amsacrina.....         | 37        |
| <b>4.</b> | <b>Parte sperimentale .....</b>                          | <b>41</b> |
| 4.1       | Materiali e Strumentazione .....                         | 42        |
| 4.1.1     | <i>Materiali</i> .....                                   | 42        |
| 4.1.2     | <i>Strumentazione</i> .....                              | 42        |
| 4.2       | Metodi: .....  | 43        |
| 4.2.1     | <i>Sintesi 1:</i> .....                                  | 43        |
| 4.2.2     | <i>Sintesi 2:</i> .....                                  | 49        |
| 4.2.3     | <i>Sintesi 3:</i> .....                                  | 55        |
| 4.2.4     | <i>Sintesi 4:</i> .....                                  | 60        |
| <b>5.</b> | <b>Discussione dei risultati .....</b>                   | <b>75</b> |
| 5.1       | Sintesi di derivati della camptotecina.....              | 76        |
| 5.2       | Sintesi di analoghi della alkannina-shikonina .....      | 78        |
| 5.3       | Gli ibridi tra mitoxantrone ed amsacrina .....           | 82        |
| <b>6.</b> | <b>Bibliografia.....</b>                                 | <b>87</b> |
| 6.1       | Allegato I .....   | 90        |
| 6.1.1     | <i>Schema di sintesi 1:</i> .....                        | 90        |
| 6.1.2     | <i>Schema di sintesi 2:</i> .....                        | 91        |
| 6.1.3     | <i>Schema di sintesi 3:</i> .....                        | 92        |
| 6.1.4     | <i>Schema di sintesi 4:</i> .....                        | 93        |
| 6.2       | Allegato II: .....                                       | 96        |



## 1.1 Riassunto

Il DNA non è una struttura statica ma flessibile e libera di muoversi nello spazio fluido della cellula. Può quindi piegarsi, annodarsi o avvolgersi su se stesso per assumere, a seconda delle necessità, diverse strutture tridimensionali. Inoltre, tutti i processi cellulari che comportano un'interazione di complessi proteici con il DNA ne alterano la struttura, avvolgendolo o disavvolgendolo, creando delle regioni super-avvolte o "linearizzate" del tutto simili a quelle che possono assumere una corda od un elastico. La struttura tridimensionale del DNA nello spazio viene controllata e regolata, per quanto riguarda i processi di avvolgimento e linearizzazione, dalle DNA-Topoisomerasi. Le DNA-Topoisomerasi sono enzimi ubiquitari sensibili allo stato topologico del DNA e in grado di convertire un isomero topologico in un altro catalizzando l'idrolisi e la successiva riformazione di un legame fosfodiesterico su uno o entrambi i filamenti. Questi enzimi sono essenziali per i principali processi cellulari, quali replicazione, trascrizione, duplicazione del DNA ma anche assemblaggio della cromatina e segregazione dei cromosomi in quanto modificano lo stato topologico del DNA.

Le Topoisomerasi note sono state raggruppate in due classi in base al loro meccanismo d'azione ed alle proprietà chimico/fisiche. Gli *enzimi di classe I*, monomerici, introducono una rottura su un singolo filamento di DNA, rilassandolo di un giro alla volta e cambiando il numero di legame di una sola unità; la reazione non richiede energia sottoforma di ATP, ma usa l'energia torsionale dell'acido nucleico superavvolto. La topologia e il grado di superavvolgimento del DNA sono descritti mediante l'equazione  $Lk = Tw + Wr$  dove  $Lk$  rappresenta il numero di legame ("linking number") che è il numero totale di volte con cui un filamento si incrocia su un altro in una molecola chiusa di DNA. Il numero di legame è composto da  $Tw$  ("twist number") che è il numero di avvolgimento ovvero il numero totale di giri d'elica del duplex ( $Tw = n / A$ , dove  $n$  è il numero di nucleotidi delle molecole ed  $A$  il numero di nucleotidi per giro d'elica) e da  $Wr$  ("writhing number") o numero di superavvolgimento, che esprime i ripiegamenti dell'asse su sé stesso. Gli *enzimi di classe II*, invece, sono costituiti da più subunità, introducono tagli in entrambi i filamenti del DNA per srotolarlo o avvolgerlo, cambiando il numero di legame di due unità; la reazione richiede ATP. Le Topoisomerasi sono diverse tra loro, sia per il meccanismo d'azione che per la funzione cellulare. Le accomuna il fatto che entrambe utilizzano l'OH di una *tirosina* per dare un attacco nucleofilo ad un fosfato del DNA. Si ha così una transesterificazione: si rompe un legame fosfodiesterico con uno zucchero del DNA e se ne forma uno fosfotirosinico. È questo il cosiddetto complesso scindibile o "cleavable complex" che negli ultimi anni ha

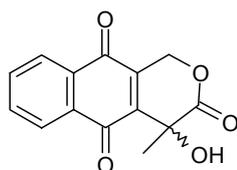
attratto numerose ricerche. Infatti stabilizzare questo complesso significa impedire al DNA di assumere nuovamente la sua struttura secondaria perchè non si riforma il legame fosfato-zucchero che era stato oggetto della precedente transesterificazione. La mancata ricostituzione della struttura tridimensionale del DNA intatto provoca l'innescarsi di processi di controllo che, qualora il danno non fosse riparato, inducono l'apoptosi.

Questo rappresenta una interessante prospettiva terapeutica quando si voglia ottenere un effetto citotossico che può essere usato se si tiene conto del fatto che le cellule di alcuni tumori si replicano più velocemente di altre. Inoltre, se si tiene conto del fatto che i tessuti tumorali, le cui cellule sono in attiva proliferazione, presentano una maggior concentrazione di enzimi implicati nel controllo della topologia del DNA e del fatto che alcuni di questi enzimi si trovano maggiormente espressi in particolari forme tumorali, si può ottenere una maggiore diversificazione tra cellule anomale e sane e ciò può essere sfruttato ai fini terapeutici.

Le Topoisomerasi hanno quindi assunto un'importanza primaria nella pratica oncologica perchè molti farmaci antitumorali hanno come bersaglio specifico questi enzimi e, quindi, lo sviluppo di farmaci più efficienti è uno degli obiettivi primari della ricerca oncologica e biotecnologica.

### La topoisomerasi I

Nel corso della prima parte del progetto di dottorato la mia attenzione si è rivolta alla sintesi di potenziali inibitori di Topoisomerasi I, partendo dal concetto di semplificazione molecolare e di inibitore interfacciale. È stato quindi, dapprima sintetizzato il composto *4-Idrossi-4-metil-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran-3,5,10-trione*, la cui struttura era tra quelle proposte in uno studio di modellistica molecolare<sup>1</sup>.



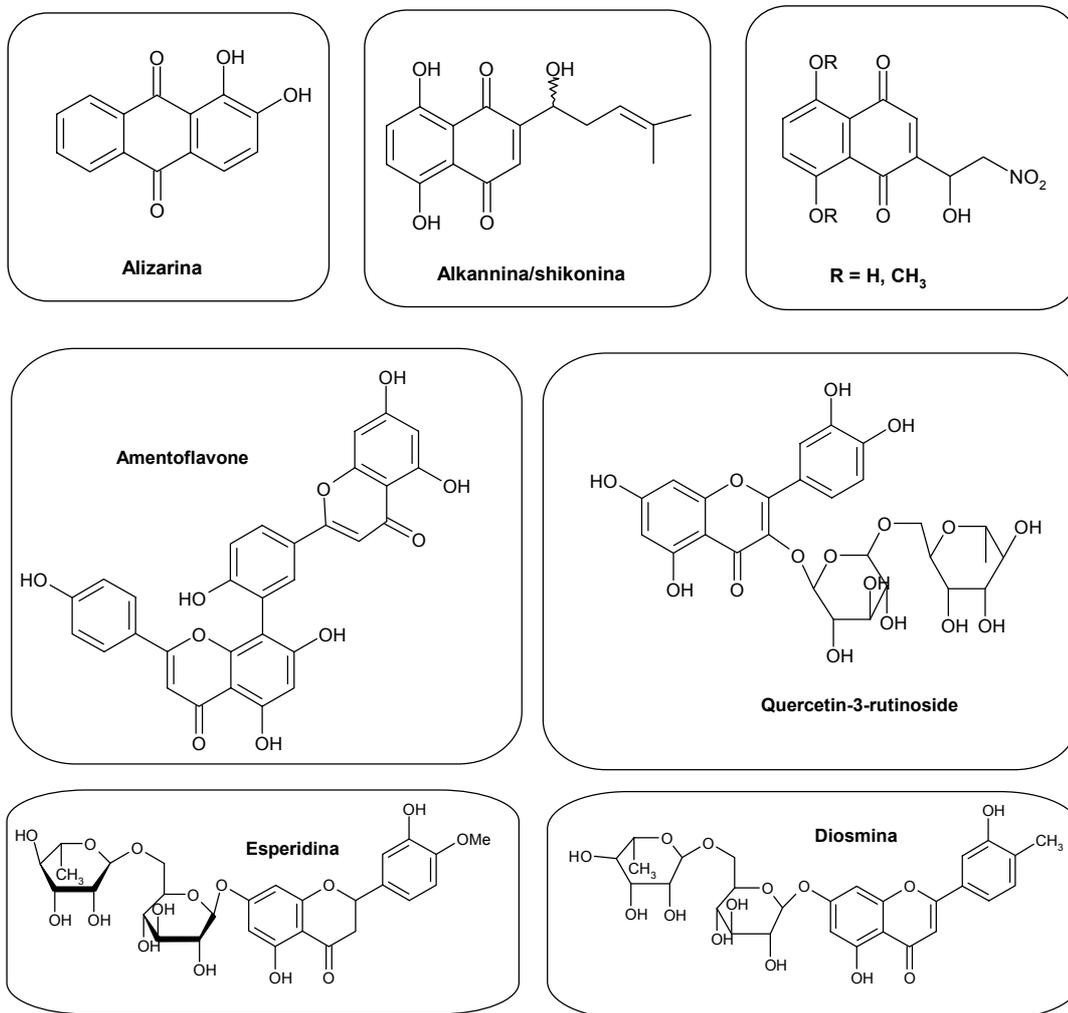
Purtroppo questo derivato non ha dimostrato attività citotossica né sui ceppi Topoisomerasi I *wild-type* né sui ceppi resistenti alla camptotecina.

Test *in vivo* condotti su ceppi di *S.cerevisiae* esprimenti la topoisomerasi I per verificare il comportamento di alcuni prodotti naturali isolati presso il nostro laboratorio di ricerca hanno mostrato che alcuni composti di origine naturale, tra cui quercetin-3-rutinoside, amentoflavone, esperidina e diosmina sono citotossici a concentrazione 10 µg/ml e che alizarina e alkannina fino a 1 µg/ml.

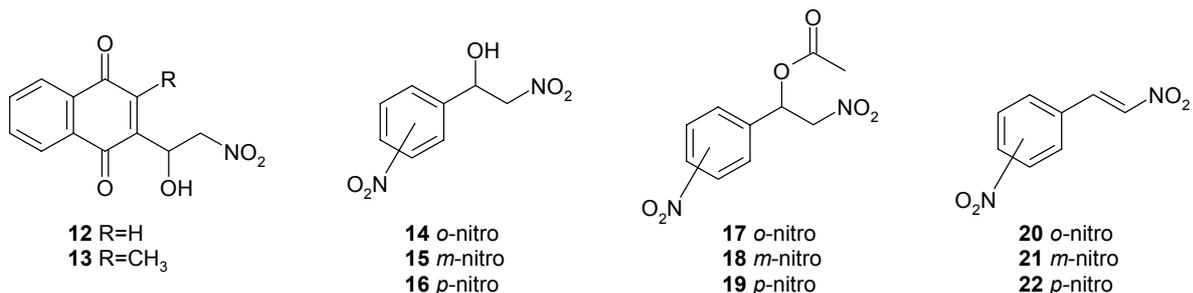
---

<sup>1</sup> Gli studi di modellistica molecolare sono stati condotti presso la sezione di Modellistica molecolare del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova. Referente: Prof. Stefano Moro.

Tra i composti testati comparivano anche alcuni derivati della shikonina caratterizzati da un nucleo aromatico e da una catena nitroalcolica dimostrati attivi a concentrazioni di 10 mg/ml.

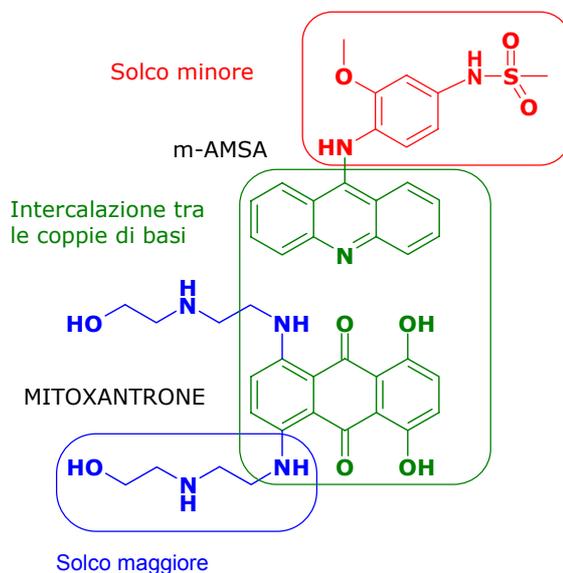


I risultati incoraggianti ci hanno fatto sintetizzare alcuni derivati. In particolare, si sono indagate variazioni al numero di nuclei aromatici mantenendo invariata la catena laterale nitroalcolica e possedenti un nitrogruppo aromatico in diverse posizioni e derivati naftalenici non recanti i sostituenti ossidrilici in modo da valutarne l'influenza. I derivati sono stati sintetizzati mediante reazione di Henry o addizione nitroaldolica eseguita in condizioni di catalisi basica a partire dalle corrispondenti aldeidi. Mentre per i derivati a singolo anello aromatico le aldeidi variamente sostituite sono disponibili commercialmente, per i derivati naftochinonici si è provveduto alla formilazione del 1,4-naftochinone con una reazione di tipo Vilsmeier o per reazione di formilazione catalizzata da un acido di Lewis in presenza di metossimetano (derivato 3-metil).

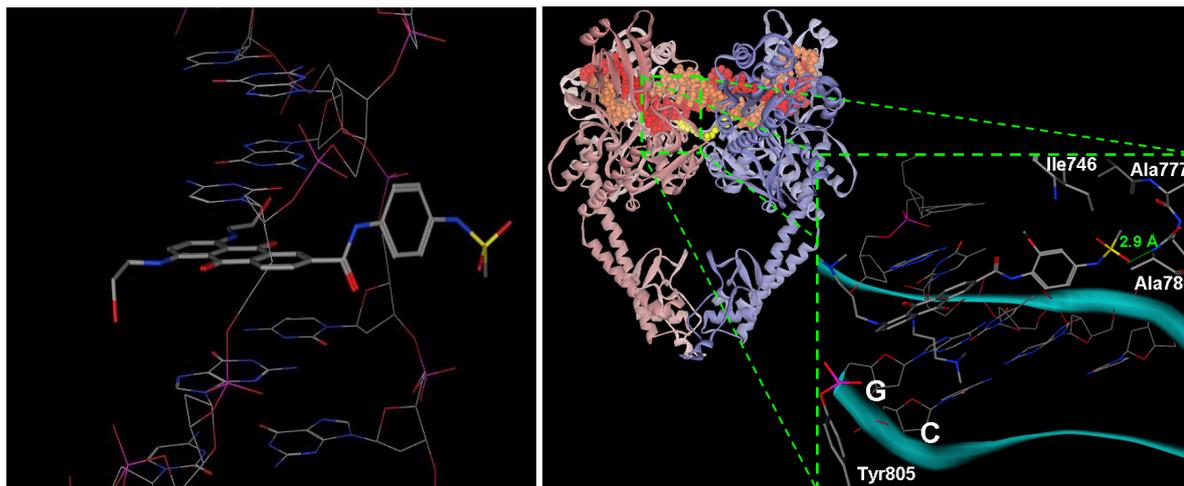


## La topoisomerasi II

La seconda parte del progetto di dottorato riguarda la sintesi e la caratterizzazione di una serie di antrachinoni progettati per bloccare il “cleavable complex” dell’enzima topoisomerasi II. L’idea è nata seguendo la strategia di coniugare una efficiente capacità di intercalazione con una azione combinata sui solchi del DNA. Per fare questo abbiamo scelto come modello il mitoxantrone e l’amsacrina.

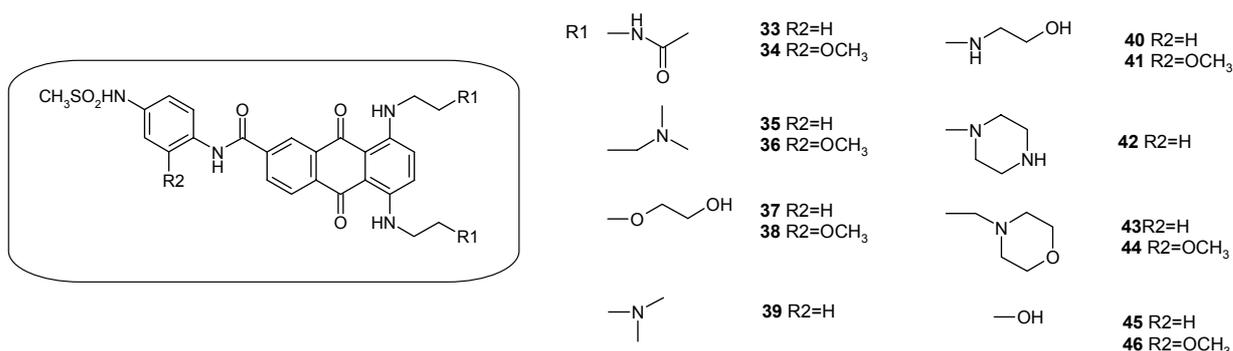


Il nucleo antracendionico del mitoxantrone si intercala perpendicolarmente all’asse maggiore delle coppie di basi del DNA e le catene sostituite in posizione 1 e 4 si inseriscono, in versi opposti, nel solco maggiore. L’amsacrina, si intercala parallelamente all’asse dello scheletro del DNA con l’azoto acridinico al centro del solco maggiore e la catena metansolfonilica si colloca nel solco minore del DNA.



A sx, docking del derivato 45 nel DNA. A dx, docking del derivato 36 nella topoisomerasi II.

Si è pensato quindi di sintetizzare una serie di derivati che, pur mantenendo la catena metansolfonica e il nucleo antracendionico si diversifichino nelle catene sostituite in 1,4 variando la disponibilità di queste porzioni alle interazioni con il solco maggiore.



Le catene laterali preposte ad imitare quelle del mitoxantrone sono costituite da un braccio etilaminico sostituito con un gruppo N-acetilammino, 2-idrossiammino, N-dimetilammino-metil, 2-idrossi-etossi, piperazinil, 3-morfolin-4-il-metil. Sono state selezionate a partire da dati di letteratura e riprendono le caratteristiche della catena laterale del mitoxantrone in quanto essenziale nella formazione di un importante legame elettrostatico tra la sua forma protonata e l'anione fosfato dello scheletro del DNA.

## Conclusioni

### Topoisomerasi I

Il composto 6 è stato ottenuto con una resa complessiva del 9% in sei passaggi.

I composti 12 e 13 sono stati ottenuti con una resa complessiva di 11% e 36% rispettivamente. I composti 14-22 sono stati ottenuti con una resa variabile, mediamente 50% in due passaggi.

I composti sono stati testati<sup>2</sup> ma si sono dimostrati purtroppo poco attivi *in vivo* su ceppi di *S.cerevisiae* esprimenti che la topoisomerasi I *wild-type* e topol resistente alla CPT, ma la particolare modalità di essere citotossici per alcuni di questi composti è ancora oggetto di indagine.

### Topoisomerasi II

I composti **33-46** sono stati sintetizzati e caratterizzati. Mediamente, i composti con la catena metansolfonanilica sono stati ottenuti con una resa del 10% a partire dall'idrochinone, mentre i composti con catena 2-metossi-4-metansolfonanilica con una resa del 17%.

I composti sintetizzati sono stati sottoposti a test di citotossicità<sup>3</sup> su linee cellulari tumorali mediante test MTT. I composti 35 e 36 mostrano una citotossicità simile all'amsacrina, mentre i composti 37, 40 e 41, pur mantenendo una catena laterale simile al mitoxantrone mostrano citotossicità molto più modeste. Non si è dimostrata una sensibile differenza nella citotossicità di 35 e 36, probabile indizio della scarsa importanza del sostituente 2-metossi sulla porzione amsacrinica. La selettività nei confronti di linee cellulari diverse non può essere chiaramente asserita, nonostante i dati mostrino una suscettibilità maggiore delle linee A375 e HL-60 nei confronti di questo tipo di composti.

Inoltre dati preliminari mostrano come questi composti non si dimostrino attivi verso la topoisomerasi I e come l'isoforma  $\beta$  della topoisomerasi II sia più sensibile all'inibizione. Le proprietà biologiche di questi derivati sono ancora oggetto di indagine presso laboratori specializzati.

In conclusione, ciò che emerge dagli studi di citotossicità e di binding del DNA è che solo piccole catene laterali che mantengano comunque un gruppo protonabile ad una distanza di due-tre gruppi metilenici dall'azoto del nucleo aromatico planare sono attivi. Sarebbe utile chiarire anche l'effetto di direzionabilità, ossia l'eventuale preferenzialità nell'intercalazione e della selettività nei confronti di linee tumorali diverse.

---

<sup>2</sup> Laboratorio Prof. Benedetti, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova.

<sup>3</sup> Laboratorio Dr.ssa Marzano, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova.

## 1.2 English abstract

The present work deals with the synthesis of topoisomerase I and II inhibitors. The aim of our work was, in the first attempt, to synthesize a series of simplified derivatives of the camptothecin nucleus that were still able to interact with the topoisomerase I-CPT cleavable complex according to a molecular modelling study based on the crystallographic data. The derivative **6** was obtained in six steps from the 2-methoxy-1,4-naphthoquinone with 9% yield. The biological data for the activity of this compound and of its intermediates were not encouraging. According to the cytotoxicity of the natural compound alkannin/shikonin and of some derivatives bearing a nitrogroup in the side chain, we decided to synthesize a series of compounds bearing a nitrophenilic or a naphthoquinonic ring substituted in the 2 position with a nitroalcolic chain. We obtained the compounds **12-16** and some derivatives that show an peculiar cytotoxicity in *S.cerevisiae* cultures that is still to be fully investigated.

The compounds **33-46** were synthesized to investigate the hypothesis of conjugating the active moieties of mitoxantrone and amsacrine. Their main structural features are: an anthracene-9,10-dione as base chromophore, two identical side chains in positions 1 and 4 of the anthraquinone nucleus as in mitoxantrone and the 4-methanesulphonamidoaniline substituent linked in position 6. Hence the new compounds mix structural features of both the parent compounds and should interact with DNA positioning the two chains within the major groove and the 4-methanesulphonamidoaniline substituent in the minor groove. The two chains in the 1,4 positions of the derivatives were selected according to literature data. The compounds **33-46** were tested for their biochemical behaviour. The compounds **35** and **36** show intercalating properties, capacity of inhibition toward the enzyme topoisomerase II and cytotoxic properties similar to the parent compounds, but more about their biological behaviour is to be investigated. The preliminary data show that there is a strict spatial relationship with the activity of the derivatives.

### 1.3 Abbreviazioni

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Ac <sub>2</sub> O                             | anidride acetica                    |
| AlCl <sub>3</sub>                             | alluminio cloruro                   |
| CDCl <sub>3</sub>                             | cloroformio deuterato               |
| CPT   | camptotecina                        |
| AcCOOH  | acido acetico                       |
| CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> Cl            | metansolfonilcloruro                |
| C.A.N.  | cerio(IV) ammonio nitrato           |
| d   | doppietto                           |
| d(g/mL)                                       | densità(g/mL)                       |
| dd  | doppietto di doppietti              |
| ddd   | doppietto di doppietti di doppietti |
| Et <sub>2</sub> O                             | dietiletere                         |
| DMF   | dimetilformammide                   |
| DMSO  | dimetilsolfossido                   |
| EtOAc   | etile acetato                       |
| EtOCOCOMe                                     | etil piruvato                       |
| g   | grammi                              |
| h   | ore                                 |
| HCl   | acido cloridrico                    |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                | acido solforico                     |
| J   | costante di accoppiamento (Hz)      |
| IR  | Spettrometria infrarossa            |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                | carbonato di potassio               |
| m   | multipletto                         |
| M(mol/L)                                      | Molarità(mol/L)                     |
| MeOH  | metanolo                            |
| NaOCH <sub>3</sub>                            | metossido di sodio                  |
| MHz   | Megahertz                           |
| min.  | minuti                              |
| mg  | milligrammi                         |
| ml  | millilitri                          |
| mol   | Moli                                |
| mmol  | millimoli                           |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | ditionito di sodio                  |
| NaCl  | cloruro di sodio                    |
| NBS   | N-Bromosuccinimide                  |
| n-BuLi  | normal butillitio                   |
| NMR   | Risonanza Magnetica Nucleare        |
| Pd/C  | palladio su carbone                 |
| PM  | peso molecolare                     |
| Pf  | punto di fusione                    |
| ppm   | parti per milione                   |
| q   | quartetto                           |
| qt  | quartetto di tripletti              |
| s   | singoletto                          |
| SOCl <sub>2</sub>                             | cloruro di tionile                  |
| TMSCl   | trimetilsilil cloruro               |
| TMSI  | trimetilsilil ioduro                |
| t   | tripletto                           |
| rt  | temperatura ambiente                |
| TLC   | Thin Layer Chromatography           |

## 1.4 Indice delle figure

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Le basi azotate del DNA: da sx alto Adenina, Timina, Guanina, Citosina.....  | 4  |
| Figura 2 A sx: rappresentazione dello scheletro del DNA con i legami idrogeno (tratteggiati) formati dalle basi azotate. A dx: rappresentazione 3D della struttura del DNA. <sup>10</sup> .....   | 4  |
| Figura 3 A sx: I solchi del DNA nella forma B: il solco maggiore in arancio, quello minore in giallo <sup>1</sup> . Gli atomi di carbonio sono rappresentati in bianco. A dx, le basi appaiate del DNA e l'esposizione dei gruppi nei solchi. ....  | 5  |
| Figura 4 Forme del DNA: da sx forma A, B, Z. ....   | 7  |
| Figura 5 A sx DNA superavvolto negativamente e a dx topoisomero rilassato di DNA. <sup>1</sup> .....  | 8  |
| Figura 7 Topoisomerasi I umana in complesso con 2sDNA di 22bp(PDBID: 1K4S).....   | 13 |
| Figura 8 Sito catalitico della topoisomerasi I.....   | 13 |
| Figura 9 La topoisomerasi II in presenza di ADP <sup>20</sup> .....   | 15 |
| Figura 10 Meccanismo d'azione della topoisomerasi II. <sup>20</sup> .....   | 16 |
| Figura 11 Struttura del complesso ternario Topoisomerasi I-DNA-Topotecan. <sup>38</sup> .....   | 31 |
| Figura 12 A sx: Amminoacidi e gruppi funzionali coinvolti nell'interazione tra la topoisomerasi I e il topotecan (in verde) e camptotecina (in giallo). Parte a vista di lato, parte b vista da sopra. <sup>38</sup> A dx: interazione tra l'enzima e il topotecan, in dettaglio. <sup>36</sup> ..... | 32 |
| Figura 13 Schema del modello di interazioni che si intende sfruttare.....   | 37 |
| Figura 14 Modello di intercalazione del mitoxantrone con il DNA.....  | 38 |
| Figura 15 Complesso tra m-AMSA e DNA. ....  | 38 |
| Figura 16 Modello molecolare dell'ibrido Mitoxantrone-AMSA 45 intercalato nel DNA. ....   | 39 |
| Figura 17 Interazioni tra il derivato 36 nel complesso topoisomerasi II-DNA. ....   | 40 |
| Figura 18 Meccanismo della reazione di Vilsmeier. <sup>41</sup> .....   | 79 |
| Figura 19 Meccanismo per la formilazione di 1. <sup>41</sup> .....  | 80 |
| Figura 20 Meccanismo della reazione di sostituzione dei fenoli con le catene. <sup>43</sup> .....   | 84 |



## **2. Introduzione**



## 2.1 Premessa

L'incidenza delle patologie croniche è distribuita equamente per sesso mentre più della metà dei decessi riguarda persone sotto i 70 anni. Contrariamente a quanto si può pensare, soltanto il 20% delle morti avviene in Paesi ad alto reddito, mentre l'80% si registra in Paesi a reddito medio-basso, dove si concentra la maggioranza della popolazione mondiale. Tra le malattie croniche, le patologie cardiovascolari, principalmente cardiopatie e ictus, sono la causa principale di morte, seguite da tumori, malattie croniche respiratorie e diabete.

Le patologie neoplastiche costituiscono il secondo grande gruppo di cause di morte, dopo quelle cardiache, e rappresentano, quindi, un problema di assoluta rilevanza sociale soprattutto nei paesi più sviluppati industrialmente dove negli ultimi decenni si è osservato un continuo incremento del numero di casi diagnosticati legato al prolungamento della vita media, alla diminuzione dell'incidenza di decessi dovuti ad altre cause e all'aumentata esposizione della popolazione a fattori oncogeni naturali e non<sup>2</sup>.

Si definisce tumore (o neoplasia) una neoformazione in cui la moltiplicazione delle cellule risulta incontrollata e progressiva. Un tumore può essere classificato come maligno, benigno o "borderline". Un tumore maligno, detto anche cancro, possiede la capacità di invadere i tessuti circostanti e di sviluppare delle metastasi poiché le cellule di una neoplasia maligna sono dotate di minor adesività rispetto a quelle normali, per cui sono in grado di staccarsi dalla massa originaria e di invadere zone distanti del corpo attraverso il circolo linfatico o vascolare; un tumore benigno, al contrario, non ha queste proprietà e il "borderline" è un tipo di neoplasia la cui classificazione in maligna o benigna risulta difficoltosa e poco chiara con gli attuali metodi clinici di diagnosi.

Durante il processo di replicazione del DNA che precede la divisione cellulare si verificano normalmente modificazioni isolate (mutazioni puntiformi o che riguardano più basi, accoppiamenti illegittimi tra le basi o altro). La stabilità del patrimonio genetico è però garantita da una serie di controlli che provvedono alla riparazione del DNA danneggiato<sup>3</sup>. Questo permette il corretto alternarsi delle varie fasi del ciclo cellulare, e, in caso di emergenza, rallenta la progressione del ciclo stesso fino a quando le anomalie non sono state rimosse. In particolari situazioni, spesso in presenza di concomitanti fattori ambientali mutageni che creano una situazione di stress per la cellula, la frequenza di induzione del danno e la sua gravità risultano maggiori rispetto alla capacità di riparazione della cellula. Si ha, quindi, un danno irreversibile nella cellula ed essa comincia a proliferare in modo sregolato<sup>4</sup>.

Il cancro si sviluppa attraverso un processo multistadio nel quale gli eventi critici sono danni al DNA. Si tratta, quindi, di una malattia genetica e i geni colpiti possono essere:

- proto-oncogeni: codificano per proteine che promuovono la crescita cellulare;
- geni oncosoppressori: bloccano la crescita cellulare<sup>5</sup>.

Il delicato equilibrio tra attivazione e soppressione permette una corretta progressione della cellula nel suo ciclo vitale<sup>6</sup>. Il verificarsi di mutazioni che aumentano l'attività di proto-oncogeni, che diventano quindi oncogeni, o che diminuiscono la funzione dei geni oncosoppressori, portano ad una proliferazione cellulare sregolata e all'alterazione dei meccanismi di differenziazione con sviluppo di neoplasia<sup>5</sup>. La maggior parte dei tumori contiene alterazioni sia a carico di geni oncosoppressori che di proto-oncogeni; infatti, l'alterazione di uno solo dei due tipi di geni non è generalmente sufficiente a far sì che la cellula diventi maligna, normalmente ciò avviene quando si verificano contemporaneamente la conversione del proto-oncogene in oncogene e la perdita della funzione oncosoppressiva; in più, in alcune tipologie di tumori sono necessarie ulteriori variazioni dell'informazione genetica per realizzare un fenotipo chiaramente metastatico<sup>4</sup>.

## 2.2 Terapie antitumorali

Quando si parla comunemente di tumore si tende a considerarlo come un'unica tipologia di malattia, in realtà il termine ne contempla numerose che hanno cause molteplici e distinte, che colpiscono organi diversi e che richiedono pertanto protocolli clinici e trattamenti curativi differenti per ogni specifica forma di tumore e per lo stadio di sviluppo in cui si trova<sup>7</sup>.

In linea generale, la strategia terapeutica contro la neoplasia prevede un iniziale ciclo di chemioterapia per ridurre le dimensioni della massa tumorale, cui segue l'eliminazione, il più completa possibile, della stessa con terapia radiante o chirurgia. Per evitare poi che si formino metastasi, il paziente viene sottoposto ad ulteriori cicli di chemioterapia, spesso in combinazione con terapie radianti.

In ogni caso la conseguenza dell'uso di un farmaco antineoplastico è l'innescò di un processo apoptotico che porta alla morte della cellula tumorale. Questo processo di "morte cellulare programmata" nel quale la cellula morta viene poi fagocitata e degradata, è un meccanismo fisiologico attivo e altamente organizzato e controllato a livello genetico, in cui la cellula "decide di morire" a differenza della necrosi che è invece un processo passivo in cui un danno alla cellula ne causa il rigonfiamento e la successiva lisi. Gli organismi viventi attraverso l'apoptosi eliminano le cellule non correttamente sviluppate, danneggiate oppure invecchiate (cioè quelle dove almeno un telomero è divenuto troppo corto).

I farmaci antineoplastici ideali sono quelli capaci di eliminare soltanto le cellule tumorali senza danneggiare quelle sane. La distinzione più marcata fra cellule normali e quelle neoplastiche è rappresentata dal fatto che quest'ultime sono caratterizzate da una anomala divisione cellulare. La chemioterapia sfrutta, in molti casi, la differente velocità di proliferazione tra cellule normali e cancerose, ad esempio i farmaci alchilanti inducono dei danni al DNA che possono essere riparati da una cellula sana in stato di quiescenza, poiché ha molto tempo a disposizione, cosa che non è invece possibile in una cellula neoplastica in fase di replicazione. Nei tumori a rapida proliferazione (leucemie, linfomi), inoltre, il genoma è maggiormente vulnerabile a causa dell'elevata frequenza dei cicli replicativi poiché il DNA durante le fasi di duplicazione è maggiormente disavvolto e quindi più accessibile ai farmaci che interagiscono con esso. Questa diversità permette una terapia più mirata.

Purtroppo i farmaci antitumorali oggi disponibili presentano un basso indice terapeutico a causa della bassa specificità d'azione e, quindi della tossicità marcata. Per limitare la tossicità dei farmaci antineoplastici si può ricorrere alla polichemioterapia, cioè all'utilizzo combinato di farmaci diversi: in questo modo si ha un vantaggioso aumento dell'azione terapeutica ma non degli effetti collaterali.

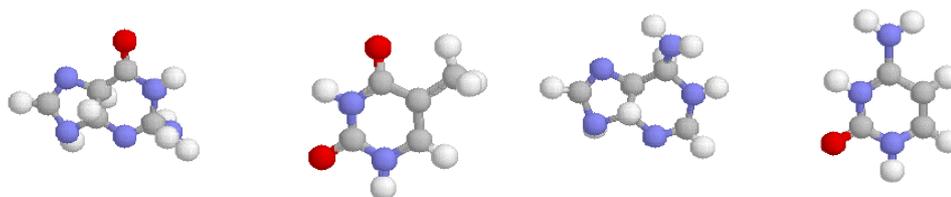
Poiché alterazioni a carico del DNA determinano sviluppo della malattia tumorale, la nostra ricerca si indirizza verso la scoperta di farmaci anticancro che abbiano come bersaglio<sup>8</sup>:

1. il DNA;
2. gli enzimi che interagiscono con il DNA;
3. complessi DNA-proteine.

Andiamo ora a vedere più da vicino questi tre bersagli.

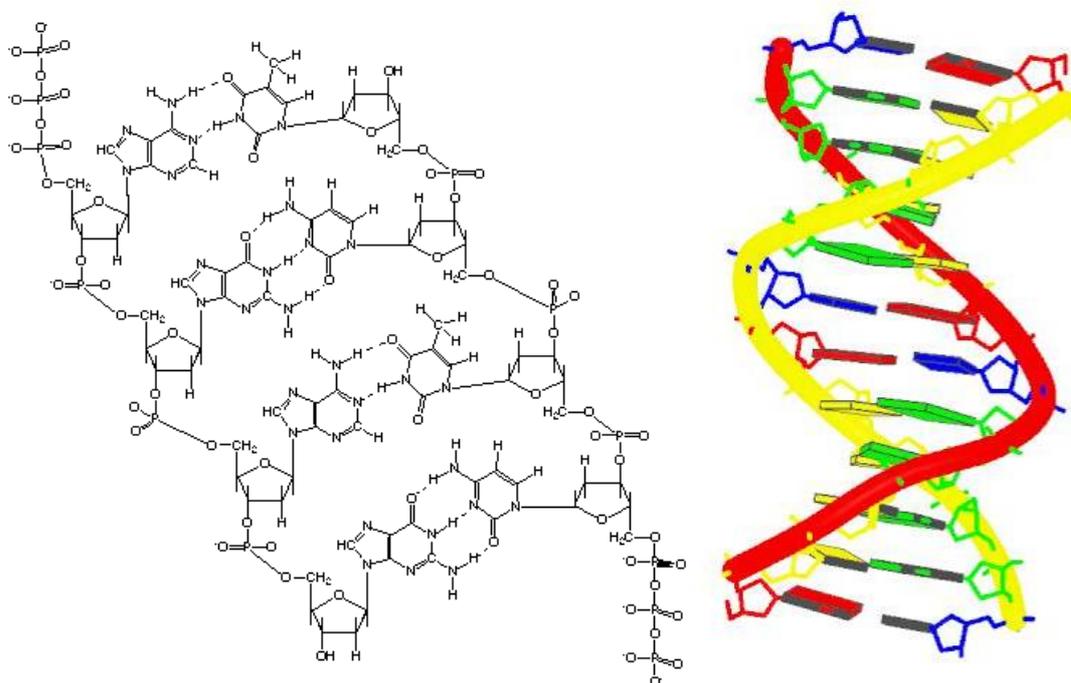
## **2.3 II DNA**

L'acido desossiribonucleico conserva e trasmette il patrimonio genetico. La sua struttura di base secondo il modello di Watson e Crick (B-DNA) consiste in una doppia elica il cui scheletro è costituito dal legame 3',5'-diestereo tra desossiribosio e gruppo fosfato<sup>9</sup>. Legate al carbonio anomero del residuo zuccherino si trovano le basi azotate puriniche Adenina (A) e Guanina (G) e pirimidiniche Timina (T) e Citosina (C) appaiate in modo specifico (A-T e G-C).



**Figura 1** Le basi azotate del DNA: da sx alto Adenina, Timina, Guanina, Citosina.

La doppia elica è stabilizzata da interazioni non covalenti: ponti idrogeno tra basi azotate di catene opposte e antiparallele, 2 tra A-T e 3 tra G-C; interazioni idrofobiche di tipo Van der Waals tra le porzioni planari delle basi che si impilano all'interno dello scheletro.



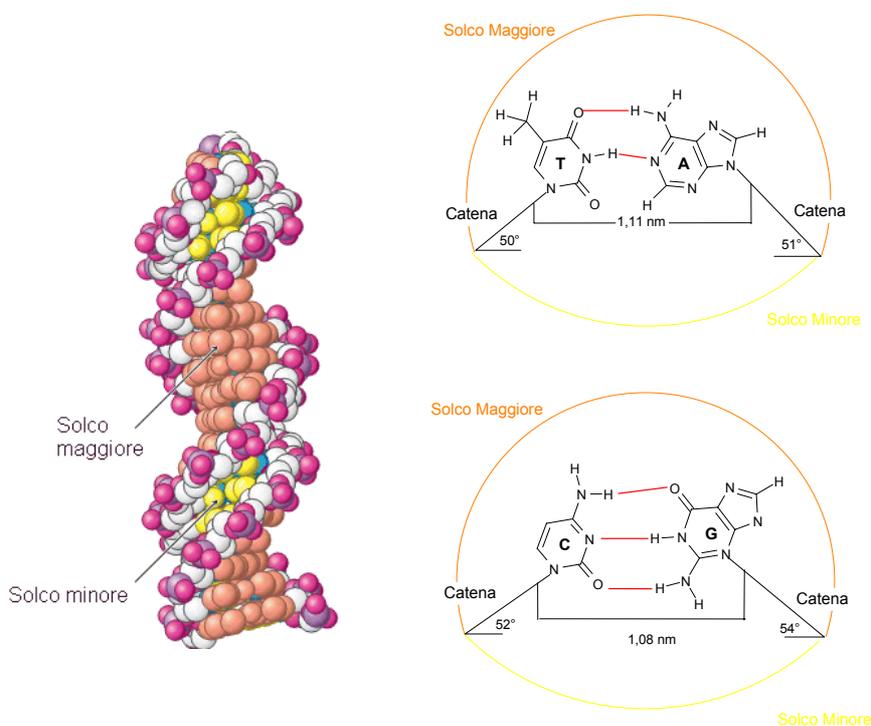
**Figura 2** A sx: rappresentazione dello scheletro del DNA con i legami idrogeno (tratteggiati) formati dalle basi azotate. A dx: rappresentazione 3D della struttura del DNA.<sup>10</sup>

Le interazioni tra basi non sono limitate soltanto alla formazione di legami idrogeno ma avvengono anche per mezzo di un sistema di interazioni idrofobiche di tipo  $\pi$ - $\pi$ , Van der Waals e dipolo-dipolo. Questa seconda categoria di interazioni risulta essere determinante per l'impilamento idrofobico delle basi; in pratica, i piani contenenti gli anelli eterociclici delle basi azotate, all'interno della doppia elica, risultano quasi paralleli tra loro e perpendicolari al lungo asse della macromolecola. L'importanza di tali interazioni idrofobiche risiede nel fatto che esse riducono il contatto delle basi con l'acqua e risultano stabilizzare la struttura tridimensionale del DNA sebbene non siano importanti per la conservazione dell'informazione genetica come lo sono i legami idrogeno. La doppia elica è dunque

stabilizzata sia da legami idrogeno sia da interazioni idrofobiche proprio perché le forze di tali legami sono additive. A causa della ripetitività della sua struttura il DNA è stato considerato una molecola rigida ma in realtà esso presenta una spiccata flessibilità conformazionale che lo hanno portato ad essere considerato un vero e proprio bersaglio recettoriale.

### 2.3.1 I solchi

Le interazioni sopra descritte mostrano come i legami zucchero-base azotata non siano direttamente opposti l'uno all'altro. Si determinano quindi due solchi di larghezza diversa tra lo scheletro ribosio-fosfato e la superficie interna della molecola: in questi solchi le basi risultano esposte al solvente e, quindi, disponibili all'interazione anche base-specifica con sostanze biologiche o chimiche senza preliminari modificazioni alla doppia elica.



**Figura 3 A sx: I solchi del DNA nella forma B: il solco maggiore in arancio, quello minore in giallo<sup>1</sup>. Gli atomi di carbonio sono rappresentati in bianco. A dx, le basi appaiate del DNA e l'esposizione dei gruppi nei solchi.**

La maggior parte delle proteine specifiche per il DNA si lega nei solchi. Qui, infatti, si affacciano siti idonei a dare legami idrogeno, ottimi elementi di riconoscimento per molti enzimi e farmaci. Si può notare come le basi del DNA presentano nei solchi atomi di H, N ed O che possono costituire siti di legame a idrogeno per il legame con molecole esterne. Tali

legami ad idrogeno possono essere formati direttamente con gli amminoacidi delle proteine o con i farmaci, oppure indirettamente con l'interposizione di molecole d'acqua o ioni metallici. I siti di legame a idrogeno sono importanti elementi di riconoscimento, così come il metile della timina (assente nella citosina) per le interazioni idrofobiche. Il solco maggiore rappresenta un veicolo di informazione più dettagliato rispetto al solco minore in quanto mostra più possibilità di legame e asimmetria. È, quindi, proprio il solco maggiore che accoglie la maggior parte delle strutture proteiche che interagiscono con il DNA, cioè gli enzimi di processo.

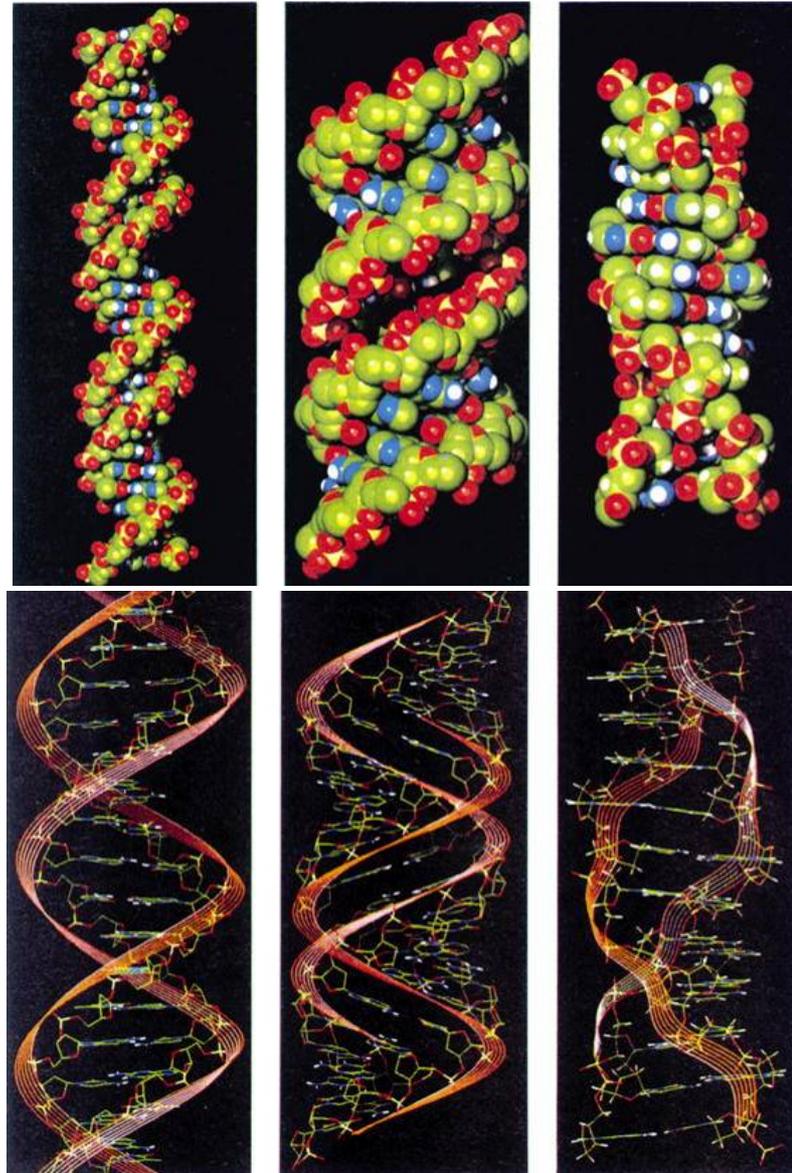
### 2.3.2 Polimorfismo del DNA

In relazione alla posizione relativa assunta dalle basi nei confronti del rispettivo zucchero (*sin* o *anti*), si generano diverse forme del DNA, principalmente tre naturali (A,B e Z) ed una sintetica (D).

La forma B, o di Watson-Crick, è la forma che prevale nelle normali condizioni fisiologiche di forza ionica ed elevata idratazione. Il DNA si avvolge in modo destrorso con periodo di 10 basi/giro; le basi sono perpendicolari all'asse di avvolgimento e la loro conformazione nei confronti del ribosio è *anti*. In queste condizioni i due solchi maggiore e minore sono molto evidenti.

La forma A, sempre destrorsa è presente fisiologicamente per locali alte concentrazioni di cationi o minore grado di idratazione. Il periodo dell'elica è di 11 bp e anch'essa presenta conformazione *anti*. In queste condizioni, i solchi che si formano sono meno evidenti ma si genera un canale centrale vuoto per la traslazione delle basi dall'asse di avvolgimento.

La forma Z, si riscontra soprattutto nelle zone ricche di G-C. L'elica risulta più lunga e sottile e si avvolge in modo sinistrorso con passo di 12 bp; le basi puriniche sono, in questo caso, *sin*, mentre le pirimidine *anti*, con l'andamento tipico a zig-zag. Si determina un singolo solco, stretto e profondo. La presenza di questa isoforma pare legata a processi di trascrizione DNA.



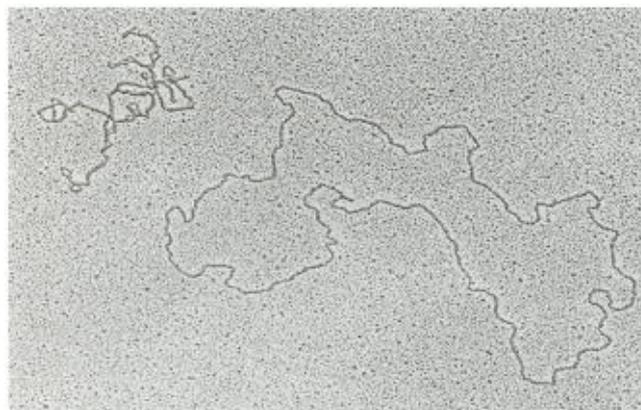
**Figura 4** *Forme del DNA: da sx forma A, B, Z.*

È proprio l'esistenza di diverse forme e la dinamica del passaggio da una all'altra che permette al DNA di conservare e replicare l'informazione genetica. Questo dinamismo, però, lo rende anche molto suscettibile a danni esterni che possono compromettere la sua fedeltà. Per questa ragione, esistono numerosi meccanismi che interagiscono in maniera stretta con il DNA: lo controllano, lo compattano, presiedono alla sua replicazione, riparano i danni fisiologici o innescano meccanismi di morte cellulare quando si rende necessario. Supervisor e attori di questi processi sono proteine specifiche che interagiscono con il DNA.

### 2.3.3 Il superavvolgimento del DNA.

Il genoma umano è costituito da circa  $3 \cdot 10^9$  coppie di basi, distanti tra loro 3,4Å. In teoria, la sua estensione dovrebbe essere pari a circa un metro: in realtà esso si trova compattato all'interno del nucleo della cellula in un volume di qualche  $\mu\text{m}^3$ . La compattazione avviene per avvolgimento dell'asse del DNA su se stesso e attorno a strutture proteiche basiche, gli istoni<sup>11</sup>. Esistono cinque tipi di istoni che formano un ottamero intorno al quale il DNA si avvolge in modo sinistrorso formando una struttura chiamata nucleosoma avente il diametro di 11 nm. Il DNA interagisce con gli istoni essenzialmente tramite legami idrogeno. Il loro ruolo fondamentale è quello di organizzare il DNA compattandolo consentendo alla cellula di conservarlo in un volume piccolo come quello del nucleo.

Questa configurazione, detta *superavvolgimento*, si sovrappone all'avvolgimento naturale della doppia elica e viene detto positivo se ha lo stesso senso rotatorio della doppia elica (destrorso), o negativo nel caso contrario (sinistrorso). Il DNA non è una struttura statica, ma è libera di muoversi nello spazio fluido della cellula, assumendo varie conformazioni topologiche. Tale stato topologico del DNA è definito dal numero di avvolgimenti di un filamento sull'altro e della doppia elica su se stessa, chiamato "numero di legame". Molecole di acido nucleico con diverso numero di legame sono topoisomeri e si possono interconvertire soltanto tagliando uno o entrambi i filamenti di DNA. Esistono degli enzimi, chiamati topoisomerasi, che permettono tale interconversione, determinando la quantità ed il tipo di superavvolgimento.



**Figura 5 A sx DNA superavvolto negativamente e a dx topoisomero rilassato di DNA.<sup>1</sup>**

## **2.4 Gli enzimi che interagiscono con il DNA**

Numerose proteine concorrono a mantenere la struttura del patrimonio genetico. Oltre a proteine con funzione strutturale ci sono numerosi enzimi che presiedono anche al controllo e al “metabolismo” del DNA. Con metabolismo vogliamo intendere tutti quei processi dinamici che avvengono a carico del DNA per assicurare i processi funzionali indispensabili alla vita cellulare. Tra questi enzimi, ricordiamo le nucleasi, le polimerasi e le topoisomerasi.

### **2.4.1 Nucleasi e ligasi**

Le nucleasi sono enzimi in grado di tagliare filamenti di DNA, dal momento che catalizzano l'idrolisi del legame fosfodiesterico<sup>1</sup>. Si distinguono esonucleasi, che idrolizzano il DNA partendo dai nucleotidi situati alle estremità dei filamenti ed endonucleasi, invece, quelle che tagliano direttamente all'interno del filamento. Questa attività catalitica è sfruttata in biologia molecolare: le nucleasi, o enzimi di restrizione, tagliano il DNA in corrispondenza di specifiche sequenze. Generalmente, le nucleasi di restrizione riconoscono particolari sequenze nucleotidiche palindromiche, note come siti di restrizione, e quindi producono dei tagli su entrambi i filamenti. Tali enzimi sono utilizzati ampiamente nelle tecniche che prevedono il subclonaggio di DNA all'interno di vettori.

Le DNA ligasi sono enzimi in grado di riunire filamenti di DNA precedentemente tagliati o spezzati, utilizzando energia chimica proveniente da ATP o da NAD. Le ligasi sono particolarmente importanti nella replicazione del filamento lento, dal momento che esse riuniscono i frammenti di Okazaki in un filamento unico. Esse rivestono un ruolo importante anche nella riparazione del DNA e nella ricombinazione genetica.

### **2.4.2 Polimerasi**

Le polimerasi sono enzimi che sintetizzano catene polinucleotidiche a partire dai nucleosidi trifosfato<sup>1</sup>. Esse funzionano aggiungendo nucleotidi al 3'-OH del precedente nucleotide presente sul filamento. Come conseguenza di ciò, tutte le polimerasi lavorano in direzione 5'-3'. Nel sito attivo di questi enzimi, il nucleoside trifosfato si appaia ad un nucleotide presente su un filamento usato come stampo: ciò permette alle polimerasi di sintetizzare in modo accurato filamenti fedelmente complementari agli stampi. Le polimerasi sono classificate sulla base del tipo di stampo che utilizzano.

### 2.4.3 Elicasi

Le elicasi sono proteine in grado di utilizzare l'energia chimica presente nei nucleosidi trifosfato, soprattutto ATP, per rompere i legami idrogeno che si instaurano tra le basi azotate, permettendo l'apertura della doppia elica di DNA in singoli filamenti<sup>1</sup>. Questi enzimi sono essenziali per la maggior parte dei processi biologici che coinvolgono enzimi che richiedono un diretto contatto con le basi del DNA.

### 2.4.4 Le Topoisomerasi

Le cellule dei tumori liquidi presentano una maggiore concentrazione di Topoisomerasi II rispetto alla I, mentre vale il contrario per le cellule dei tumori solidi. In ogni caso, i tessuti tumorali, le cui cellule sono in attiva e rapida proliferazione, presentano una maggior concentrazione di questi enzimi rispetto alle cellule sane: ciò può essere sfruttato ai fini terapeutici<sup>12, 13</sup>. Per questo motivo le topoisomerasi hanno assunto un'importanza primaria nella ricerca oncologica; infatti molti farmaci antitumorali hanno come "target" specifico questi enzimi e lo sviluppo di farmaci più efficienti, in grado di superare la farmacoresistenza, è uno degli obiettivi primari della ricerca oncologica e biotecnologica.

In generale, gli enzimi appartenenti alla famiglia delle topoisomerasi sono in grado di catalizzare due tipi di interconversioni topologiche del DNA, fondamentali per la sopravvivenza della cellula, cioè le reazioni di superavvolgimento-rilassamento e quelle di concatenamento-decatenamento<sup>1</sup>.

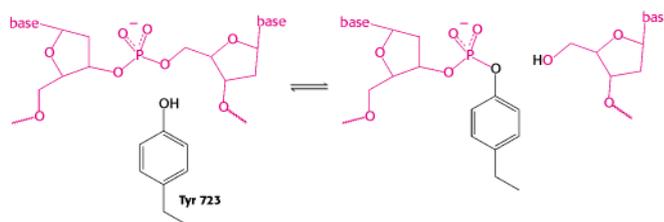
Come appena descritto, il DNA non è una struttura statica, ma è libera di muoversi nello spazio fluido della cellula, come annodarsi e avvolgersi su se stesso; inoltre, tutti i processi cellulari che comportano uno scorrimento di complessi proteici sul DNA alterano la sua struttura nello spazio, torcendolo, srotolandolo e creando delle regioni di superavvolgimento del tutto simili a quelli che può assumere una corda od un elastico. Questa struttura del DNA nello spazio viene controllata e regolata da una serie di enzimi che si chiamano DNA-topoisomerasi<sup>14</sup>. Le DNA-topoisomerasi sono enzimi ubiquitari, in grado di catalizzare la reazione che converte un isomero topologico in un altro (gli isomeri topologici sono molecole di DNA che differiscono tra loro soltanto per un diverso numero di legame), causando il taglio e la successiva ricucitura del legame fosfodiesterico su una o entrambe le catene. Sono essenziali per i principali processi cellulari, quali replicazione, trascrizione, duplicazione del DNA ma anche assemblaggio della cromatina e segregazione dei cromosomi.

#### 2.4.4.1 Classificazione

Esistono due classi di topoisomerasi, definite in base al loro meccanismo d'azione ed alle proprietà fisiche<sup>15</sup>:

- *Enzimi di classe I*, monomerici, introducono una rottura su un singolo filamento di DNA, rilassandolo di un giro alla volta e cambiando il numero di legame di una sola unità; la reazione non richiede energia sottoforma di ATP.
- *Enzimi di classe II*, costituiti da più subunità, introducono tagli in entrambi i filamenti del DNA per srotolarlo, cambiando il numero di legame di due unità; la reazione richiede la presenza di ATP.

La caratteristica che accomuna entrambe è l'utilizzo di un ossidrilico catalitico fornito da una tirosina per dare attacco nucleofilo ad un gruppo fosfato del DNA. In questo modo si rompe un legame fosfodiesterico e se ne forma uno fosfotirosinico e, mentre per le topoisomerasi di classe I l'energia liberata dalla rottura del legame fosfodiesterico viene usata per compiere il movimento di torsione del filamento legato alla proteina necessario allo srotolamento, per le topoisomerasi II questa energia è fornita dalla scissione di un legame fosfodieterico di una molecola di ATP, che si lega come un cofattore alla forma inattiva della proteina.



**Figura 6 Reazione catalizzata dalle topoisomerasi.**<sup>1</sup>

Ogni reazione di topoisomerizzazione, sia essa dovuta ad enzimi di classe I o classe II, può essere divisa in tre momenti, il primo costituito dalla rottura del filamento o dei filamenti e nella formazione di un legame covalente tra l'enzima e il DNA; il secondo dal rilassamento o superavvolgimento del DNA; nel terzo ed ultimo momento avviene la saldatura covalente dei filamenti precedentemente tagliati<sup>16</sup>.

#### 2.4.4.2 Topoisomerasi I

Gli enzimi di classe I vengono suddivisi in tre famiglie che si differenziano per il meccanismo di rilassamento del DNA e non presentano alcuna omologia di struttura tra loro:<sup>17</sup>

1. Topoisomerasi IA: di origine procariotica, richiedono per la loro azione catalitica la presenza di ioni magnesio e di tratti di filamento singolo di DNA. Rilassano solo DNA

avvolto negativamente e si legano covalentemente all'estremità 5' del filamento scisso lasciando libero l'ossidrilico in 3'.

Questa famiglia è suddivisa in cinque sottogruppi<sup>17</sup>:

- I. Topoisomerasi I batteriche;
- II. Topoisomerasi III batteriche;
- III. Topoisomerasi III eucariotiche: sono importanti nei processi di ricombinazione, di riparazione del DNA e nel mantenere la stabilità del genoma;
- IV. Girasi inversa: presente solo nei batteri termofili e ipertermofili, enzima non monomero;
- V. Topoisomerasi I archeobatteriche (Archael type I topoisomerases).

Tutti questi sottogruppi condividono lo stesso meccanismo di rilassamento del DNA conosciuto come "*enzyme-bridged strand passage*". Questo modello teorizza la formazione di una sorta di cancello nel complesso covalente DNA-enzima che si apre conseguentemente a cambiamenti conformazionali. L'enzima, dunque, promuove il rilassamento del DNA controllando il passaggio del filamento intatto attraverso quello scisso<sup>15, 17</sup>. Come conseguenza e dato sperimentale ricavabile, il lavoro dell'enzima in questo modo consente la modifica del numero di legame del DNA di una sola unità per ciclo.

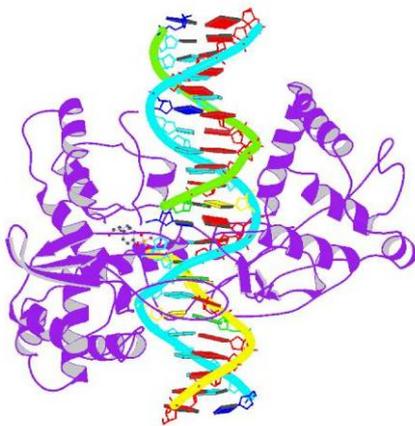
2. Topoisomerasi IB: di origine eucariotica e virale, rilassano sia il DNA superavvolto negativamente che positivamente. A differenza delle Topoisomerasi IA non richiedono la presenza di ioni metallici o di tratti di DNA a singolo filamento e legano covalentemente il filamento scisso all'estremità 3'<sup>15, 18</sup>. Gli enzimi di questa famiglia rilassano il DNA secondo il meccanismo di "*rotazione controllata*"; secondo tale modello la parte di doppia elica non legata covalentemente all'enzima, avente l'ossidrilico 5' libero, ruota attorno al legame fosfodiesterico intatto che si trova di fronte al sito di taglio; tale rotazione non è libera, bensì controllata da interazioni elettrostatiche fra le basi del DNA e gli amminoacidi della struttura enzimatica<sup>15, 19</sup>; l'energia necessaria alla rotazione deriva da quella immagazzinata nel superavvolgimento. Il rilassamento delle tensioni della doppia elica superavvolta avviene quindi attraverso uno o più cicli di rotazione controllata<sup>19</sup>. Sono molto importanti nei processi di trascrizione e replicazione del DNA poiché rilassano il superavvolgimento positivo che si accumula a monte della forcella replicativa<sup>17</sup>. In questa classe sono incluse topoisomerasi I virali (poxvirus Topoisomerasi I), topoisomerasi I eucariotiche, tra cui anche la variante umana.

3. Topoisomerasi IC: l'unica componente di questa famiglia è la Topoisomerasi V<sup>17</sup>, isolata da archeobatteri metanogeni, inizialmente classificata come Topoisomerasi IB è attualmente considerata come capostipite di una nuova classe da quando si è riconosciuta la sua funzione di riparazione del DNA, in aggiunta all'attività topoisomerasica.

#### 2.4.4.3 Topoisomerasi I umana

La Topoisomerasi I umana è un enzima di circa 90 kDa<sup>17</sup> formato da 765 amminoacidi. E' un monomero costituito da quattro domini principali: NH<sub>2</sub>-terminale, "core" (ulteriormente diviso in tre distinti sottodomini), linker e COOH-terminale che contiene la tirosina catalitica.

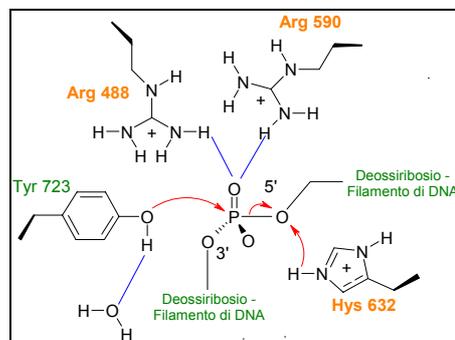
L'enzima ha una forma che ricorda quella di una pinza e si trova in due conformazioni, una aperta e una chiusa ad avvolgere il DNA. Nella forma compatta o chiusa presenta un



poro centrale di circa 15-20 Å dove alloggia il DNA. Il poro espone in superficie residui carichi positivamente e quindi complementari al potenziale elettrostatico negativo presente sulla superficie della doppia elica. All'interno del poro si trova il sito catalitico della topoisomerasi I, dominio altamente conservato in tutte le topoisomerasi eucariotiche e costituito dalla tirosina 723: questo residuo è responsabile dell'attacco nucleofilo al fosfato del DNA e si trova nel dominio C-terminale.

**Figura 7 Topoisomerasi I umana in complesso con 2sDNA di 22bp(PDBID: 1K4S).**

Altri residui del sito catalitico (tra cui Arg488, Arg590 e His632) favoriscono l'attacco nucleofilo dell'ossidrile della tirosina sul fosfato mediante la formazione di legami idrogeno con il gruppo fosfato in questione pur appartenendo al sottodominio III del core<sup>19</sup>.



**Figura 8 Sito catalitico della topoisomerasi I.**

L'attività della Topoisomerasi I umana prevede quattro step:

- *legame al DNA*: riconoscimento della catena ribonucleotidica da parte dell'enzima che si trova nella conformazione aperta e successiva formazione del complesso non covalente DNA-topoisomerasi; questo legame è direzionato dalla complementarità della struttura e delle cariche elettrostatiche superficiali dell'enzima nei confronti della catena polinucleotidica. Si ha la formazione di un complesso non covalente tra DNA ed enzima.
- *taglio del DNA*: attacco nucleofilo e formazione del legame covalente tirosina-fosfato: si forma il complesso scindibile in cui l'enzima è legato covalentemente al DNA e la catena è scissa;
- *rilassamento del DNA*: avviene attraverso uno o più cicli di rotazione controllata;
- *ricucitura del DNA*: avviene per transesterificazione; l'ossidrilico sul filamento scisso attacca il fosfato ancora legato alla tirosina enzimatica. Si riforma il legame fosfodiesterico originale; successivamente l'enzima rilascia il DNA.

L'azione catalitica della Topoisomerasi I non richiede la presenza di energia in forma di ATP; infatti il processo nella sua totalità è completamente reversibile in quanto l'energia del legame fosfodiesterico che viene scisso è conservata nel legame fosfotirosinico presente nel complesso covalente DNA-enzima; il passaggio di ricucitura del DNA, quindi, avviene grazie al solo utilizzo dell'energia immagazzinata nel legame fosfotirosinico.

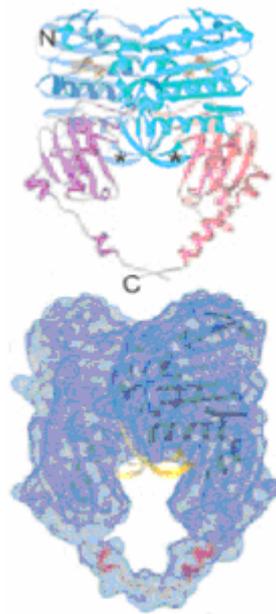
La funzione della Topoisomerasi I è di fondamentale importanza durante la replicazione del genoma: in sua assenza, il movimento della forcella replicativa (punto in cui il tratto di DNA che viene copiato assume una forma a Y) risulterebbe bloccato dall'accumulo di tensione torsionale nel filamento che funge da stampo. Il suo intervento è pure fondamentale nei processi di trascrizione, ricombinazione e durante la mitosi<sup>16</sup>.

#### 2.4.4.4 Topoisomerasi II

La Topoisomerasi II, come è già stato detto, è costituita da due o più subunità e catalizza un processo simile a quello della Topoisomerasi I. Essa però, a differenza degli enzimi di classe I, provoca la rottura di entrambi i filamenti del DNA che costituiscono una doppia elica. La forma della Topoisomerasi II ricorda quella di una tenaglia.

Il taglio dei due filamenti avviene per transesterificazione tra una coppia di tirosine e due legami fosfodiesteri affacciati tra loro; queste due reazioni avvengono in maniera concertata.

I residui tirosinici risultano legati covalentemente alle estremità 5' dei filamenti scissi, lasciando liberi gli ossidrili delle posizioni 3'.



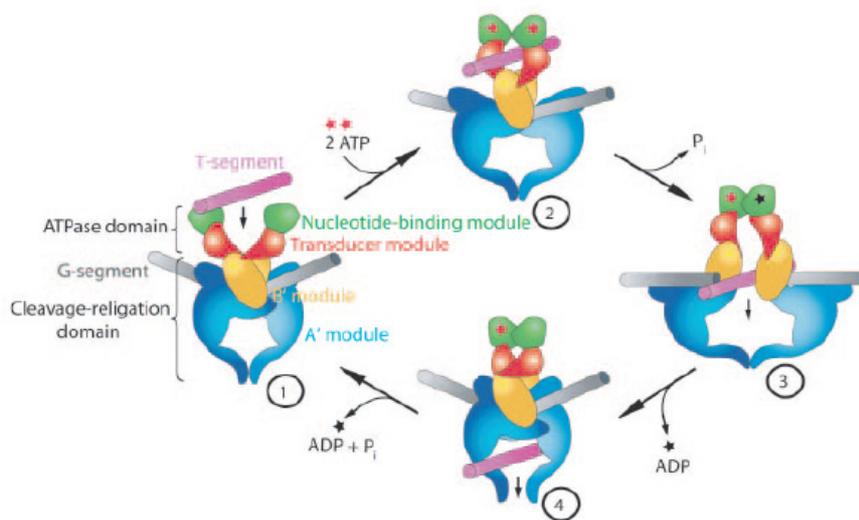
**Figura 9 La topoisomerasi II in presenza di ADP<sup>20</sup>.**

Successivamente, i cambiamenti conformazionali dell'enzima provocano l'allontanamento delle estremità 5' (legate) da quelle 3' (libere), aprendo così un cancello nella doppia elica tagliata. A questo punto l'enzima trasporta un doppio filamento intatto attraverso l'apertura creata nella doppia elica, la quale poi viene richiusa. Infine si riformano i legami fosfodiesterici grazie ad un'ulteriore transesterificazione<sup>21</sup>. Il risultato è una variazione di due unità del numero di legame del DNA. La reazione procede solo in presenza di ATP che è essenziale per fornire l'energia necessaria ai notevoli cambiamenti conformazionali coinvolti nel meccanismo d'azione dell'enzima.

Le Topoisomerasi II possono essere suddivise in due famiglie<sup>17</sup>:

- Topoisomerasi IIA: appartengono a questa famiglia i seguenti enzimi:
  - Topoisomerasi II eucariotiche: è un omodimero presente in tutti gli eucarioti. Rilassa sia DNA superavvolto positivamente che negativamente. E' l'unico enzima in grado di decatenare il DNA ed è per questo fondamentale nella separazione dei cromosomi, inoltre coopera con la Topoisomerasi I nel rilassare superavvolgimenti positivi durante i processi replicativi;
  - Topoisomerasi IV: è un enzima batterico, eterotetrameric, sembra implicato nel processo di separazione dei cromosomi alla fine del processo di replicazione del DNA;

- Girasi batteriche: hanno struttura eterotetrameric, sono le uniche in grado di superavvolgere negativamente molecole di DNA rilassato o superavvolto positivamente. Sono enzimi ubiquitari nei batteri e sono il substrato cellulare di molti farmaci antibatterici come i chinoloni; recentemente sono state individuate anche nel genoma di alcune piante;
- Topoisomerasi II virali: eteroesameriche.
- Topoisomerasi IIB: scoperte negli archeobatteri, dove sono enzimi ubiquitari, recentemente sono state individuate in alcuni batteri e alghe. In questa famiglia si annoverano la Topoisomerasi VI (archeobatterica) e la Topoisomerasi IIB batterica.



**Figura 10 Meccanismo d'azione della topoisomerasi II.<sup>20</sup>**

**Step 1-2: ingresso del filamento di DNA (in grigio) libero nella cavità superiore; legame dell'ATP (asterisco rosso), uno per ogni monomero, al modulo legante i nucleotidi (in verde).**  
**Step 2-3: l'idrolisi di una molecola di ATP ad ADP (asterisco nero) e il rilascio del fosfato organico provoca una modifica conformazionale che causa l'allontanamento delle estremità del filamento tagliato e il passaggio del filamento intatto attraverso il cancello nella cavità inferiore.**  
**Step 3-4: il rilascio del ADP provoca l'apertura del cancello inferiore con passaggio del filamento intatto.**  
**Step 4-1: l'idrolisi della seconda molecola di ATP e il rilascio di ADP e fosfato inorganico determina il riavvicinamento delle estremità del filamento tagliato e il ritorno allo stato iniziale. A questo punto avviene la ricucitura delle estremità tagliate o un ulteriore ciclo catalitico.**

## 2.5 Le interazioni DNA-Proteina

Esiste un grande numero di proteine che legano il DNA. Queste proteine sono coinvolte in numerosi processi cellulari come la trascrizione, la riparazione, la replicazione, la ricombinazione e l'organizzazione superiore del DNA. Le diverse conformazioni assunte dal DNA permettono quei meccanismi di riconoscimento e controllo che presiedono alla splendida architettura della vita cellulare<sup>22</sup>.

Le proteine deputate a questo scopo sono in grado di riconoscere specifiche sequenze nucleotidiche e quindi si legano ad un limitato numero di posizioni all'interno del genoma: questo rende le interazioni molto importanti nell'espressione dei geni. Ciò che rende possibile questo controllo è l'interazione fisica della proteina che penetra nei solchi della doppia elica e prende contatto in modo diretto con la sequenza nucleotidica. Questo è in genere modulato da interazioni superficiali all'interfaccia tra le molecole che possono semplicemente stabilizzare il complesso DNA-proteina ma anche permettere l'accesso ad informazioni indirette sulla sequenza nucleotidica fornite dalla conformazione della doppia elica.

Le proteine leganti il DNA sono classificabili in relazione alla struttura del frammento che interagisce con il DNA ("**DNA-binding motifs**"); queste zone di riconoscimento sono presenti in proteine di organismi molto diversi tra loro, e questo suggerisce che si siano specializzate già nei primi passi del processo evolutivo.

I motivi più comuni sono:

- Elica-giro-elica ("**helix-turn-helix**" o HTH): composto da due  $\alpha$ -eliche stabilizzate da residui aminoacidici idrofobici separate da un giro, il  $\beta$ -turn ricco in glicina. La seconda  $\alpha$ -elica si posiziona così in modo da interagire con il solco maggiore del DNA, ed è quindi deputata al riconoscimento che rende l'interazione proteina-DNA specifica.
- a dita di zinco ("**zinc finger**"), molto comune negli eucarioti. Generalmente, questo motivo si compone di 12 aminoacidi ripiegati a  $\beta$ -foglietto seguiti da una porzione ad  $\alpha$ -elica. I residui aminoacidici "critici" sono due cisteine e due istidine che formano il "dito" che estrude dalla superficie proteica e coordina un atomo di zinco. L'architettura generale vede la porzione ad  $\alpha$ -elica stabilizzare l'interazione con il solco maggiore, il  $\beta$ -foglietto posizionare l' $\alpha$ -elica all'interno del solco per interazione

con lo scheletro zucchero-fosfato del DNA e l'atomo di zinco coordinato che mantiene le posizioni reciproche tra queste due porzioni.

- a cerniera di leucine ("**leucine zipper**"): due alfa-eliche che si avvolgono l'una sull'altra tenute insieme da un residuo idrofobico di leucina per giro di elica. Le estremità terminali si pongono nel solco maggiore dell'acido nucleico dove riconoscono alcune sequenze specifiche.
- Struttura beta ("**Beta sheet**"): raro, rappresenta uno dei pochi sistemi di riconoscimento univoco di sequenze oligonucleotidiche in natura

Se, fino a pochi anni fa, si riteneva che solo interazioni specifiche tra DNA e proteine fossero efficaci e che solo le proteine svolgessero un ruolo attivo in questo riconoscimento, ora appare chiaro come il processo di riconoscimento e interazione sia molto dinamico. Se da un lato, infatti le proteine possono interagire con le porzioni delle basi azotate esposte nei solchi maggiore e minore, dall'altro anche la sequenza nucleotidica influisce sulla precisa conformazione spaziale dell'elica e questo rappresenta un secondo modo, meno diretto, attraverso cui la sequenza nucleotidica del DNA influenza il legame con la proteina.

Per un riconoscimento sequenza-specifico, la proteina deve interagire con uno o entrambi i solchi del DNA. Il solco maggiore, nella forma B del DNA, permette però un'interazione migliore tra basi azotate e sequenze aminoacidiche tale per cui l'identità e l'orientazione delle basi è meno ambigua che nel solco minore, dove le basi azotate possono essere distinte solo tra puriniche e pirimidiniche. Per questa ragione le interazioni sequenza-specifiche avvengono prevalentemente nel solco maggiore, quando il DNA è nella forma B. In altre conformazioni, come ad esempio la forma A in cui il solco maggiore è più stretto e profondo e quindi meno accessibile, le proteine interagiscono preferenzialmente con la sequenza esposta nel solco minore; nella forma Z, invece, in cui il solco maggiore è praticamente inesistente, il riconoscimento delle basi azotate può avvenire tranquillamente lungo una porzione anche abbastanza estesa del DNA, senza che la proteina si muova lungo la superficie dell'elica.

Bisogna comunque tener presente che il DNA non si trova per tutta la sua lunghezza nella stessa forma a causa della sequenza nucleotidica e dello stacking tra le basi; sono quindi disponibili diverse proteine che interagiscono con le diverse conformazioni in ogni momento della vita cellulare a seconda della funzione svolta.

Le interazioni DNA-proteina possono anche non essere sequenza specifiche. Ad esempio le deossiribonucleasi interagiscono con il DNA attraverso legami non covalenti con lo scheletro zucchero-fosfato per la carica negativa che questo assume.

### **2.5.1 Contatti tra DNA e proteina.**

I contatti specifici tra DNA e proteine sono di tipo non covalente e coinvolgono soprattutto interazioni a ponte idrogeno e idrofobiche tra i nucleotidi e le catene laterali dei residui aminoacidici nella porzione di riconoscimento della proteina. Queste interazioni sono dirette o mediate da molecole di acqua.

A livello della superficie della doppia elica, invece, le interazioni sono soprattutto elettrostatiche tra le cariche negative dei gruppi fosfato sullo scheletro della doppia elica e catene laterali cariche positivamente sulla porzione superficiale della proteina legante, come residui di lisina e arginina.

La capacità di una proteina di interagire con una sequenza specifica all'interno della sequenza nucleotidica in presenza di milioni di altri siti con i quali potrebbe legarsi in modo aspecifico trova una spiegazione in termini di termodinamica. Questo vantaggio termodinamico viene ottenuto attraverso un maggior numero di interazioni tra DNA e proteina e questo spiega perché, in natura, si siano evoluti, e conservati, dei motivi DNA-binding che si adattino in modo specifico al solco dell'elica in profondità, dove le interazioni possono essere maggiori. Questo spiega anche le variazioni conformazionali che avvengono nella proteina durante l'interazione in modo da aumentare la complementarità tra i siti e la superficie dell'interazione, aumentando il numero di legami possibili.

La necessità di massimizzare i contatti tra DNA e proteine per assicurare una maggiore specificità è anche la ragione per cui molte di queste proteine sono dimeri costituiti da monomeri identici le cui porzioni di riconoscimento interagiscono in modo cooperativo con la doppia elica ma le interazioni risultanti sono maggiori di quelle di un singolo monomero.

## 2.6 Interazione DNA-farmaco

In generale, si definiscono sei modalità di interazione reversibile delle molecole con il DNA<sup>23</sup>:

1. interazione elettrostatica con lo scheletro zucchero-fosfato;
2. interazione con il pavimento di basi nel solco maggiore del DNA;
3. interazione con il pavimento di basi nel solco minore del DNA;
4. intercalazione tra le coppie di basi attraverso il solco maggiore;
5. intercalazione tra le coppie di basi attraverso il solco minore;
6. composti che intercalano e legano i solchi (“threading intercalators”).

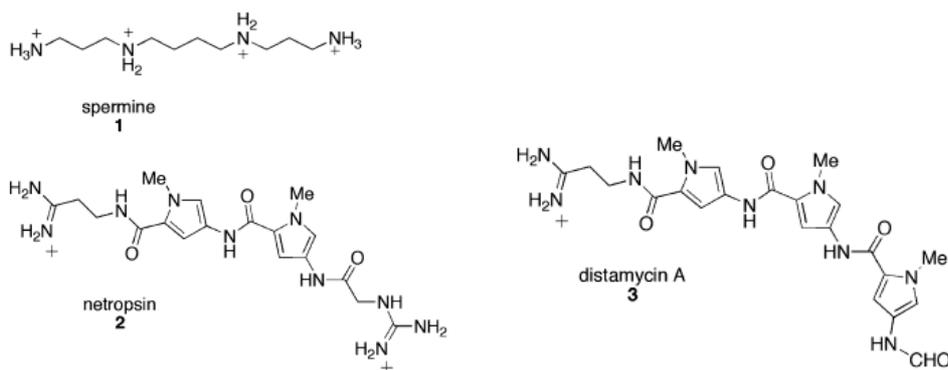
In relazione alla struttura della molecola e del DNA, molte molecole mostrano più di un modo di interagire con la doppia elica. Inoltre, si trovano anche interazioni forti che si distinguono in intercalazione e nella formazione di legami a ponte idrogeno in specifici punti del solco maggiore.

### 2.6.1 Interazioni elettrostatiche

La stabilità della conformazione del DNA richiede cationi (sodio o magnesio) che bilancino la carica netta negativa del DNA. Interazioni specifiche di molecole organiche con il DNA che neutralizzino lo scheletro fosfato spiazzano questi controioni condensati alla struttura a doppia elica, fornendo un contributo entropico all'energia di legame del farmaco al DNA. Questo tipo di contributo diventa, purtroppo, significativo solo quando interessa molecole altamente cariche, e questo è il caso delle proteine che interagiscono con il DNA. In ogni caso, l'effetto di questo contributo non è da escludere soprattutto nelle situazioni fisiologiche in cui prevalgono forme più “compatte” di DNA, come la forma Z.

### 2.6.2 Interazione con i solchi o “groove binding”.

Evidenze sperimentali dimostrano come nel DNA ci siano delle zone a potenziale negativo, e che queste zone si trovino più rappresentate nei solchi del DNA piuttosto che lungo lo scheletro, contrariamente a quanto si pensa per la maggiore presenza di gruppi fosfato. Nel solco maggiore queste zone a potenziale negativo sono maggiormente localizzate nelle sequenze ricche in guanina e citosina. In relazione a quanto detto, una molecola flessibile cationica e, quindi protonata come la spermina interagirà con il solco maggiore del DNA seguendo la maggiore concentrazione di potenziale negativo.



La localizzazione dei potenziali negativi nei solchi gioca un ruolo fondamentale nell'interazione di molti composti, tra cui la netropsina e la distamicina A. Queste molecole, contenenti sistemi aromatici legati con sostituenti a libertà torsionale elevata sui legami, possono adattarsi alla curvatura della doppia elica senza perturbare in maniera significativa la struttura del DNA. La torsione permette agli anelli aromatici di interagire mediante legami di van der Waals con le pareti del solco e mediante legami a ponte idrogeno con le coppie di basi nel solco<sup>23</sup>.

### 2.6.3 Intercalazione

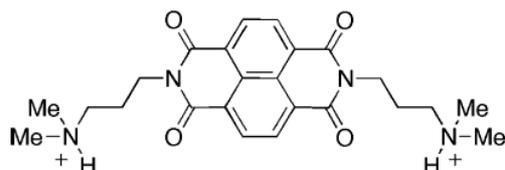
Da quando Watson e Crick pubblicarono la struttura del DNA a doppia elica (1953) interpretando i dati cristallografici allora disponibili, la struttura così precisa delle coppie di basi all'interno dello schema del DNA e l'ovvio meccanismo di duplicazione che prevede l'apertura del doppio filamento e la sua copiatura ha stimolato l'interesse dei ricercatori per capire se ci potessero essere altri aspetti interessanti. Inoltre, il suo ruolo nel controllo cellulare lo rese ideale bersaglio di diversi farmaci. Nel 1961, Lerman<sup>24</sup> riportò che una molecola di acridina può inserirsi o intercalare tra le coppie di basi del DNA. Questa molecola, planare e di dimensioni contenute si dimostrava posizionata più probabilmente perpendicolare che in maniera tangente all'asse dell'elica e che la disposizione perpendicolare delle coppie di basi rispetto all'asse dell'elica non risultava significativamente distorta. Questa osservazione ha portato le prime linee sperimentali a perseguire l'ipotesi che solo piccole molecole con una struttura virtualmente piatta e, quindi aromatica, potessero essere capaci di intercalare. L'intercalazione è definita come la capacità di una molecola di frapporsi alle coppie di basi del DNA senza formare legami covalenti, bensì interazioni aspecifiche come legami apolari, forze di van der Waals, interazioni  $\pi$ - $\pi$  e interazioni idrofobiche.

Negli anni la ricerca ha contribuito a raffinare questa preliminare osservazione e ora si distinguono intercalanti classici, ben caratterizzati e studiati e intercalanti non classici che sono stati approfonditi meno. Già Huggins<sup>25</sup> aveva fatto notare come gli ormoni steroidei estradiolo, progesterone e testosterone avessero una struttura geometrica che assomigliava a quella delle coppie di basi ma aveva poi erroneamente concluso che, essendo spesse quasi il doppio delle coppie di basi, non potessero intercalare. In realtà gli effetti degli ormoni sembrano essere in parte dovuti anche a intercalazione<sup>26</sup>. L'intercalazione è il meccanismo d'azione di molti intercalanti classici compresi alcuni antibiotici (actinomicina D) e agenti anticancro (topotecan). È anche un meccanismo d'azione noto e riconosciuto per alcuni composti genotossici, come i benzopireni e le aflatossine. Ma contrariamente a quanto si crede, intercalante non è sempre sinonimo di citotossicità; si pensi alla grande percentuale di farmaci di piccola o media dimensione o molecole con ampio spettro d'azione e varietà di effetti biologici capaci di intercalare: vitamine, ormoni, antagonisti degli ormoni, antipsicotici, antidepressivi e alcuni antistaminici<sup>27</sup>.

Gli intercalanti classici sono anelli aromatici fusi con cariche positive attaccate o all'anello stesso o a catene laterali. Esempi tipici sono i sali acridinici (proflavina cloruro) e fenantridinici (etidio bromuro, propidio bromuro). L'anello aromatico planare si frappone bene tra le coppie di basi nel complesso di intercalazione. L'intercalazione non altera la disposizione dei legami a ponte idrogeno tra le coppie di basi e funziona secondo il principio di esclusione: quando il DNA è saturo di intercalante, un sito ogni due rimane libero. Al fine di far avvenire l'intercalazione, le coppie di basi devono separarsi per formare una cavità all'interno della quale possa alloggiare la molecola. Questo avviene per riduzione dell'angolo di rotazione delle basi nel formare la doppia elica<sup>23</sup>.

#### 2.6.4 Threading intercalators

Nella formazione di un complesso di intercalazione di questo tipo, un sistema aromatico si dispone tra le coppie di basi mentre un sostituente cationico interagisce con il solco minore e un altro sostituente con il solco maggiore. Un esempio di tale intercalazione è la naftalendiimmide.



La principale differenza con l'intercalazione classica è di tipo cinetico: infatti, nell'intercalazione a filo sia per le forme dissociate che indissociate di DNA, la velocità di reazione di formazione del complesso DNA-farmaco è più lenta, nonostante le costanti di equilibrio siano simili a quelle di tipo classico. Lo stadio limitante sembra essere la formazione del primo legame elettrostatico della catena laterale.

### 2.6.5 Inibitori delle topoisomerasi

I farmaci antitumorali attualmente noti per la loro attività antitopoisomerasica possono essere divisi in due classi in base al meccanismo d'azione<sup>28</sup>:

- farmaci di *classe I*, stabilizzano i complessi covalenti DNA-topoisomerasi con la formazione di un complesso ternario DNA-enzima-inibitore che però è ancora reversibile ma cataliticamente inattivo poiché lo stadio di ricucitura del DNA è inibito<sup>29</sup>. Il vero danno si verifica quando avviene la collisione tra il complesso e la forcella replicativa: la rottura reversibile di un filamento del DNA diventa la rottura irreversibile di un doppio filamento e viene così attivata l'apoptosi<sup>29, 30</sup>. Spesso questi farmaci vengono definiti *veleni delle topoisomerasi* in quanto trasformano l'enzima in una potente tossina cellulare. Il capostipite di questa classe è l'alcaloide naturale camptotecina e i suoi analoghi semisintetici topotecan e irinotecan. Alla classe dei *veleni* appartengono anche altri farmaci intercalanti, come le bleomicine, che non agiscono direttamente sulla topoisomerasi, ma interferiscono con essa intercalandosi tra le basi del DNA e provocando azioni letali per la cellula;
- farmaci di *classe II* o *soppressori delle topoisomerasi*, agiscono sul sito catalitico dell'enzima, senza interferire direttamente col complesso covalente, impedendone il legame con il DNA. La citotossicità si spiega con il fatto che non si può avere rilassamento della doppia elica e, quindi, vengono impediti processi che coinvolgono il DNA come la replicazione. Ne sono esempio: shikonina,  $\beta$ -lapachone, velutina, e acido chebulagico.

| <b>Classe</b> | <b>Gruppo</b>       | <b>Esempio</b>                                 | <b>Bersaglio</b> |
|---------------|---------------------|--|------------------|
| <i>I</i>      | Acridine            | Amsacrina                                      | Topo II          |
|               | Alcaloidi           | Camptotecina, Topotecan, Irinotecan            | Topo I           |
|               | Antracicline        | Adriamicina, Daunomicina                       | Topo II          |
|               | Actinomicine        | Actinomicina D                                 | Topo II          |
|               | Chinoloni           | Acido nalidissico, Norfloxacin, Ciprofloxacina | Girasi           |
|               | Ellipticine         | Ellipticina                                    | Topo II          |
|               | Epipodofillotossine | Etoposide                                      | Topo II          |
|               | Isoflavodine        | Genisteina                                     | Topo II          |
|               | Altri               | Mitoxantrone, Bisantrone                       | Topo II          |

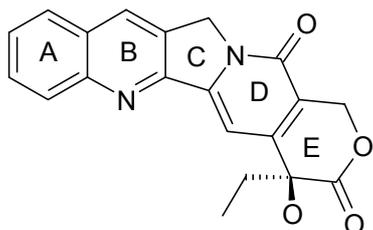
|    |          |                           |         |
|----|----------|---------------------------|---------|
| II | Cumarine | Novobiocina, clorobiocina | Topo II |
|    | Altri    | Fostriecina               | Topo II |
|    |          | $\beta$ -Lapacone         | Topo I  |
|    |          | Velutina                  | Topo I  |
|    |          | Acido Chebulagico         | Topo I  |
|    |          | Alkannina, Shikonina      | Topo I  |

La classificazione degli inibitori della topoisomerasi più comunemente usata si basa però sull'enzima bersaglio, quindi, sulla capacità di interferire con l'azione della *topoisomerasi I* o della *topoisomerasi II*<sup>8</sup>:

- farmaci attivi sulla *topoisomerasi I*: la camptotecina è il più noto inibitore selettivo di tale enzima, attualmente in uso clinico con i suoi derivati semisintetici topotecan e irinotecan;
- farmaci attivi sulla *topoisomerasi II*: possono essere intercalanti o non intercalanti del DNA. Tra gli intercalanti ci sono i derivati acridinici (amsacrina), i derivati antraciclinici (adriamicina e daunomicina), le actinomicine e le ellipticine; tra i non intercalanti ci sono le epipodofillotossine e la genisteina;
- farmaci antitopoisomerasi attivi sulla girasi, topoisomerasi IIA batterica: tra questi, usati nella terapia antimicrobica, i più noti sono i chinoloni, tra cui l'acido nalidissico è il precursore.

### 2.6.6 La Camptotecina

Questo composto è stato isolato per la prima volta nel 1966 da Wani e Wall dalla corteccia di *Camptotheca acuminata* Decne, della famiglia delle *Nyssaceae*. Tale pianta, originaria della Cina e del Tibet, era nota fin dall'antichità per le sue proprietà antifungine ed è stata usata come conservante per molti alimenti. L'attività di questa molecola è molto elevata e specifica per la topoisomerasi I.



L'estrazione della camptotecina dalla pianta è però difficile, soprattutto per le scarse rese e per la bassa solubilità in acqua del composto. Nel corso degli anni sono state quindi fatte numerose variazioni strutturali della camptotecina nel tentativo di migliorarne il profilo farmacocinetico (rapida apertura dell'anello lattonico per dare un composto inattivo e

scarsa solubilità) e farmacodinamico (allargare, o anche diversificare, lo spettro di attività rispetto alla tipologia tumorale). Sebbene i derivati semisintetici<sup>31-33</sup> sviluppati in passato abbiano soddisfatto il requisito di essere più potenti e più solubili in acqua dell'alcaloide capostipite, si sono dimostrati fallimentari rispetto all'intento di possedere strutture più semplici e prive delle principali limitazioni della camptotecina. Ancora oggi la produzione di molti derivati rimane parzialmente dipendente dalla disponibilità di camptotecina, poichè la sintesi chimica totale è lunga e costosa, ma anche l'estrazione dell'alcaloide puro dalla pianta risulta problematica.

La ricerca farmaceutica di inibitori selettivi per la topoisomerasi I (Topo I) è incentrata principalmente su due filoni: da un lato si cerca di ottenere derivati CPT-simili con una migliore solubilità e con una maggiore attività (intesa come una minore reversibilità del legame della CPT nel complesso ternario); dall'altro si cercano nuove molecole non CPT-simili, che siano attive ma anche selettive per Topo I, interessante bersaglio per la ricerca di farmaci anticancro e che possibilmente vadano ad ovviare ai problemi presentati dalla CPT.

Per quanto riguarda i derivati CPT-simili<sup>33</sup>, si sono inizialmente operate modifiche agli anelli A e B per risolvere il problema della solubilità e modifiche all'anello E per quanto riguarda la potenza e la reversibilità del legame. Le modifiche agli anelli A e B della CPT hanno condotto a derivati molto promettenti: attualmente, due molecole sono già disponibili per la pratica clinica, il topotecan (TPT, Hycamtin®) e irinotecan (CPT-11, Camptosar®). Tali derivati sono solubili in acqua e hanno due diverse indicazioni terapeutiche. Sono anche state sviluppate altre molecole<sup>32</sup> che si trovano a diversi stadi delle fasi preclinica e clinica. Per quanto

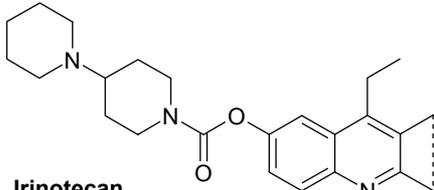
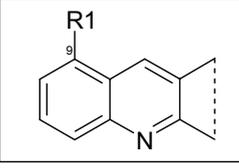
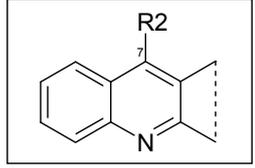
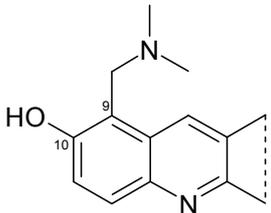
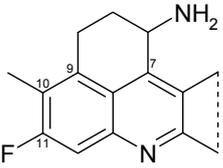
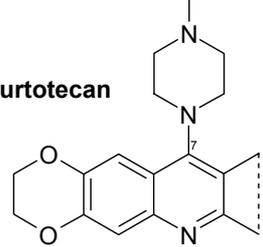
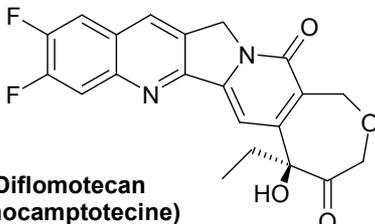
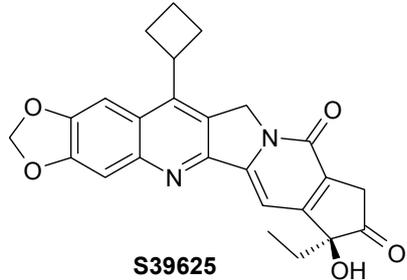
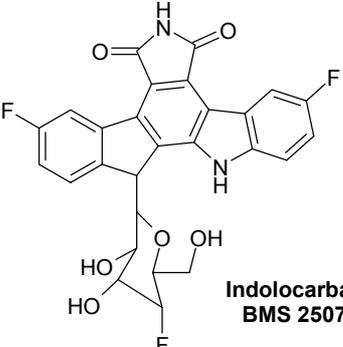
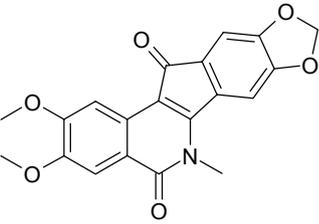
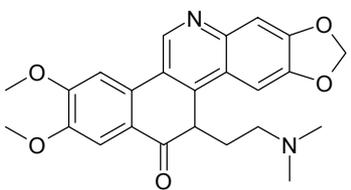
riguarda l'anello E della CPT<sup>34</sup>, questo è un  $\alpha$ -idrossi-lattone che non è stabile a pH fisiologico e la forma carbossilata non è attiva a livello dell'enzima. Nonostante questa reazione sia un equilibrio, il risultato finale è una scarsa disponibilità di CPT attiva a livello del sito d'azione. I derivati sviluppati per ovviare a questo problema sono in fase preclinica avanzata e sono anelli lattonici a 7 membri, le omocamptotecine, più stabili all'idrolisi e anelli a 5 membri di tipo chetonico e quindi non idrolizzabili.

Lo sviluppo di inibitori non CPT-simili<sup>35, 36</sup> è praticamente contemporaneo alla scoperta del bersaglio d'azione della CPT. Questa ricerca è partita da screening di grandi librerie di molecole naturali e di composti chimici e ha condotto alla scoperta di tre categorie di molecole:

- indolocarbazoli, che sono ad oggi le molecole a stadio di sviluppo clinico più avanzato;
- dichetoindenoisochinoline;
- fenantrolina.

L'esistenza di inibitori con scaffolds molecolari molto diversi tra loro diventa un paradigma per considerarli insieme come **inibitori interfacciali**<sup>37</sup>. Questo concetto fondamentale è nato dall'osservazione che la CPT non lega né la topoisomerasi I da sola e nemmeno il DNA da solo, ma agisce solamente formando un complesso ternario con la topoisomerasi e con il DNA solo quando questi formano il "complesso scindibile". Gli inibitori interfacciali sono in grado di instaurare allora una rete di ponti idrogeno specifici con residui dell'enzima e interazioni idrofobiche con le basi del DNA. Questa interazione è stereospecifica, perché solo l'isomero 20(S)-CPT è attivo. Il legame stereospecifico all'interfaccia dell'interazione Topo I-DNA stabilizza un complesso normalmente transiente: questa stabilizzazione prolungata di un intermedio induce una serie di segnali cellulari che portano alla morte per apoptosi. Generalmente queste molecole sono classificate come inibitori non-competitivi per l'enzima in quanto non agiscono in modo competitivo con il substrato ma solo quando si forma l'intermedio enzima substrato. I test di attività per queste molecole, quindi, non sono di tipo dissociativo ma di stabilizzazione del complesso Topo I-DNA.

La tabella (modificata da Pommier<sup>33</sup>) riporta i principali inibitori della topoisomerasi I già approvati o in fase clinica sperimentale.

| Inibitori CPT-simili:  |  |  |
|--|--|--|
| <b>Modifiche agli anelli A e B:</b>  |  |  |
| <p><b>Farmaci approvati</b></p>  <p><b>Irinotecan</b></p> | <p><b>Farmaci in fase clinica avanzata</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>9-aminoCPT</b> R1 = NH<sub>2</sub><br/><b>Rubitecan</b> R1 = NO<sub>2</sub></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Gimatecan</b> R = -CH<sub>2</sub>CH=NOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><br/><b>Karenitecin</b> R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><br/><b>Silatecan</b> R = -CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></p> </div> </div> |  |
|  <p><b>Topotecan</b></p>                                 |  <p><b>Exatecan</b></p>   |  <p><b>Lurtotecan</b></p>    |
| <b>Modifiche all'anello E</b>  |  |  |
|  <p><b>Diflomotecan</b><br/>(omocamptotecine)</p>       |  <p><b>S39625</b><br/>(Derivati chetonici)</p>  |  |
| Inibitori non CPT-simili:  |  |  |
|  <p><b>Indolocarbazoli</b><br/><b>BMS 250749</b></p>    |  <p><b>Indenoisochinoline</b><br/><b>NSC 314622</b></p>   |  <p><b>Fenantrolina</b></p> |



### **3. Scopo del lavoro:**

Lo scopo del presente lavoro è la sintesi di piccole molecole potenzialmente attive nell'inibire gli enzimi topoisomerasi I e II al fine di valutare le proprietà citotossiche e antitumorali.

### 3.1 Derivati semplificati della camptotecina

In questi anni sono state messe a punto numerose modifiche all'alcaloide naturale camptotecina, nel tentativo di migliorarne il profilo farmacocinetico in quanto presenta scarsa solubilità in acqua e una rapida conversione del lattone nella forma aperta. La scarsa solubilità in acqua rappresenta un grande problema farmacocinetico, mentre l'equilibrio del lattone tra forma ciclica e idrolizzata rappresenta un punto controverso delle ricerche. La forma aperta è probabilmente meno attiva, anche se ci sono evidenze sperimentali che dimostrano la capacità della forma carbossilica aperta di legarsi nello stesso sito del complesso DNA-Topo I occupato dalla struttura lattonica<sup>36</sup>. È stata avanzata anche l'ipotesi che la forma aperta sia la vera responsabile dell'attività antitopoisomerasica e che la forma lattonica influenzi solo l'assorbimento del farmaco<sup>36</sup>. Inoltre, l'esistenza di derivati chetonici comunque dimostranti una certa attività circoscrivono l'importanza di tale equilibrio.

Lo studio di nuovi derivati assume maggiore importanza se si considera che quanto finora proposto ha una struttura di sintesi non semplice e che spesso occorre partire da precursori naturali. Ottenere una struttura chimica più semplice è un obiettivo che si dovrebbe perseguire per una sintesi probabilmente più facile, economica e più pulita. Inoltre, allargare o diversificare lo spettro di attività nei confronti di una determinata tipologia tumorale diventa di primaria importanza se si considera l'ampia variabilità dei tumori.

Si intende, quindi, sviluppare degli analoghi semplificati della camptotecina, per ottenere composti che, a differenza dell'alcaloide e dei suoi derivati semisintetici topotecan e irinotecan, abbiano le seguenti caratteristiche:

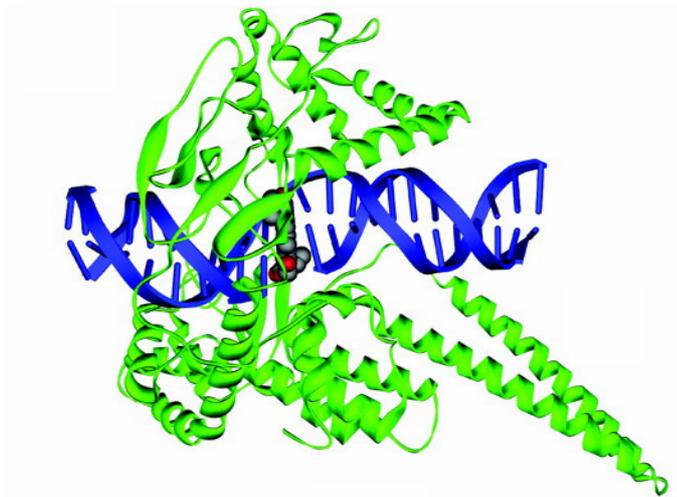
- struttura chimica più semplice (non necessariamente pentaciclica);
- sintesi più semplice e meno costosa;
- maggiore solubilità in soluzioni acquose (per una più completa somministrazione endovena del farmaco poiché le camptotecine sono dotate di un'elevata tossicità gastrointestinale);

Avere a disposizione degli analoghi della camptotecina è importante per poterne studiare più approfonditamente il rapporto struttura-attività e valutare la possibilità di migliorarne il profilo farmacodinamico soprattutto sotto il punto di vista dell'attività, della specificità e della tossicità.

Nella progettazione di nuovi derivati è fondamentale il mantenimento dei requisiti strutturali necessari alla formazione del complesso ternario stabile tra topoisomerasi-DNA-farmaco che

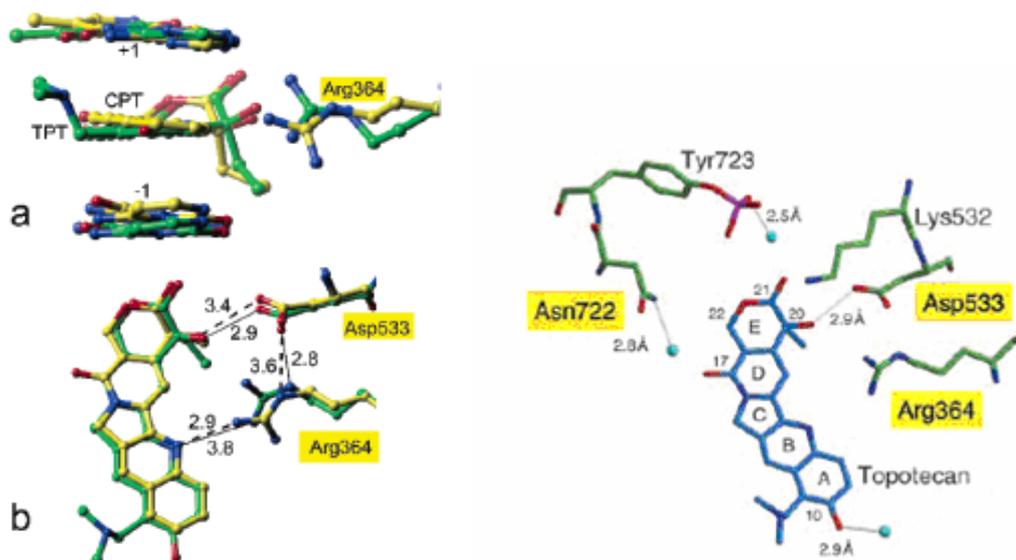
sono alla base dell'attività biologica della camptotecina. E' stato dimostrato che l'alcaloide non interagisce con il DNA in assenza della topoisomerasi e viceversa, bensì esso si lega reversibilmente ad un sito che si crea temporaneamente quando si forma il complesso covalente fra l'enzima e il DNA; la conseguenza è la perdita dell'attività catalitica della Topoisomerasi in quanto l'enzima non è più in grado di promuovere la reazione di ricucitura del filamento interrotto<sup>29</sup>.

Recentemente sono state risolte da Staker et al. le strutture tridimensionali dei complessi DNA-Topoisomerasi I-Topotecan<sup>36</sup> e DNA-Topoisomerasi I-Camptotecina<sup>38</sup>.



**Figura 11** *Struttura del complesso ternario Topoisomerasi I-DNA-Topotecan.*<sup>38</sup>

Dal confronto tra le due strutture si è potuto determinare che esistono solo lievi differenze fra le posizioni assunte dai due farmaci nel complesso ternario; essi interagiscono con il complesso covalente DNA-Topoisomerasi intercalandosi tra le coppie di basi che precedono e quelle che seguono il sito di rottura del DNA e mediante legami idrogeno con precisi amminoacidi dell'enzima. L'intercalazione del farmaco causa l'allontanamento dell'ossidrilico 5' libero del filamento scisso dal legame fosfotirosinico tra DNA ed enzima impedendo la ricostituzione del legame fosfodiesterico originale della catena polinucleotidica<sup>36</sup>.



**Figura 12** A sx: **Amminoacidi e gruppi funzionali coinvolti nell'interazione tra la topoisomerasi I e il topotecan (in verde) e camptotecina (in giallo). Parte a vista di lato, parte b vista da sopra.**<sup>38</sup>  
 A dx: **interazione tra l'enzima e il topotecan, in dettaglio.**<sup>36</sup>

Le interazioni fondamentali che sono state riconosciute tra camptotecina ed enzima sono le seguenti<sup>35</sup>:

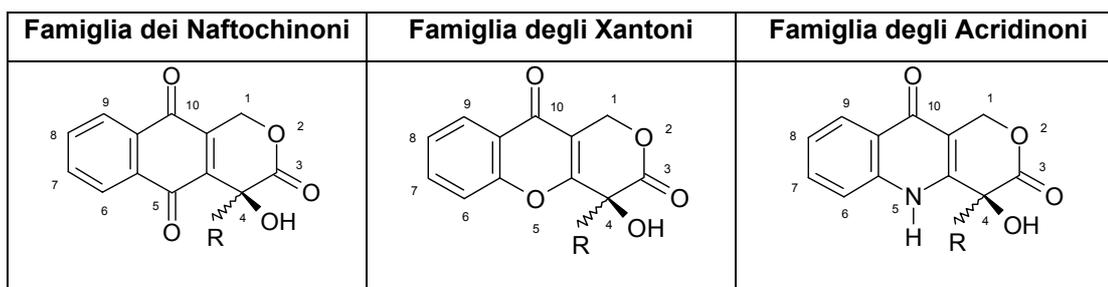
- legame idrogeno diretto tra l'ossidrile in posizione 20 e l'Asp533 (distanza: 3.4 Å);
- legame idrogeno diretto tra il doppietto elettronico libero sull'N1 del farmaco e l'N $\epsilon$  dell'Arg364 (distanza: 2.9 Å);
- legami idrogeno mediato da ponte acquoso tra il carbonile in posizione 17 (nell'anello piridonico) e l'Asn722 (distanza complessiva: 4.0 Å);
- legami idrogeno mediato da ponte acquoso formato tra il carbonile in posizione 21 (nell'anello lattonico) e la P-Tyr723, cioè la tirosina catalitica legata al filamento scisso di DNA attraverso un gruppo fosfato (distanza complessiva: 4.0 Å).

La risoluzione della struttura del complesso ternario ha, quindi, chiarito alcune delle caratteristiche farmacoforiche necessarie per l'interazione di un farmaco con il complesso covalente DNA-enzima.

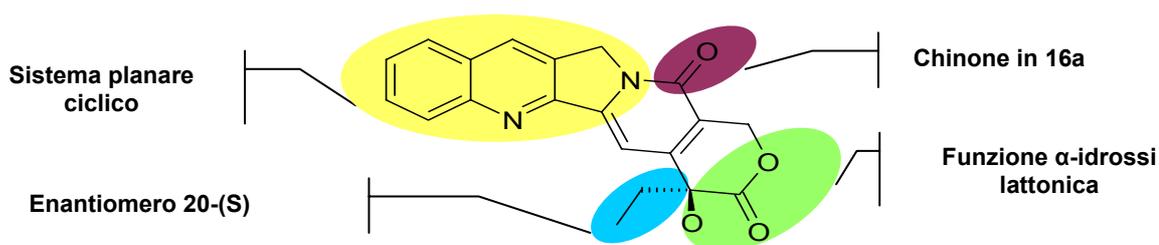
Sulla base di queste conoscenze sono stati svolti degli studi di modellistica molecolare, sviluppati nella sezione di Modellistica Molecolare del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche di Padova (Prof. Stefano Moro), applicati alla struttura tridimensionale del complesso DNA-Topoisomerasi, in cui sono stati progettati derivati semplificati della camptotecina costituiti da 3 anelli con sostituenti che mantengono i legami fondamentali, appena discussi, con l'enzima.

Tale studio ha portato al disegno dei seguenti derivati triciclici, variamente sostituiti in posizione 4, raggruppabili in tre famiglie:

- famiglia dei NAFTOCHINONI;
- famiglia degli XANTONI;
- famiglia degli ACRIDINONI.



Le relazioni struttura-attività considerate nella progettazione di questi composti sono il mantenimento dell'anello lattonico, ritenuto essenziale per l'attività nei confronti dell'enzima (anche se è noto che esso nel plasma si trova in equilibrio con la forma carbossilica) e di una struttura quasi planare, necessaria allo "stacking" del farmaco tra le basi, ma con la contrazione del sistema ciclico da 5 a 3 anelli. Inoltre, data l'importanza rilevata per l'ossidrile in posizione 20 della camptotecina nell'interazione con Asp533, nei derivati semplificati, si è provveduto a mantenere il gruppo ossidrilico in posizione 4 nella configurazione S.



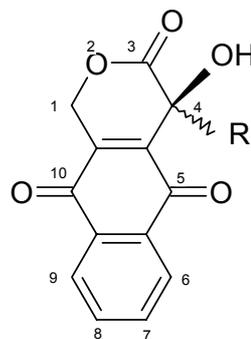
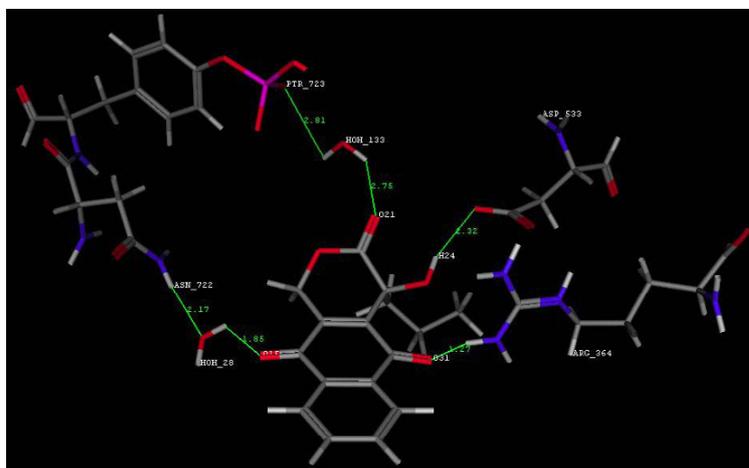
Si è inoltre valutata la possibilità di variare il gruppo alchilico (R) legato al centro chirale in posizione 4. Dagli studi di "docking" molecolare delle molecole progettate nei confronti del complesso DNA-Topoisomerasi si è ipotizzato un ordine di preferenza:



Si suppone, infatti, che il gruppo *n*-propilico si posizioni in maniera ottimale all'interno del solco maggiore del DNA mentre quello iso-propilico si inserisca meglio nel complesso binario.

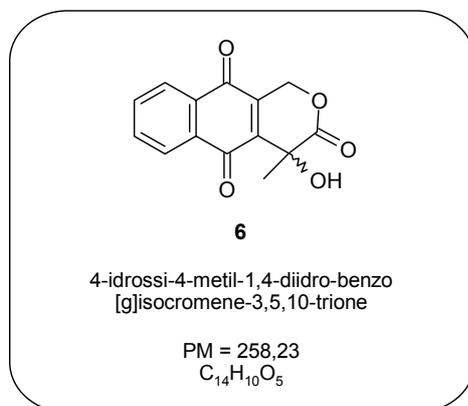
E' stato, quindi, determinato che il sistema tricyclico potenzialmente più attivo dei tre proposti risulta essere quello corrispondente al naftochinone, in quanto viene favorita la formazione di un legame idrogeno diretto tra il carbonile in posizione 5 e l'Arg364 dell'enzima. Nel derivato *xantonico*, invece, il legame con l'Arg 364 è meno probabile perché il doppietto sull'ossigeno in 5 è delocalizzato e quindi meno disponibile ad accettare legami idrogeno; nel derivato *acridinonico*, infine, tale interazione viene impedita perché il gruppo accettore di legami idrogeno è stato sostituito da un gruppo donatore. E' stato successivamente possibile determinare, sempre nella validità del modello elaborato, la modalità con cui il derivato naftochinonico si lega alla Topoisomerasi I per formare il complesso ternario inibitore-enzima-DNA.

Secondo tale modello, le interazioni fondamentali sono le seguenti:



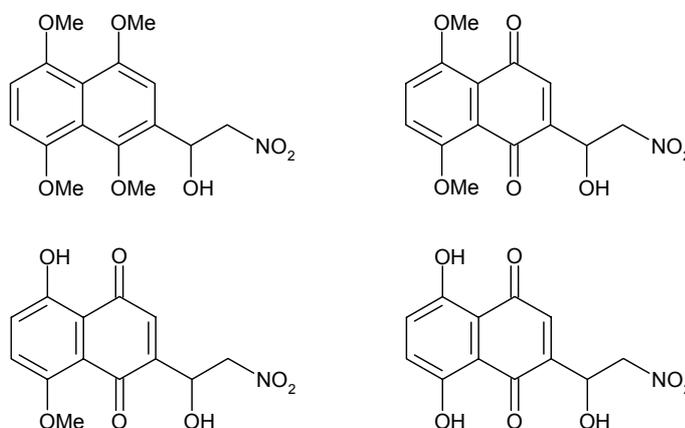
Asp533 ··· OH (2.32Å);  
 Arg364 ··· CO(5) (1.27 Å);  
 P - Tyr723 ··· H<sub>2</sub>O (2.81 Å) ··· CO(3) (2.75 Å)  
 Asn722 ··· H<sub>2</sub>O (2.17 Å) ··· CO(10) (1.85 Å)

La prima parte del lavoro riguarda quindi la sintesi del composto considerato migliore da questo studio di modellistica per poter confermare le ipotesi avanzate in silico, il composto 6:

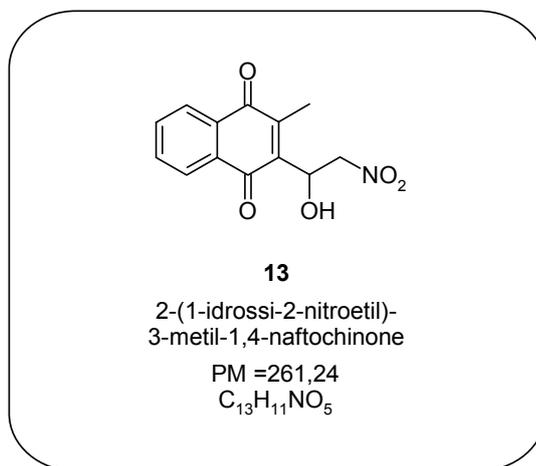
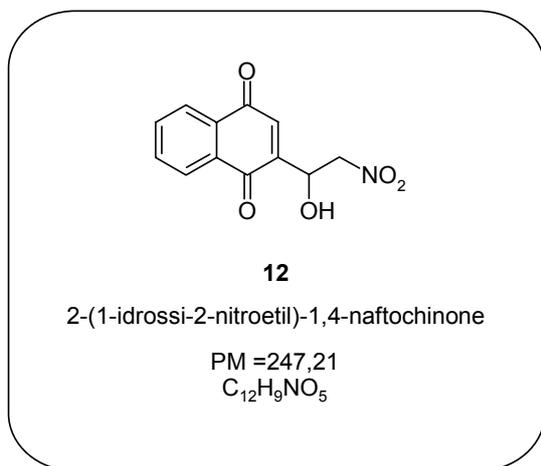


### 3.2 Derivati della alkannina/shikonina

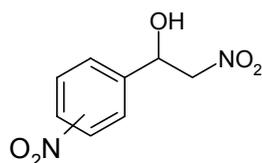
Il naftochinone naturale shikonina ed alcuni suoi esteri presentano un'interessante attività antitumorale *in vitro*, se paragonata a quella della camptotecina. Tuttavia il meccanismo attraverso il quale questo tipo di composti dia inibizione della crescita di tumori (vista su linee cellulari e su animali) non risulta ancora chiaro. Solitamente la citotossicità dei chinoni è attribuita ad una loro addizione elettrofila a nucleofili cellulari quali enzimi o acidi nucleici o altre molecole, per mezzo di meccanismi di alchilazione bioriduttiva, oppure a una loro partecipazione a cicli redox con conseguente produzione di radicali liberi che danneggiano la cellula. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che entrambe le ipotesi non sono sufficienti a spiegare l'azione della Shikonina e dei suoi analoghi e che l'attività citotossica sia attribuibile a interazioni con le endonucleasi; in particolare si nota inibizione significativa dell'enzima topoisomerasi I (e non della topoisomerasi II) attraverso un meccanismo che non coinvolge l'intercalazione nel DNA ma un'interazione diretta con l'enzima<sup>39</sup>. Purtroppo le informazioni presenti in letteratura non sono sufficienti a definire il meccanismo d'azione della shikonina e dei suoi analoghi; i derivati sintetizzati, che si trovano in letteratura, sono molto simili alla shikonina stessa, variando tra loro solo per il numero di atomi di carbonio della catena in posizione 2 o per l'acile che esterifica il gruppo alcolico o per la protezione (presente o meno) degli ossidrili fenolici come metossili. Questi composti presentano chiaramente diversi valori di attività ma non riescono a spiegare il meccanismo d'azione e ad individuare un possibile sito di interazione sull'enzima. Per far luce su questo, in un precedente lavoro condotto presso il nostro laboratorio, sono state sintetizzate molecole che spaziano un ampio raggio di caratteristiche chimico-fisiche (per polarità dei sostituenti, diversa distribuzione elettronica, presenza di cariche o gruppi idrofobici, capacità di fare ponti idrogeno o altre interazioni). Tra questi composti se ne sono individuati alcuni con promettenti attività citotossiche su ceppi di *S. cerevisiae* esprimenti la topoisomerasi I:



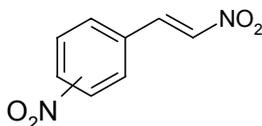
Come si può osservare, questi composti di natura naftochinonica differiscono tra loro per il grado di protezione degli ossidril fenolici, ciò perché si era supposto che la presenza di almeno un ossidrile fenolico fosse indispensabile ai fini dell'attività inibitoria nei confronti della topoisomerasi I. Ci si propone, quindi di sintetizzare composti analoghi, privi degli ossidril fenolici per verificarne l'effettiva influenza nell'attività citotossica, i composti **12** e **13**:



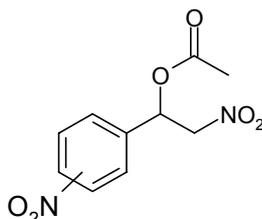
Con l'obiettivo di ottenere composti di struttura chimica ancora più semplice ma che conservino le caratteristiche di tossicità cellulare si è pensato di sostituire il nucleo naftalenico con quello benzenico e di mimare l'effetto elettron-attrattore della funzione chinonica con un gruppo nitro. Ci si propone, quindi, la sintesi della seguente serie di composti:



**14** *o*-nitro  
**15** *m*-nitro  
**16** *p*-nitro



**17** *o*-nitro  
**18** *m*-nitro  
**19** *p*-nitro



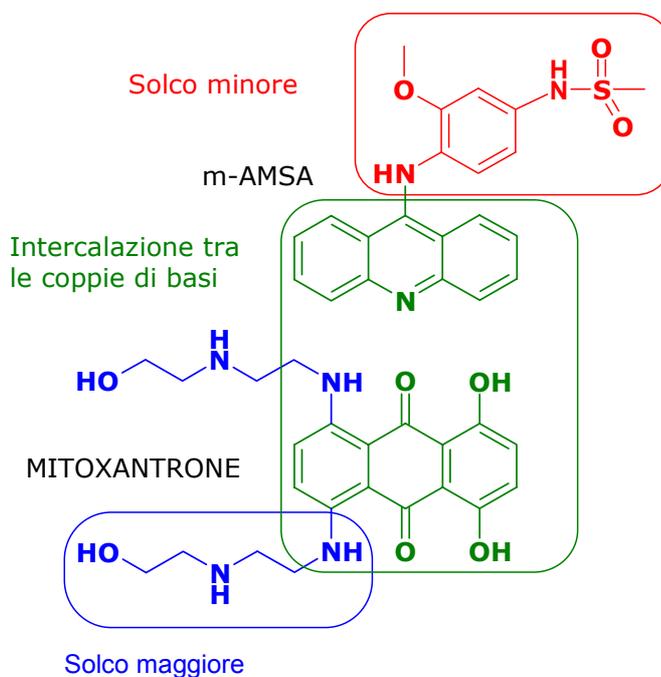
**20** *o*-nitro  
**21** *m*-nitro  
**22** *p*-nitro

### 3.3 Derivati ibridi di mitoxantrone e amsacrina

Questa serie di composti è costituita da molecole ibride tra mitoxantrone e amsacrina per verificare alcune relazioni struttura-attività o, in altre parole, se le ipotesi fatte finora circa la disposizione di tali piccole molecole rispetto alla proteina e al DNA sono corrette.

La topoisomerasi è infatti un ottimo esempio di situazione in cui si forma, in modo tempo dipendente, il sito attivo all'interfaccia dell'interazione tra enzima e DNA.

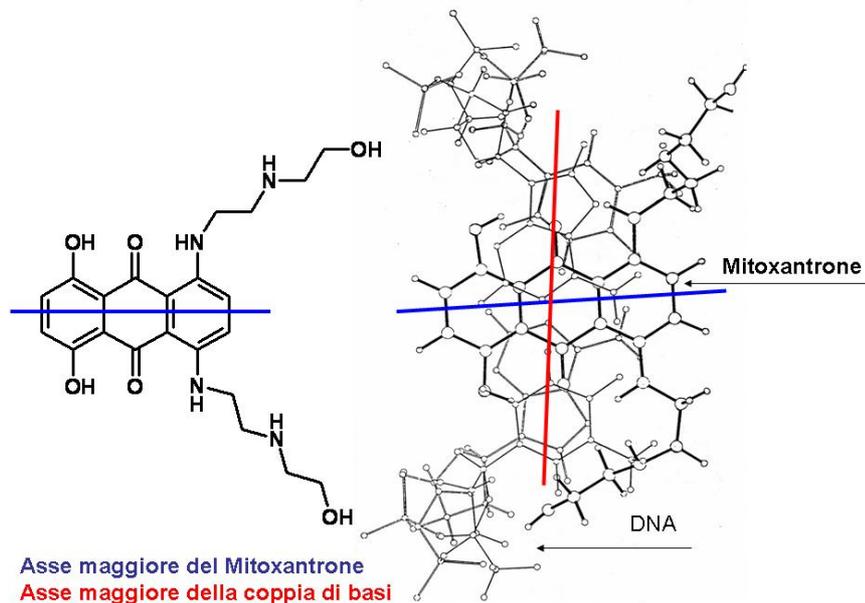
I due modelli scelti, il mitoxantrone e l'amsacrina, mostrano infatti comportamento complementare nella loro interazione con il DNA: entrambi intercalano tra le coppie di basi del DNA con la porzione planare di molecola ma, mentre il mitoxantrone si trova posizionato con le catene laterali in 1 e 4 nel solco maggiore, l'amsacrina dispone il sostituito metansolfonilico nel solco minore.



**Figura 13 Schema del modello di interazioni che si intende sfruttare.**

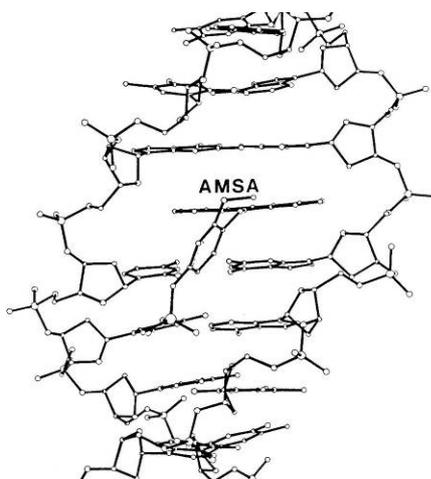
Più dettagliatamente, *in vivo* il mitoxantrone si accumula nel nucleo cellulare e si comporta da agente intercalante classico; inoltre, evidenze sperimentali mostrano come questo agisca anche da veleno per la topoisomerasi II stabilizzando il complesso Topo II-DNA e disaccoppiando l'attività catalitica di tale enzima.

Esso si posiziona con il cromoforo antrachinonico intercalato perpendicolarmente all'asse della doppia elica e con le due catene laterali nel solco maggiore stabilizzate da interazioni con i residui qui esposti.



**Figura 14** Modello di intercalazione del mitoxantrone con il DNA.

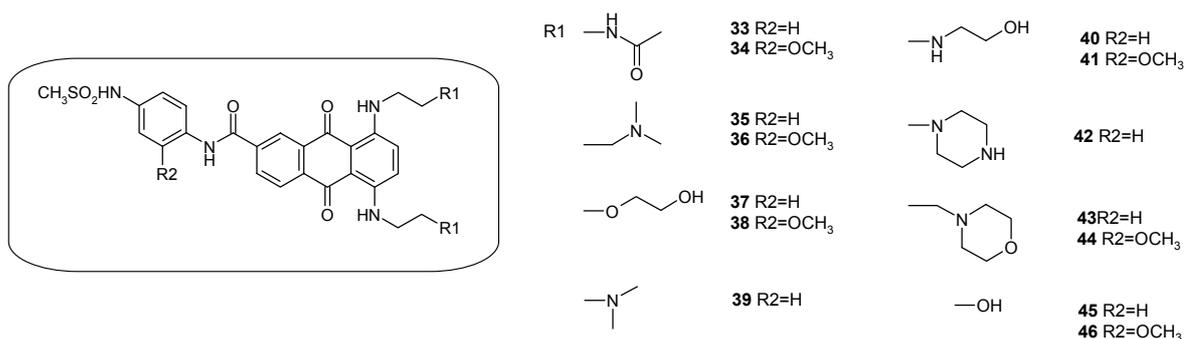
Nel complesso tra m-AMSA e DNA, invece, il sistema aromatico planare acridinico si pone con il suo asse maggiore parallelo all'asse maggiore della coppia di basi dell'acido nucleico mentre la catena 4-metansulfonammidica si pone nel solco minore ruotata di circa 70° rispetto al piano dell'acridina: l'azoto dell'acridina si trova così posizionato al centro del solco maggiore.



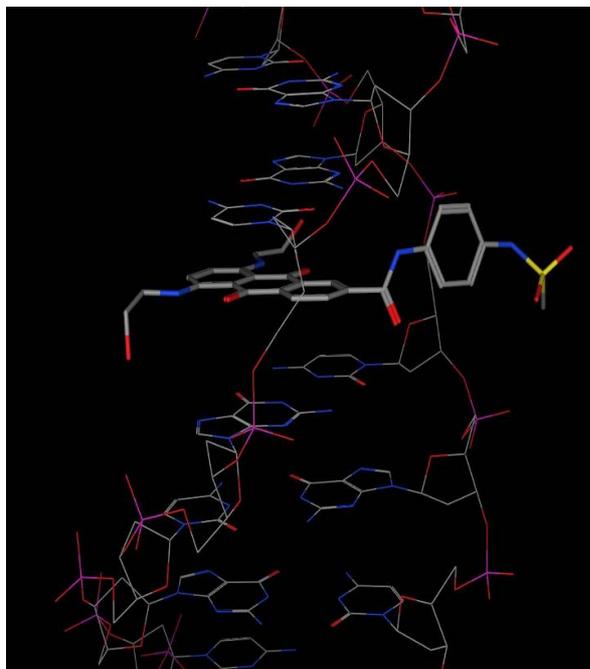
**Figura 15** Complesso tra m-AMSA e DNA.

Per valutare il meccanismo con il quale l'enzima rilassa o avvolge la doppia elica e, in particolar modo per determinare le interazioni delle catene laterali con l'enzima all'interno del "cleavable complex", si è pensato di sintetizzare una serie di composti ibridi che racchiudessero le proprietà strutturali sia del mitoxantrone che dell'amsacrina.

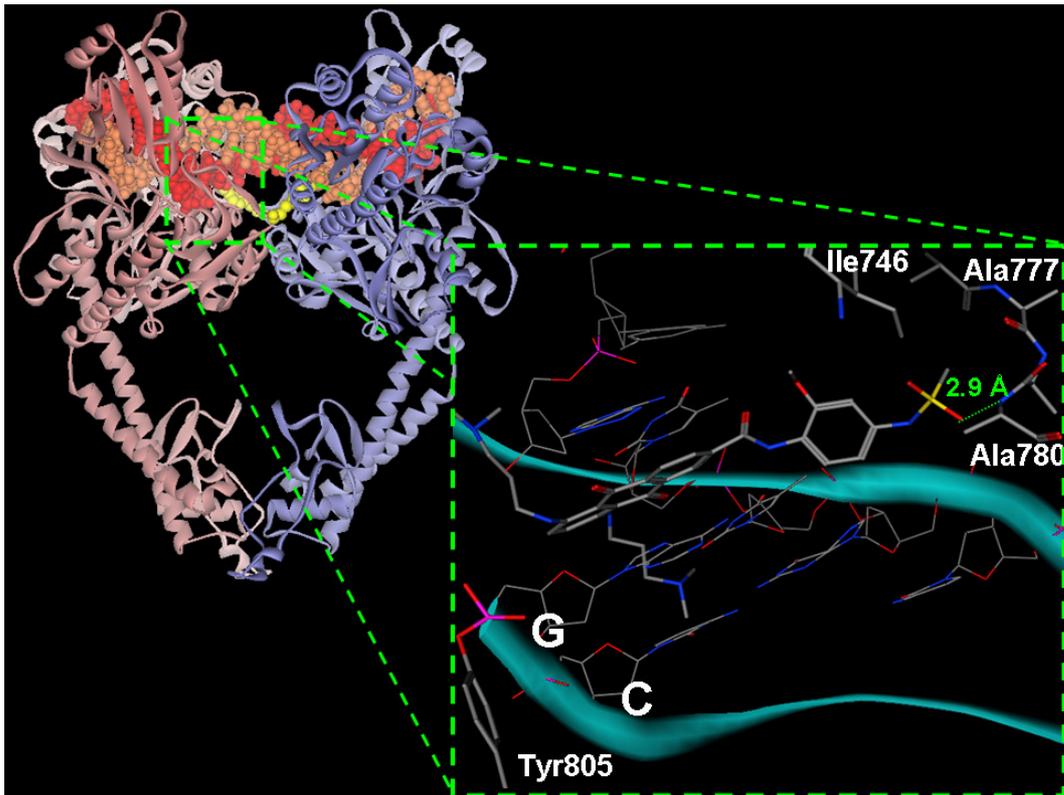
I derivati, quindi, pur mantenendo la catena metansolfonica e il nucleo antracendionico si diversificano nelle catene sostituite in 1,4 variando la disponibilità di queste porzioni alle interazioni con il solco maggiore.



Le catene laterali preposte ad imitare quelle del mitoxantrone sono costituite da uno braccio etilaminico sostituito con un gruppo N-acetilammino, 2-idrossiammino, N-dimetilammino-metil, 2-idrossi-etossi, piperazinil, 3-morfolin-4-il-metil. Sono state selezionate a partire da dati di letteratura e riprendono le caratteristiche della catena laterale del mitoxantrone in quanto essenziale nella formazione di un importante legame elettrostatico tra la sua forma protonata e l'anione fosfato dello scheletro del DNA.



**Figura 16** Modello molecolare dell'ibrido Mitoxantrone-AMSA 45 intercalato nel DNA.



**Figura 17** Interazioni tra il derivato 36 nel complesso topoisomerasi II-DNA.

## **4. Parte sperimentale**

## 4.1 Materiali e Strumentazione

### 4.1.1 Materiali

#### 4.1.1.1 Reagenti

Sono stati impiegati reagenti delle ditte Sigma-Aldrich e Fluka senza ulteriori purificazioni.

#### 4.1.1.2 Solventi

Sono stati usati solventi delle ditte Normapur Prolabo, Sigma-Aldrich e Riedel-De Haën.

#### 4.1.1.3 Solventi deuterati

Sono stati utilizzati solventi deuterati della ditta Sigma-Aldrich.

#### 4.1.1.4 Lastre per TLC

Sono state usate lastre con supporto in vetro Silica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck.

#### 4.1.1.5 Fasi stazionarie per cromatografia su colonna

E' stato usato gel di silice Silica Gel 60 (220-440 Mesh) della ditta Fluka.

### 4.1.2 Strumentazione

#### 4.1.2.1 Spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati ottenuti con uno spettrometro NMR Bruker AMX 300 e NMR Bruker AMX 400.

#### 4.1.2.2 Spettrometria infrarossa (IR)

Gli spettri infrarosso sono stati registrati con uno spettrometro Perkin-Elmer 1760 Infrared Fourier Trasformation Spectrometer.

#### 4.1.2.3 Punti di fusione

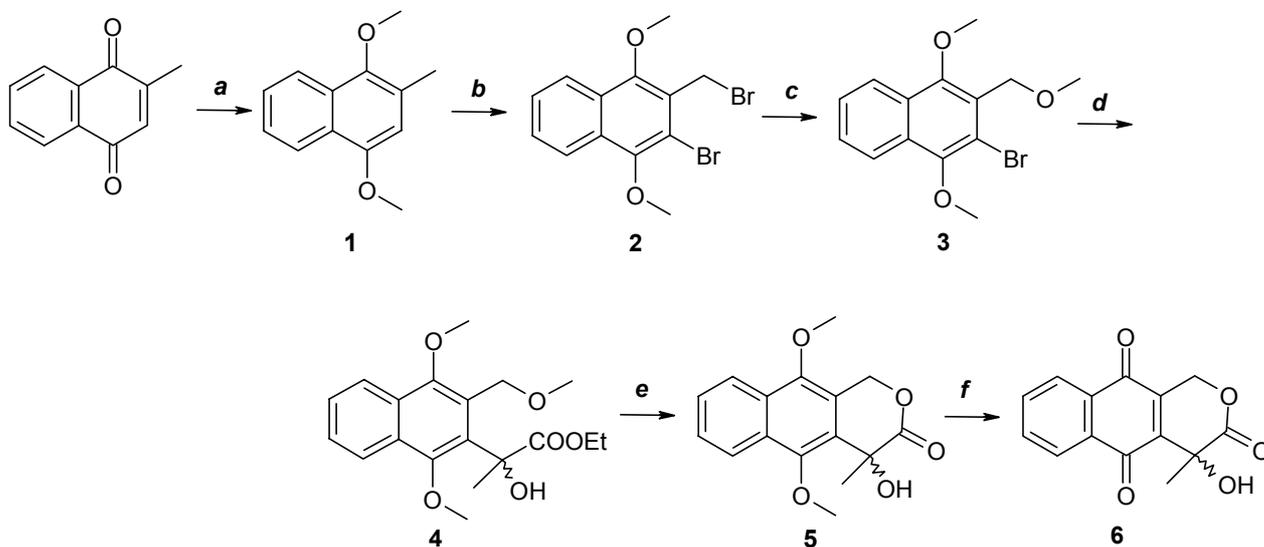
I punti di fusione sono stati misurati con uno strumento Gallenkamp Melting Point Apparatus.

#### 4.1.2.4 Spettrometria di massa:

Gli spettri di massa HRMS sono stati ottenuti con uno spettrometro Mariner™ API-TOF System 5220 e ionizzazione ESI.

## 4.2 Metodi:

## 4.2.1 Sintesi 1:



**a)**  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{EtOAc}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$  ; **b)** NBS,  $\text{CCl}_4$  rif 3h, NBS, dibenzoilperossido rif 3,5h; **c)**  $\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$  rif 3,5h; **d)** 1)  $n\text{-BuLi}$ , THF  $-80^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{CH}_3\text{COCOOEt}$  3)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat; **e)** 1)  $\text{TMSCl}/\text{NaI}$  ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); 2)  $\text{HCl}$  5M ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ); **f)**  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ).

#### 4.2.1.1 Sintesi di 1,4-Dimetossi-2-metilnaftalene (1)

La reazione avviene in due step. A una sospensione di 2-metil-1,4-naftochinone (10.33 g, 60 mmol) in EtOAc (80 ml) si aggiunge una soluzione di  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (24.58 g, 120 mmol) in acqua (80 ml). La miscela di reazione viene lasciata sotto vigorosa agitazione per circa mezz'ora a temperatura ambiente. La riduzione è completa quando la fase organica ritorna ad essere giallo pallido. Si separa quindi la fase organica da quella acquosa, si lava la stessa con acqua (2 x 40 ml) e si concentra a pressione ridotta. Al residuo si aggiunge n-esano (60 ml) e il precipitato grezzo ottenuto viene dunque tritato su mortaio con n-esano. I cristalli vengono raccolti, lavati con n-esano e asciugati sotto vuoto. Si ottengono 7.69 g di intermedio **53** (2-metilnaftalen-1,4-diolo, 44.1 mmol) come polvere cristallina bianco-rosata. (resa: 74%)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  9,32 (s; 1H; OH), 8,24 (s; 1H; OH), 8,01 (m; 2H; 5 e 8) 7,35 (m; 2H; 6 e 7), 6,65 (s; 1H; 3), 2,30 (s; 3H;  $-\text{CH}_3$ ).

Ad una soluzione di **53** (7.66 g, 44 mmol) e  $(\text{CH}_3)\text{SO}_4$  (22.2 g, 176 mmol) in 2-propanolo (80 ml) si gocciola una soluzione di  $\text{NaOCH}_3$  30% in MeOH (31.69 ml, 176 mmol). Si agita la miscela per 30' a 63 °C. Si controlla l'avanzamento della reazione tramite TLC (eluente: toluene/10% EtOAc). Dopo aver portato la miscela a rt, si diluisce con acqua (240 ml) e si estrae con etere diisopropilico (3 x 150 ml). Le fasi organiche vengono riunite, lavate con acqua e concentrate a pressione ridotta. Si ottiene un olio scuro molto viscoso che viene purificato per cromatografia su silice (n-esano/ $\text{CHCl}_3$  1:1) ottenendo il prodotto **1** (1,4-dimetossi-2-metilnaftalene, 8.29 g, 41 mmol) come solido bianco con una resa del 93 %. La resa complessiva dei due step è 69% .

**Pf:** 33-34 °C

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,12 (m; 2H; 5 e 8), 7,48 (m; 2H; 6 e 7), 6,61 (s; 1H; 3), 3,97 (s; 3H;  $-\text{OCH}_3$ ), 3,87 (s; 3H;  $-\text{OCH}_3$ ) 2,45 (s; 3H;  $-\text{CH}_3$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  15,1; 56,3; 56,8; 107,3; 117,7; 120,9; 121,0; 124,6; 125,5; 126,2; 128,1; 144,7; 148,1.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3068; 2935; 1596; 1461; 1359; 1265; 1222; 1120; 1094; 768.

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_2$ : 203,2642; trovato 203,2637.

#### 4.2.1.2 Sintesi di 2-Bromo-3-(Bromometil)-1,4-Dimetossinaftalene (**2**)

A una soluzione di **1** (6.47 g, 32 mmol) in tetraclorometano (100 ml) si aggiunge un equivalente di NBS (5.7 g, 32 mmol). La miscela di reazione è posta a riflusso per 3 h e poi raffreddata a 0°C. Si aggiunge un altro equivalente di NBS (5.7 g, 32 mmol) e dibenzoil perossido (0.76g, 3.2 mmol) e si pone a riflusso per 3 h. La miscela di reazione viene quindi portata a rt, filtrata per eliminare la succinimide precipitata e il liquido filtrato viene lavato in successione con una soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e con NaOH 2 M, quindi anidrificato e ridotto a secchezza a pressione ridotta. Si ottiene un olio rosso scuro (11.80 g) che ricristallizzato da MeOH dà un solido bianco cristallino, il 2-bromo-3-(bromometil)-1,4-dimetossinaftalene **2** (9.32 g, 25.9 mmol) con una resa del 81%.

**Pf:** 82-85 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** in (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,10 (m; 2H; 5 e 8), 7,57 (m; 2H; 6 e 7), 4,94 (s, 2H; 3'), 4,09 (s, 3H; -OCH<sub>3</sub>), 3,99(s, 3H; -OCH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 17,7; 55,6; 56,6; 99,2; 115,8; 119,9; 120,6; 124,8; 125,4; 125,7; 128,8; 146,2; 149,7.

**IR (KBr)** cm<sup>-1</sup>: 3068; 2937; 1578; 1396; 1352; 1292; 1068; 769; 695.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:361,0518; trovato 361,0539.

#### 4.2.1.3 Sintesi di 2-Bromo-1,4-Dimetossi -3-Metossimetilnaftalene **3**

Ad una soluzione di **2** (9 g, 25 mmol) in MeOH (100 ml) si aggiunge NaOCH<sub>3</sub> 30% in MeOH (9 ml, 50 mmol). Si scalda la miscela di reazione a riflusso per 1,5 h quindi si versa in acqua ottenendo un precipitato color salmone. Si neutralizza cautamente con AcCOOH e quindi si setrae il precipitato con Et<sub>2</sub>O. La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a pressione ridotta. Si ottiene il 2-bromo-1,4-dimetossi-3-metossimetilnaftalene **3** come un olio di color arancio (7.48 g, 24 mmol) che viene ulteriormente purificato per cromatografia su silice (toluene/EtOAc 9:1) dando un solido bianco con una resa del 96%.

**Pf:** 70-73 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ 8,11( m, 2H; 5 e 8), 7,56 (m; 2H; 6 e 7), 4,78 (s; 2H; 3'), 3,99(s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 1), 3,98 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 4), 3,52 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> metossimetile).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 55,6; 56,6; 58,9; 99,3; 115,8; 120,0; 120,6; 124,8; 125,3; 125,9; 128,8; 146,5; 149,2.

**IR (KBr)** cm<sup>-1</sup>: 2932; 1577; 1456; 1356; 1261; 1090; 1004; 761; 719.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>BrO<sub>3</sub>:312,1798; trovato 312,1804.

#### 4.2.1.4 Sintesi di [3-Metossimetil-1,4-dimetossinaftalen-2-il]-2-idrossi propionato di etile **4**

Ad una soluzione di **3** (3 g, 9.6 mmol) in THF distillato di fresco da Na in atmosfera inerte a -78°C viene aggiunto *n*-BuLi (6.56 ml di soluzione 1.6 M in esano; 10.5 mmol) e la miscela di reazione viene agitata vigorosamente per 30 min. Si aggiunge, quindi etilpiruvato (1.39 ml, 12.5 mmol) e si mantiene l'agitazione, a -78°C, per altri 30 min. La reazione, portata a rt viene spenta per aggiunta di 10 ml di NH<sub>4</sub>Cl saturo in acqua. La fase organica viene separata e portata a secco a pressione ridotta; quindi il residuo viene ripreso con 40 ml di Et<sub>2</sub>O e lavato con NaHCO<sub>3</sub> saturo (1x20 ml), NaCl saturo (1x20 ml), e acqua (1x20 ml). La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed il solvente è eliminato a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato per cromatografia su silice (eluente: toluene/EtOAc 9:1), ottenendo 1,84 g (5.3 mmol) di **4** ([3-metossimetil-1,4-dimetossinaftalen-2-il]-2-idrossi propionato di etile, resa 55%)

**Pf:** 80-86 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,05 (m; 2H; 5 e 8), 7,50 (m; 2H; 6 e 7), 4,95 (s; 2H; CH<sub>2</sub>- 3''), 4,25 (q; J=7,1 Hz; 2H; CH<sub>3</sub> etile estere), 3,97 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 1), 3,84 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 4), 3,48 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> metossi- metile), 1,84 (s; 3H; -CH<sub>3</sub> (2')), 1,25 (t; J=7,1 Hz; 3H; -CH<sub>2</sub> etile estere)

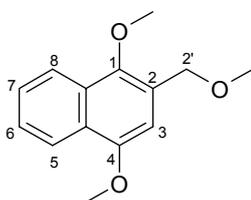
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,1; 25,3; 56,8; 58,9; 60,7; 61,9; 62,1; 114,7; 120,4; 124,4; 126,1; 130,9; 144,0.

**IR (KBr)** cm<sup>-1</sup>: 3403; 3074; 2942; 1735; 1584; 1352; 1273; 1251; 1227; 1106; 1081; 1024; 773.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>: 349,4011; trovato 349,4023.

E' stato isolato e caratterizzato anche il seguente sottoprodotto (**47**) con una resa del 25%:

1,4-dimetossi-2-metossimetilnaftalene



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,10 (m; 2H; 5 e 8), 7,50 (m; 2H; 6 e 7), 6,84 (s; 1H; 3), 4,69 (s; 2H; 2'), 4,00 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 1), 3,91 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 4), 3,46 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> metossimetil).

## 4.2.1.5 Sintesi di 5,10-dimetossi-4-idrossi-4-metil-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran-3-one 5

Ad una miscela di **4** (1 g; 2.9 mmol) e NaI (1.72 g; 11.5 mmol) in CH<sub>3</sub>CN anidro (30 ml) viene gocciolato a rt e sotto agitazione TMSCl (1.46 ml; 11.5 mmol). La miscela di reazione viene quindi posta a riflusso per 4 h. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta e il residuo ripreso con 30 ml di CH<sub>3</sub>CN a cui si aggiungono 50 ml di HBr al 48%. Si scalda quindi a riflusso moderato per evitare la formazione del prodotto di eliminazione per 4 h monitorando la reazione mediante TLC (toluene/EtOAc 8:2). A reazione conclusa, si estrae con una miscela 5% MeOH in CHCl<sub>3</sub> (4x30 ml). Le fasi organiche riunite e lavate con NaCl saturo (1x30 ml), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> saturo (1x30 ml) e nuovamente NaCl saturo (1x30 ml) vengono anidrificate e concentrate a pressione ridotta. Si ottengono 0.71 g di grezzo che viene purificato per cromatografia su silice (toluene/EtOAc 8:2). Si ottengono infine 0.398 g (1.38 mmol) di **5** (5,10-dimetossi-4-idrossi-4-metil-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran-3-one) con una resa del 48%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,02 (m; 2H; 6 e 9), 7,47 (m; 2H; 7 e 8), 5,67 (d; J<sub>gem</sub>=14,6 Hz; 1H di 1), 5,41 (d; J<sub>gem</sub>=14,6 Hz; 1H di 1), 4,22 (q; J<sub>4</sub>=7,6 Hz; 1H; -OH 4), 3,88 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 10), 3,85 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 5), 1,51 (d; J<sub>4</sub>=7,6 Hz; 3H; -CH<sub>3</sub> 4).

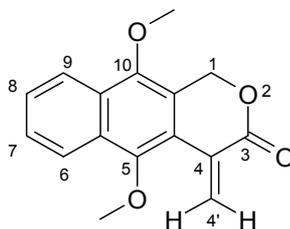
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25,0; 56,8; 63,1; 73,2; 114,7; 120,4; 124,4; 126,1; 130,9; 144,0.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3431; 3068; 2937; 1741; 1358; 1246; 1215; 1080; 1057; 775.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>: 289,301; trovato 289,3031.

E' stato isolato e caratterizzato anche il seguente sottoprodotto di eliminazione (**48**):

5,10-dimetossi-4-metilen-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran -3-one



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,13 (m; 2H; 6 e 9), 7,58 (m; 2H; 7 e 8), 6,87 (d; J=1,7 Hz; 1H in 4'), 6,82 (d; J=1,7 Hz; 1H in 4), 5,48 (s; 2H; 1), 3,93 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 10), 3,82 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 5).

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3078; 3000; 2937; 1724; 1608; 1349; 1287; 1254; 1140; 1081; 1053; 953; 773.

4.2.1.6 Sintesi di 4-Idrossi-metil-1,4-diidro-nafto [2,3-c]piran-3,5,10-trione.

Ad una soluzione di **5** (100 mg; 0.35 mmol) in acetonitrile (10 ml) si aggiunge goccia a goccia una soluzione di  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (482 mg; 0.88 mmol) in acqua (10 ml). Si lascia la miscela sotto agitazione a rt per 1,5 h quindi si diluisce con acqua (40 ml) e si estrae con  $\text{CHCl}_3$  (4x15 ml). Le fasi organiche vengono riunite, anidificate ed il solvente è evaporato a pressione ridotta. Il prodotto **6** viene ottenuto per purificazione per cromatografia su silice (toluene/EtOAc 8:2) con una resa del 64 % (57.8 mg, 0.224 mmol di 4-Idrossi-4-metil-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran-3,5,10-trione).

**Pf:** 105-109 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,15 (m; 2H; 6 e 9), 7,80 (m; 2H; 7 e 8), 5,56 (dd;  $J_{\text{gem}}=18,3$  Hz;  $J_6=1,5$  Hz; 1H di 1), 5,26 (dd;  $J_{\text{gem}}=18,3$  Hz;  $J_6=1,5$  Hz; 1H di 1), 4,01 (qt;  $J_4=7,6$  Hz;  $J_6=1,5$  Hz; 1H; -OH 4), 1,53 (d;  $J_4=7,6$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3$  4).

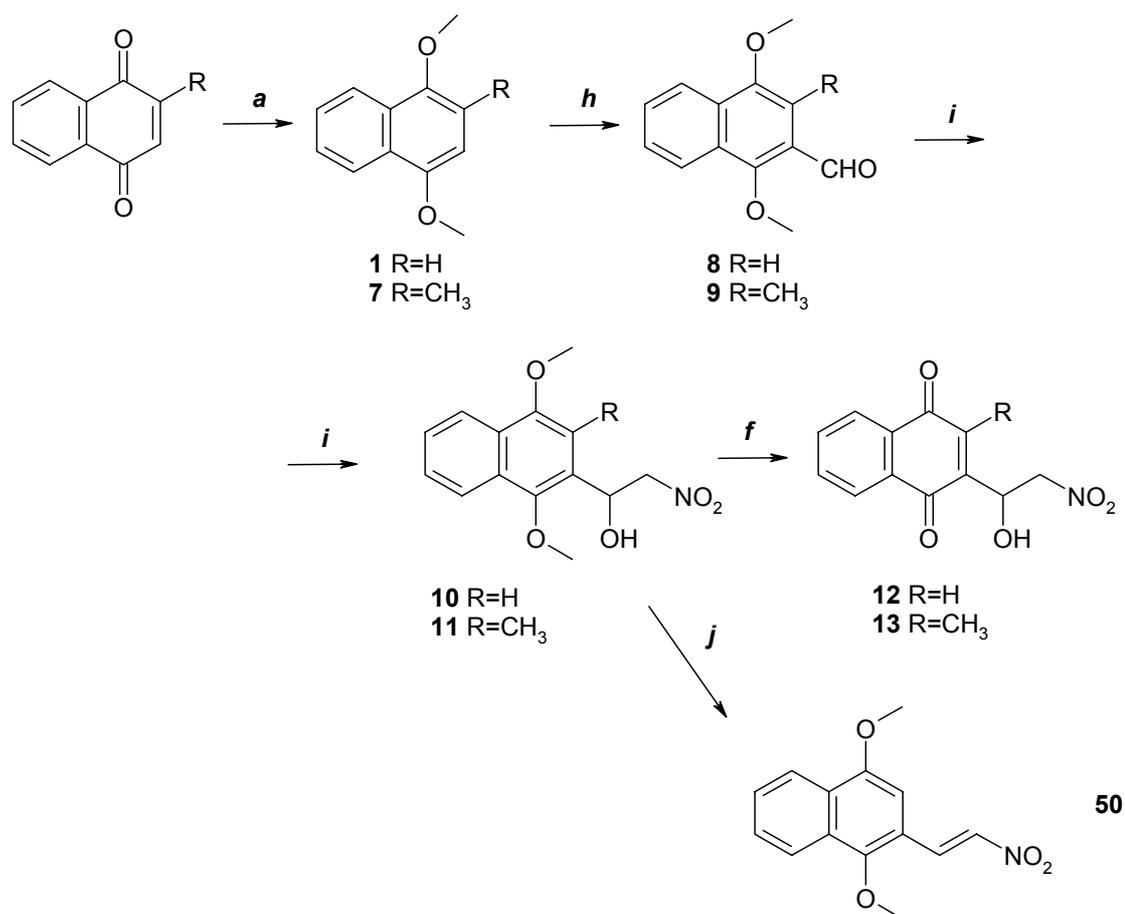
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24,0; 63,2; 77,8; 130,4; 131,9; 135,1; 145,3; 147,3; 172,5; 183,1.

**<sup>1</sup>H-NMR** di disaccoppiamento dell'OH in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz): (frequenza di disaccoppiamento: 1604 Hz)  $\delta$  8,12 (m; 2H; 6 e 9), 7,80 (m; 2H; 7 e 8), 5,56 (d;  $J_{\text{gem}}=18,3$  Hz; 1H di 1), 5,26 (d;  $J_{\text{gem}}=18,3$  Hz; 1H di 1), 1,54 (s; 3H;  $-\text{CH}_3$  in 4).

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3431; 3066; 2923; 1750; 1684; 1663; 1260; 1219; 1065; 711.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_5$ : 259,0650; trovato 259,0601.

4.2.2 Sintesi 2:



**a)** Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/EtOAc, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup> ; **f)** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN; **h)** R=H, POCl<sub>3</sub>/DMF; R=CH<sub>3</sub> TiCl<sub>4</sub>, Cl<sub>2</sub>CHOCH<sub>3</sub> **i)** CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>; **j)** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **k)** Ac<sub>2</sub>O, TFA.

#### 4.2.2.1 Sintesi dell'1,4-dimetossinaftalene **7**

Ad una sospensione di 1,4-naftochinone (6,33g, 40 mmol) in EtOAc (60mL) si aggiunge una soluzione di ditionito di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  16.4 g, 80 mmol) in acqua (60mL). La miscela di reazione viene agitata vigorosamente per 30 min circa o fino a che la fase acquosa non si colora intensamente di giallo. La fase organica, separata e lavata con acqua viene concentrata a pressione ridotta. Il residuo viene ripreso con n-esano (40 ml) e il residuo indisciolto viene raccolto e tritato con n-esano in mortaio. I cristalli ottenuti vengono raccolti, lavati con n-esano e asciugati sotto vuoto ottenendo così 2,35 g di intermedio **49** (1,4-diidrossinaftalene).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,03 (bs, 1H, OH,), 8,62 (m, 2H, 5 e 8), 7,90 (m, 2H, 6 e 7), 7,17 (s, 2H, 2 e 3).

Ad una soluzione di **48** (2.44 g, 0.015 moli) e  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  (5.7mL, 0.06 moli) in *i*-propanolo (25 mL) si gocciola  $\text{NaOCH}_3$  al 30% in MeOH (10.8mL, 0.06 moli). La miscela risultante viene lasciata sotto agitazione per mezz'ora a 60°C. La reazione viene monitorata per TLC (toluene/ EtOAc 9:1). Dopo raffreddamento della miscela viene aggiunta acqua (75mL), si estrae con etere isopropilico (3x 50 mL). Le fasi organiche vengono riunite, lavate con acqua e concentrate a pressione ridotta. Si ottengono 3.5 g di 1,4-dimetossinaftalene come solido marrone impuro che viene purificato tramite cromatografia su gel di silice (esano/cloroformio 1:1). Il prodotto **7** si presenta come solido cristallino bianco, 2,81 g.

Resa complessiva dei 2 stadi: 38%

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.13 (m; 2H; 5 e 8), 7.45 (m; 2H; 6 e 7), 6.66 (s,; 2H; 2 e 3), 3.92 (s; 6H;  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  56,3; 104,1; 121,5; 125,7; 148,9.

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_2$ : 189,2365; trovato 189,2364.

#### 4.2.2.2 Sintesi di 1,4-Dimetossi-2-naftaldeide **8**

In un pallone da 50 mL si sciolgono 1.38 g di **7** in circa 2 mL di cloroformio.

Si aggiunge poi una soluzione di POCl<sub>3</sub> (3.4 mL) in DMF (2.8 mL) preparata a parte e si riscalda a refluxo per 24 h sotto agitazione magnetica. Dopo raffreddamento, si decompone l'addotto in acqua e ghiaccio e si estrae con CHCl<sub>3</sub> (10 ml). La fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl (2x 15ml), anidrificata e concentrata a pressione ridotta. Si ottengono 1.87 g di grezzo, che viene purificato tramite cromatografia su silice eluendo (toluene/EtOAc, 95:5) dando 1,12 g di composto **8** puro. (Resa: 71%)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 10.72 (s; 1H; CHO), 8.38 (m; 2H; 5 e 8), 7.77 (m; 2H; 6 e 7), 7.39 (s; 1H; 3), 4.24 (s; 3H; CH<sub>3</sub>), 4.16 (s; 3H; CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 56,6; 102,1; 108,6; 121,2; 123,3; 126,6; 130,6; 149,7; 153,4; 191,0.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>: 217,2403; trovato 217,2406.

#### 4.2.2.3 Sintesi di 1,4-Dimetossi-3-metil-2-naftaldeide **9**

Ad una soluzione di **1** (1 g; 5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) a -40°C si gocciola TiCl<sub>4</sub> (0.548 ml; 5 mmol); si porta a -20°C e si aggiunge diclorometilmetiletero (Cl<sub>2</sub>CHOCH<sub>3</sub>, 0.452 ml; 5 mmol). Si agita la miscela per 2 h a 0°C, quindi si diluisce con acqua (50 ml) e si estrae con EtOAc (3x 20ml). Le fasi organiche, riunite e lavate con acqua (4x10 ml), vengono evaporate a pressione ridotta, ottenendo un grezzo che viene purificato per cromatografia su silice (gradiente EtOAc 0-10% in toluene). Si ottengono 0,932 g (4.04 mmol) di **9** (1,4-dimetossi-3-metil-2-naftaldeide) sotto forma di aghi bianchi con una resa del 81%.

**Pf:** 91-94 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10,73 (s; 1H; -CHO), 8,15 (m; 2H; 5 e 8), 7,60 (m; 2H; 6 e 7), 4,07 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 1), 3,87 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub> 4), 2,65 (s; 3H; -CH<sub>3</sub> 2).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,1; 56,6; 105,1; 118,6; 120,2; 124,3; 126,6; 190,0.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3074; 2936; 1685; 1445; 1349; 1194; 1076; 1016; 777.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>: 231,2715; trovato 231,2708.

#### 4.2.2.4 Sintesi del 1,4-dimetossi-2-(1-idrossi-2-nitroetil)-naftalene 10

In un pallone da 50 mL si sciolgono 250 mg di **8** in 2 mL di THF e 2 mL di t-BuOH. La soluzione così ottenuta viene posta in atmosfera inerte d'azoto e quindi aggiunta di 0.19 mL di nitrometano e 0.052 mL di una soluzione di t-BuOK 1 M in THF. La miscela viene lasciata sotto agitazione magnetica per circa 16 h a rt. Al termine della reazione si diluisce con etere etilico e acqua, e la fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl (2 x15 ml); le acque di lavaggio vengono riunite e riestratte con etere. Il prodotto ottenuto dalle fasi organiche anidrifcate e concentrate a secchezza viene purificato dall'aldeide non reagita mediante cromatografia su gel di silice (toluene/EtOAc 95:5) ottenendo 110 mg di prodotto **10** (resa: 44%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.24 (m; 1H; 5), 8.01 (m; 1H; 8), 7.54 (m; 2H, 6 e 7), 6.88 (s; 1H; 3), 5.92 (t; 1H; H1' J= 8.2 Hz), 4.65 (d; 2H; H2' J= 8.2 Hz), 3.99 (s; 3H; CH<sub>3</sub>), 3.95 (s; 3H; CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 56,6; 61,6; 85,8; 107,1; 121,2; 123,1; 124,8; 126,6; 144,7; 148,1.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>:278,2715; trovato 278,2803.

#### 4.2.2.5 Sintesi di 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-3-metil-1,4-dimetossinaftalene 11

In un pallone da 50 ml si scioglie 1 g (4,3 mmol) di **9** in 10 ml di THF anidro e 10 ml di t-BuOH. La soluzione viene posta in atmosfera inerte di N<sub>2</sub>; si aggiungono quindi 0.71 ml (13,2 mmol) di CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> e 27 mg (0,22 mmol) di t-BuOK. La miscela è lasciata sotto agitazione magnetica per 16 h a temperatura ambiente e successivamente viene diluita con etere e acqua acidificata con AcCOOH; si separa la fase organica, che viene lavata con una soluzione satura di NaCl. Le acque di lavaggio vengono riunite e riestratte con etere. la fase organica viene anidrificata e portata a secchezza. il grezzo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su silice (toluene/EtOAc 95:5). Si ottengono 0.865 g (2.97 mmol) di **11** (resa: 69%)

**Pf:** 115-120 °

**<sup>1</sup>H-NMR** in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (300 MHz): δ 8,07 (m; 2H; 5 e 8), 7,55 (m; 2H; 6 e 7), 6,21 (ddd; J<sub>3</sub>=10,3 Hz; J<sub>3</sub>=3,1 Hz; J<sub>3</sub>=5,1 Hz; 1H; -CHOH), 5,30 (d; J<sub>3</sub>=5,1 Hz; 1H; -OH), 5,23 (dd; J<sub>gem</sub>=12,9 Hz; J<sub>3</sub>=10,3 Hz; 1H di CH<sub>2</sub> (2')), 4,81 (dd; J<sub>gem</sub>=12,9 Hz; J<sub>3</sub>=3,1 Hz; 1H di CH<sub>2</sub> (2')), 4,01 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub>) 3,85 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub>) 2,62 (s; 3H; -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,2; 55,3; 56,6; 85,8; 117,3; 120,4; 124,4; 125,2; 126,1; 144,0.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3412; 2942; 1557; 1353; 1199; 1118; 1082; 1067; 779.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>: 292,3107; trovato 292,3113.

#### 4.2.2.6 Sintesi del 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-1,4-naftochinone12

Ad una soluzione di **10** (23 mg, 0.082 mmol) in acetonitrile (537 μl), alla temperatura di circa 10°C viene aggiunta una soluzione di (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (C.A.N., 112.38 mg) in acqua (0.667 μl). La miscela viene lasciata sotto agitazione per 30'. Successivamente si diluisce con acqua e si estrae con CHCl<sub>3</sub>. La fase organica viene lavata con acqua (2x 5ml), anidrificata e concentrata a pressione ridotta. Si ottengono 21.85 mg del prodotto **12**. Resa 95%

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.10 (m; 2H; 5 e 8), 7.79 (m; 2H; 6 e 7), 7.26 (s; 1H; 3), 5.56 (dd; 1H; H1' J<sub>3</sub>=2.8 Hz, J<sub>3</sub>=8.4 Hz), 4.86 (dd; 1H, 2' J<sub>3</sub>= 13.7 Hz, J<sub>3</sub>= 2,8 Hz), 4.57 (dd; 1H; H2' J<sub>3</sub>= 13.7 Hz, J<sub>3</sub>= 8.4 Hz).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 66,6; 80,8; 130,4; 131,9; 135,1; 135,4; 148,0; 182,3.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3412; 2942; 1557; 1353; 1199; 1118; 1082; 1067; 779.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>: 248,2112; trovato 248,2113.

#### 4.2.2.7 Sintesi di 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-3-metil-1,4-naftochinone 13

Ad una soluzione di **11** (300 mg; 1.03 mmol) in acetonitrile (20 ml) si aggiunge goccia a goccia una soluzione di  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (1.41 g; 2.58 mmol) in acqua (20 ml). Si lascia la miscela sotto agitazione magnetica a rt per 2 h. Successivamente si diluisce con acqua (50 ml) e si estrae con  $\text{CHCl}_3$  (4x 20ml). La fase organica viene lavata con acqua (80 ml), anidrificata ed il solvente è evaporato a pressione ridotta. Si ottengono 254 mg (0.97 mmol) di **13**. Resa: 94%

**Pf:** 118-120 °C

**$^1\text{H-NMR}$**  in  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (300 MHz):  $\delta$  8,07 (m; 2H; 5 e 8), 7,86 (m; 2H; 6 e 7), 5,97 (ddd;  $J_3=9,7$  Hz;  $J_3=3,2$  Hz;  $J_3=6,4$  Hz; 1H; -CHOH), 5,22 (d;  $J_3=6,4$  Hz; 1H; -OH), 4,99 (dd;  $J_{\text{gem}}=13,2$  Hz;  $J_3=9,7$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2-2'$ ), 4,83 (dd;  $J_{\text{gem}}=13,2$  Hz;  $J_3=3,2$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2-2'$ ), 2,40 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10,0; 59,6; 80,5; 130,4; 131,9; 135,1; 135,4; 142,0; 183,3.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3503; 2929; 1663; 1654; 1551; 1387; 1291; 1081; 721.

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_5$ : 262,2402; trovato 262,2413.

#### 4.2.2.8 Sintesi del 1,4-dimetossi-2-(2-nitro-1-etilen)-naftalene 50

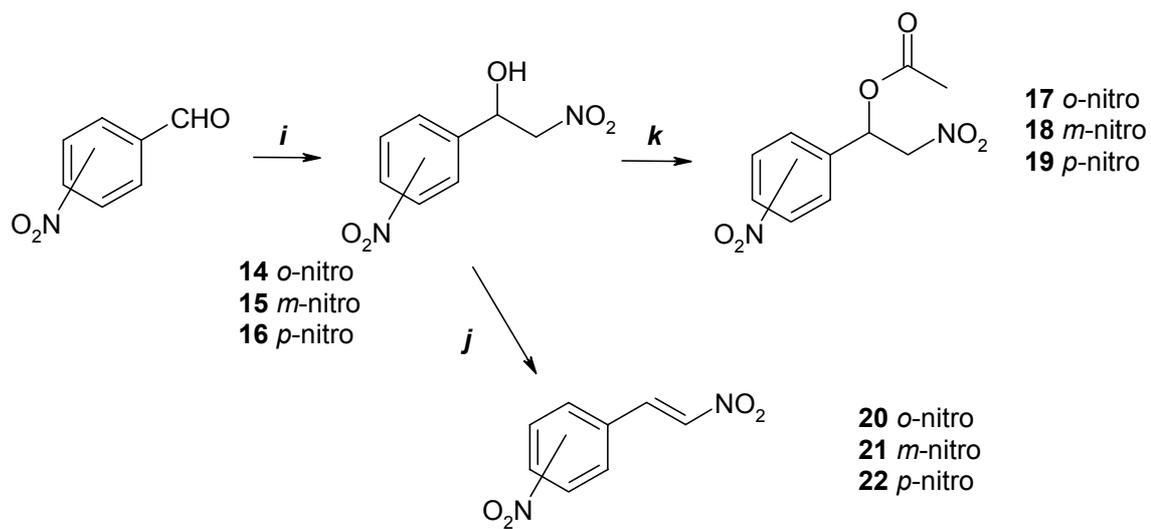
In un pallone da 50 mL vengono sciolti 400 mg di **10** in EtOAc (6 mL) e 72  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. La miscela viene posta sotto agitazione a riflusso per 2 h. La soluzione ottenuta viene lavata con acqua (10 ml) e con una soluzione al 10% di  $\text{NaHCO}_3$ . La fase organica, anidrificata e concentrata a pressione ridotta dà il composto **50** impuro. Questo viene purificato mediante cromatografia su silice (esano/EtOAc 8:2). Si ottengono 116 mg di composto **50** puro. Resa: 29%

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.47 (d; 1H;  $J_3=13.7$  Hz, 10), 8.19 (m; 2H; 5 e 8), 7.74 (d; 1H;  $J_3=13.7$  Hz, 9), 7.61 (m; 2H; 6 e 7), 6.70 (s; 1H; 3), 4.03 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 3.98 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  56,6; 107,1; 121,2; 123,1; 124,8; 126,6; 135,5; 144,7; 148,1.

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ : 260,2402; trovato 260,2603.

4.2.3 Sintesi 3:



i)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ; j)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; k)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , TFA.

#### 4.2.3.1 Sintesi di 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 14

In un pallone da 50 ml vengono introdotti 300 mg (2 mmol) di o-nitrobenzaldeide, 0.112 ml (2 mmol) di  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  e 1 ml di MeOH. Si raffredda la soluzione a  $0^\circ\text{C}$  e si aggiunge cautamente, sotto agitazione, una soluzione di KOH (0.112 g; 2 mmol) in MeOH (1 ml) mantenendo la temperatura sotto i  $5^\circ\text{C}$ . Si lascia agitare a  $0^\circ\text{C}$  per 2 h. Si diluisce con acqua (2 ml) e ghiaccio e poi lentamente si aggiungono 0.19 ml di acido acetico. Si estrae l'olio giallo che si forma con dietiletere che, anidrificato e ridotto a secchezza, dà 0.36 g (1.7 mmol) di **14**. Resa: 85%

**$^1\text{H-NMR}$**  in  $\text{DMSO-d}_6$  (300 MHz):  $\delta$  8,08 (dd;  $J = 8,2$  Hz;  $J = 1,3$  Hz 1H; 6), 7,95 (dd;  $J = 7,8$  Hz;  $J = 1,3$  Hz; 1H; 3), 7,75 (m; 1H; 5), 7,55 (m; 1H; 4), 6,06 (dd;  $J_3 = 2,3$  Hz;  $J_3 = 9,0$  Hz; 1H; CH 1'), 4,88 (dd;  $J_3 = 2,3$  Hz;  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2$  2'), 4,56 (dd;  $J_3 = 9,0$  Hz;  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2$  2').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  70,3; 85,3; 120,1; 133,3; 129,9; 140,5; 148,9.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3531; 3102; 3075; 2961; 1524; 1346; 1097; 755.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_5$ : 213,1665; trovato 213,1364.

#### 4.2.3.2 Sintesi di 3-(1-idrossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 15

Si sciolgono 0.750 g di m-nitrobenzaldeide con 0.26 ml di  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  in 7 ml di MeOH, si raffredda la soluzione a  $0^\circ\text{C}$  e, mantenendo la temperatura sotto i  $5^\circ\text{C}$  si aggiunge cautamente sotto agitazione una soluzione KOH (0.28 g; 5 mmol) in MeOH (3 ml). Si agita la reazione a  $0^\circ\text{C}$  per 2 h, quindi si diluisce con acqua (10 ml) e si aggiungono lentamente 0.57 ml (9.9 mmol) di acido acetico. Si ha la formazione di un olio (quasi nero), che viene estratto con dietiletere (15ml). La fase organica recuperata viene anidrificata e concentrata a secchezza. Il grezzo viene purificato per cromatografia su gel di silice (n-esano/EtOAc 6:4). Si ottengono 0.538 g (2.53 mmol) di **15**. Resa: 51 %

**$^1\text{H-NMR}$**  in  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz):  $\delta$  8,33 (m; 1H; 2), 8,23 (ddd;  $J = 8,2$  Hz;  $J = 2,1$  Hz;  $J = 1,1$  Hz; 1H; 6), 7,77 (m; 1H; 4), 7,61 (dd;  $J = 8,2$  Hz;  $J = 7,6$  Hz; 1H; 5), 5,61 (dd;  $J_3 = 8,0$  Hz;  $J_3 = 4,4$  Hz; 1H; CH), 4,64 (dd;  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz;  $J_3 = 8,0$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2$ ), 4,58 (dd;  $J_{\text{gem}} = 13,7$  Hz;  $J_3 = 4,4$  Hz; 1H di  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  70,3; 85,3; 120,1; 122,4; 129,9; 133,3; 141,5; 148,9.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3487; 3094; 3034; 2905; 1550; 1526; 1350; 1314; 1069; 901; 832; 735.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_5$ : 213,1665; trovato 213,1364.

#### 4.2.3.3 Sintesi di 4-(1-idrossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 16

Una soluzione di 1 g (6.6 mmol) di p-nitrobenzaldeide e 0.36 ml (6.7 mmol) di  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  in 3 ml di metanolo viene raffreddata a  $0^\circ\text{C}$  e quindi aggiunta di una soluzione di KOH (0.371 g; 6.6 mmol) in metanolo (3 ml); si lascia agitare a  $0^\circ\text{C}$  per 2 h, poi si diluisce con acqua (6ml), ghiaccio (15g) e 0.57 ml di acido acetico. Si estrae l'olio giallo intenso che si forma con dietiletere (3x 15ml). Dalle fasi organiche riunite, anidificate e ridotte a secchezza si ottengono 1.23 g (5.8 mmol) di 16. Resa: 88%

**$^1\text{H-NMR}$**  in  $\text{CDCl}_3$  (300 MHz):  $\delta$  8,27 (dd;  $J=8,7$  Hz; 2H; 2 e 6), 7,62 (dd;  $J=8,7$  Hz; 2H; 3 e 5), 5,60 (dd; 1H;  $J_3=4,4$  Hz e  $J_3=8,0$  Hz; CH), 4,61 (dd; 1H;  $J_3=8,0$  Hz e  $J_{\text{gem}}=13,7$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 4,56 (dd; 1H;  $J_3=4,4$  Hz e  $J_{\text{gem}}=13,7$  Hz;  $\text{CH}_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  71,3; 85,3; 121,1; 128,9; 146,5; 147,3.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3555; 3114; 3080; 2921; 1559; 1517; 1388; 1348; 1078; 854.

**MS (ESI-TOF) [M-H] $^+$**  calcolato per  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_5$ : 213,1665; trovato 213,1364.

#### 4.2.3.4 Procedura generale per la sintesi dei derivati 17, 18 e 19:

Introdurre in un pallone un equivalente di 1-idrossi-2-nitroetilderivato 14, 15 o 16 in 10 equivalenti di anidride acetica. Sotto raffreddamento, si aggiungono poche gocce di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato, controllando che la temperatura rimanga sotto gli  $0^\circ\text{C}$ . La soluzione viene lasciata sotto agitazione per 1 h, successivamente si diluisce con acqua (5 ml) e si pone in frigorifero per 2 h. Si recupera il precipitato giallo-bianco per filtrazione, si lava con dietiletere (10ml) e si asciuga in stufa.

*Derivato 2-(1-acetossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 17:*

Ottenuti 0.34 g (1.33 mmol). Resa : 78%

**$^1\text{H-NMR}$**  in  $\text{DMSO-d}_6$  (300 MHz):  $\delta$  8,14 (d;  $J=8,2$  Hz; 1H; 5), 7,82 (m; 2H; 3 e 6), 7,68 (m; 1H; 4), 6,77 (dd;  $J_3=3,2$  Hz;  $J_3=9,0$  Hz, 1H; CH), 5,25 (dd;  $J_3=3,2$  Hz;  $J_{\text{gem}}=14,7$  Hz, 1H di  $\text{CH}_2$ ), 5,17 (dd;  $J_3=9,0$  Hz;  $J_{\text{gem}}=14,7$  Hz, 1H di  $\text{CH}_2$ ), 2,07 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  21,0; 74,4; 82,3; 120,1; 133,3; 129,9; 140,5; 148,9; 170,4.

**IR** (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3024; 2972; 1749; 1567; 1522; 1376; 1342; 1224; 1051; 755.

**MS (ESI-TOF) [M-H] $^+$**  calcolato per  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$ : 255,2065; trovato 255,2104.

*Derivato 3-(1-acetossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 18:*

Ottenuti 0.37 g. Resa : 81%

**<sup>1</sup>H-NMR** in DMSO-d<sub>6</sub> (300 MHz): δ 8,14 (d; J= 8,2 Hz; 1H; 6), 7,82 (m; 2H; 3 e 5), 7,68 (m; 1H; 4), 6,77 (dd; J<sub>3</sub>= 3,2 Hz; J<sub>3</sub>= 9,0 Hz, 1H; CH), 5,25 (dd; J<sub>3</sub>= 3,2 Hz; J<sub>gem</sub>= 14,7 Hz, 1H di CH<sub>2</sub>), 5,17 (dd; J<sub>3</sub>= 9,0 Hz; J<sub>gem</sub>= 14,7 Hz, 1H di CH<sub>2</sub>), 2,07 (s; 3H; CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 21,0; 74,4; 82,3; 120,1; 122,4; 129,9; 133,3; 140,5; 148,9; 170,3.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3024; 2972; 1749; 1567; 1522; 1376; 1342; 1224; 1051; 901; 832; 735.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 255,2065; trovato 255,2104.

*Derivato 4-(1-acetossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 19:*

Si ottengono 0.321 g (1.26 mmol). Resa : 55%

**<sup>1</sup>H-NMR** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz): δ 8,28 (dd; J= 8,7 Hz; 2H; 2 e 6), 7,58 (dd; J= 8,7 Hz; 2H; 3 e 5), 6,49 (dd; J<sub>3</sub>= 3,8 Hz e J<sub>3</sub>= 9,2 Hz; 1H; CH), 4,82 (dd; J<sub>3</sub>= 9,2 Hz e J<sub>gem</sub>= 13,5 Hz; 1H di CH<sub>2</sub>), 4,61 (dd; J<sub>3</sub>= 3,8 Hz e J<sub>gem</sub>= 13,5 Hz; 1H di CH<sub>2</sub>), 2,14 (s; 3H; CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 21,0; 74,4; 82,3; 121,1; 128,4; 144,5; 148,9; 170,2.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3090; 2972; 1750; 1556; 1534; 1373; 1351; 1223; 1047; 901; 811; 737.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: 255,2065; trovato 255,2104.

4.2.3.5 Sintesi di 3-(1-acetossi-2-nitroetil)-1-nitrobenzene 18 e di 1-nitro-3-((E)-2-nitrovinil)benzene 21

In un bagno di ghiaccio si scioglie **15** (1.08 g; 5.09 mmol) in 3.56 ml (38 mmol) di Ac<sub>2</sub>O. Per aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (poche gocce) si ha un immediato sviluppo di calore. La soluzione viene lasciata sotto agitazione per 4 h, poi aggiunta di una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (15 ml): si ottiene un olio giallo scuro che viene estratto con EtOAc (15 ml). La fase organica viene anidrificata ed il solvente evaporato a pressione ridotta, ottenendo 0.93 g (3.66 mmol) di derivato **18** (resa: 72%). La fase acquosa viene lasciata sotto agitazione per 48 h, trascorse le quali si osserva la formazione di un precipitato giallo chiaro che, filtrato e asciugato in stufa a pressione ridotta si identifica come il prodotto di disidratazione **21** (0.109 g; 0.56 mmol). Resa 11%.

**<sup>1</sup>H-NMR** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz): δ 8,42 (m; 1H; 2), 8,35 (ddd; J=8,0 Hz; J=2 Hz; J=1 Hz; 1H; 6), 8,05 (d; 1H; J=13,7 Hz; CH 2'), 7,87 (m; 1H; 4), 7,68 (dd; 1H; J=8,0 Hz; J= 7,8 Hz; 5), 7,66 (d; 1H; J= 13,7 Hz; CH 1').

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 121,1; 127,4; 131,6; 134,9; 141,5; 147,9.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3101; 1637; 1527; 1507; 1349; 971; 901; 809; 738.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 194,1521; trovato 194,1509.

#### 4.2.3.6 Sintesi dei derivati 1-nitro-2-((E)-2-nitrovinil)benzene 20 e 1-nitro-4-((E)-2-nitrovinil)benzene 22 da 14 e 16:

In un bagno di ghiaccio si scioglie un equivalente di **14** o **15** in 8 equivalenti di anidride acetica. Per aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (poche gocce) si ha un immediato sviluppo di calore. La soluzione viene lasciata sotto agitazione per 4 h, poi aggiunta di una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> (5x anidride acetica).

La fase acquosa viene lasciata sotto agitazione per 48 h, trascorse le quali si osserva la formazione di un precipitato giallo chiaro che, filtrato e asciugato in stufa a pressione ridotta si identifica come il prodotto di disidratazione.

##### *Derivato 1-nitro-2-((E)-2-nitrovinil)benzene 20 :*

Si ottengono 0.321 g. Resa : 55%

**<sup>1</sup>H-NMR** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz): δ 8,42 (m; 1H; 6), 8,35 (ddd; J=8,0 Hz; J=2 Hz; J=1 Hz; 1H; 5), 8,05 (d; 1H; J=13,7 Hz; CH 2'), 7,87 (m; 1H; 3), 7,68 (dd; 1H; J=8,0 Hz; J= 7,8 Hz; 4), 7,66 (d; 1H; J= 13,7 Hz; CH 1').

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 120,1; 133,3;129,9; 131,6; 134,9; 141,5; 147,9.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3101; 1637; 1527; 1507; 1349; 738.

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 194,1521; trovato 194,1509.

##### *Derivato 1-nitro-4-((E)-2-nitrovinil)benzene 22 :*

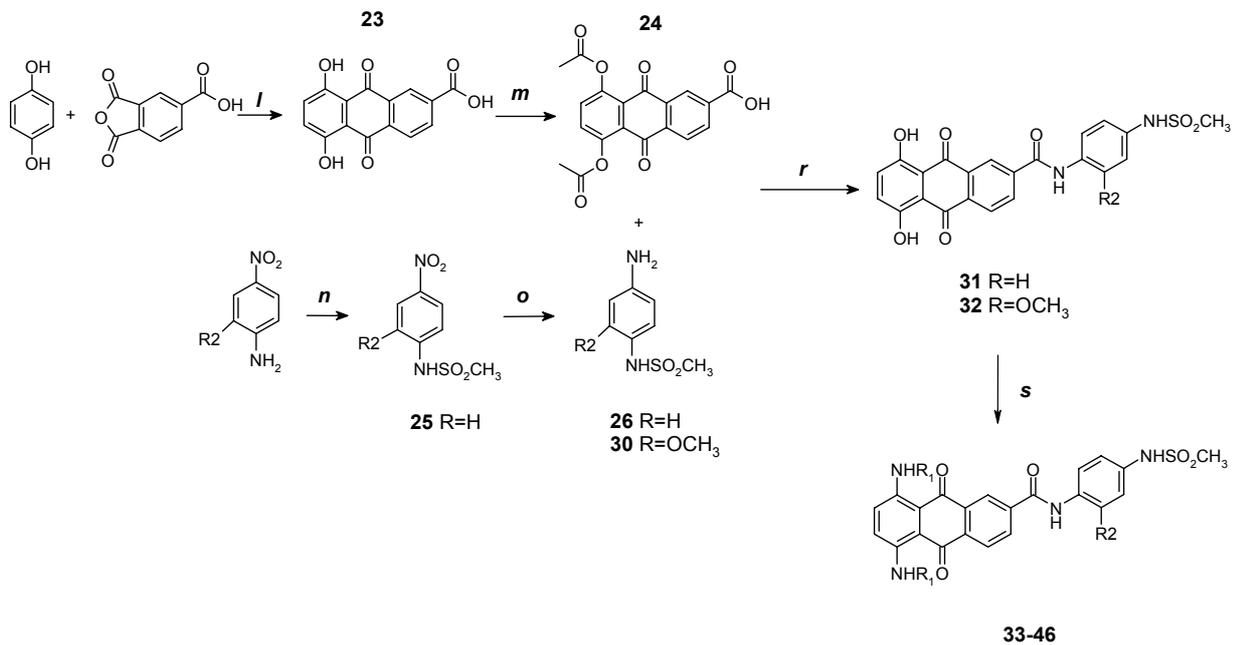
**<sup>1</sup>H-NMR** in CDCl<sub>3</sub> (300 MHz): δ 8,48 (dd; J= 8,7 Hz; 2H; 2 e 6), 8,23 (dd; J= 8,7 Hz; 2H; 3 e 5), 8,05 (d; 1H; J=13,7 Hz; CH 2'), 7,66 (d; 1H; J= 13,7 Hz; CH 1').

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 121,1; 127,9; 131,6; 134,9; 141,6; 147,9.

**IR** (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3101; 1637; 1527; 1507; 1349; 901; 811; 737.

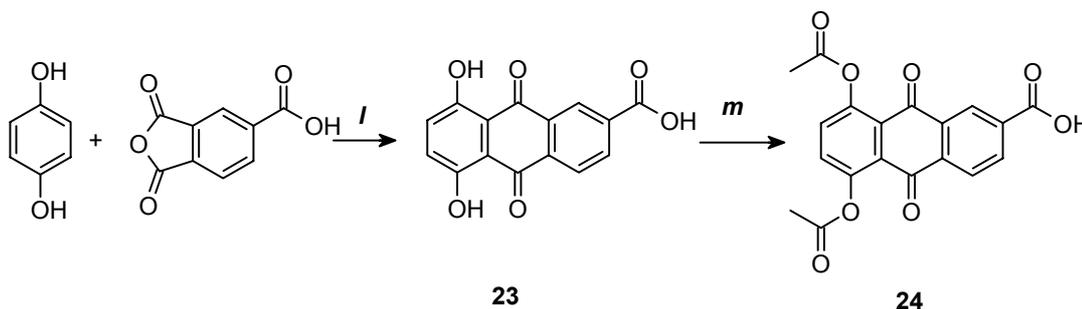
**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 194,1521; trovato 194,1509.

4.2.4 Sintesi 4:



**l)** AlCl<sub>3</sub>, NaCl; **m)** Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **n)** CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, Pyr; **o)** H<sub>2</sub>, Pd/C; **r)** 1) SO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, 2) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**s)** 1) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>; 2) O<sub>2</sub>, rt .

4.2.4.1 Preparazione di 24:

I)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ; m)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Acido 5,8 diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico 23

A  $150^\circ\text{C}$ , si fondono 200g di  $\text{AlCl}_3$  e 40 g di  $\text{NaCl}$ . Sotto agitazione meccanica si aggiungono quindi una miscela di 17,48 g (91 mmol) di anidride 1,2,4-benzentricarbossilica e 10,02 g (91 mmoli) di idrochinone ben triturati e mescolati. Nel corso della reazione, si osserva sviluppo di acido cloridrico; trascorse 6 ore circa, la reazione, monitorata per TLC ( $\text{EtOAc/isopropanolo/AcCOOH}$ :84,5/15/0,5), è conclusa. Si versa velocemente la miscela di reazione in ghiaccio acidificato con  $\text{HCl}$  sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene poi filtrato e lavato con acqua deionizzata fino a neutralità. Il grezzo di reazione, asciugato in stufa viene ricristallizzato da DMF. I cristalli, lavati con dietiletere e asciugati in stufa sono 15g di prodotto puro 23 puro. Resa 58%.

**$^1\text{H NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  13,21 (s; 1H; OH carbossilico), 12,62 (s; 2H; OH fenolico); 8,80 (s; 1H; 1); 8,54 (d; 1H;  $J = 7,8\text{Hz}$ ; 3), 8,43 (d; 1H;  $J = 7,8\text{Hz}$ ; 4), 7,55 (s; 2H; 6 e 7).

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ : 285,2305; trovato 285,2364.

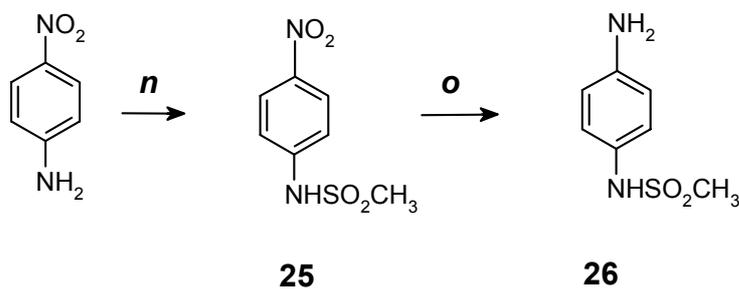
Acido 5,8 diacetossii-antracen-9,10-dione-2-carbossilico 24

2,6 g di 24 (9,11 mmol) vengono messi in un pallone con 20 ml di anidride acetica e 0,1 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La miscela di reazione viene riscaldata a riflusso sotto agitazione per 3 h. Il decorso della reazione viene monitorato per TLC ( $\text{EtOAc/isopropanolo/AcCOOH}$ :84,5/15/0,5). Per raffreddamento a rt si ottiene un precipitato che viene filtrato e lavato con dietiletere (3x 30 ml) ed  $\text{EtOH}$  (3x 30ml). Si ottengono 3g di prodotto 24 puro. Resa 89%.

**$^1\text{H NMR}$**  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  8,91 (s; 1H; 1), 8,72 (dd; 1H;  $J_3 = 7,9\text{Hz}$ , 3), 8,43 (d; 1H;  $J_3 = 7,9\text{Hz}$ ; 4), 7,95 (s; 2H; 6 e 7), 3,21 (s; 6H;  $\text{CH}_3$ ).

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ : 368,3105; trovato 368,3064.

4.2.4.2 Preparazione di 26:



n)  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ , Pyr; o)  $\text{H}_2$ , Pd/C;

N-(4-nitro-fenil)-metansulfonamide 25

Si preparano in una beuta 13,7g (0,1 moli) di *p*-nitroanilina e 9,49 g (9,71 ml, 0,12 moli) di piridina in 360 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e, a parte, 13,75 g (9,29 ml, 0,12 moli) di metansolfonilcloruro ( $\text{CH}_3\text{SOCl}$ ) in 190 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Si uniscono i contenuti delle beute lentamente e sotto agitazione e si lascia agitare per 3h. Si monitora la reazione mediante TLC (toluene/isopropanolo:9/1). Quando la reazione è terminata si aggiungono 20 ml di  $\text{NH}_4\text{OH}$  e si lascia agitare per 2 h. si nota la formazione di un precipitato che viene filtrato e lavato con  $\text{HCl}$  1M (100 ml) e poi con acqua demineralizzata fino a neutralità. Il solido, asciugato in stufa è il prodotto **25** (8,02g ). Resa 37%.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  9,62 (s; 1H; NH), 8,15 (d; 2H;  $J_3 = 7,9$  Hz; 2 e 6), 7,78 (d; 2H;  $J_3 = 7,9$  Hz; 3 e 5), 3,23 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ).

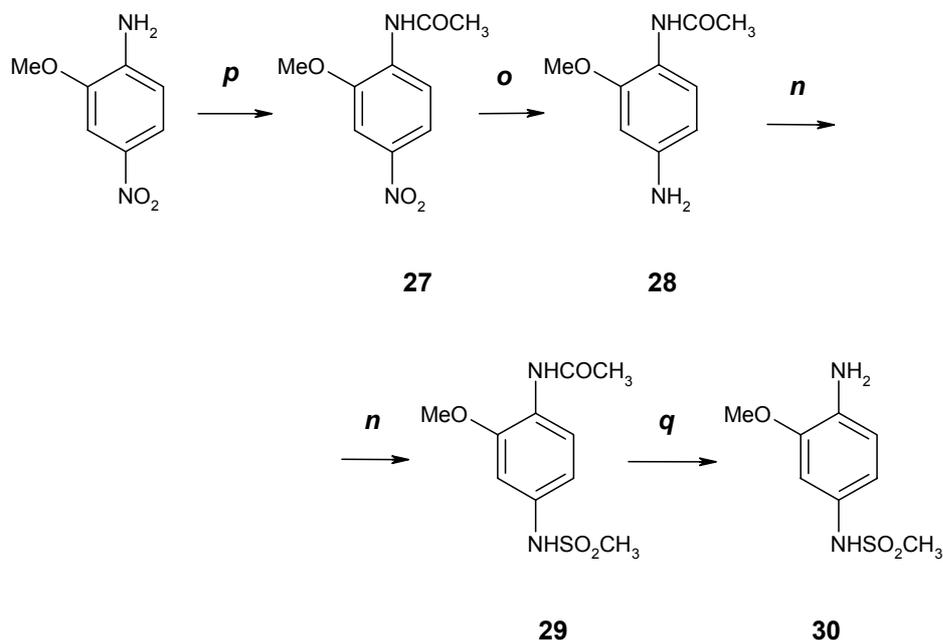
**MS (ESI-TOF)  $[\text{M}-\text{H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ : 217,2205; trovato 217,2204.

N-(4-ammino-fenil)-metan-sulfonamide 26

In autoclave si versano 7g di **25** sciolto in 250 ml di EtOH/MeOH (8:2) con 5% in peso di 10% Pd/C. Si elimina l'aria con cicli ripetuti di vuoto/azoto. Si riempie quindi l'autoclave con  $\text{H}_2$  fino a che la pressione interna è 3 atm. Dopo 1 h si ripete l'aggiunta di  $\text{H}_2$ . la reazione è conclusa quando anche l' $\text{H}_2$  della seconda aggiunta è consumato. Quindi si bonifica l'autoclave con cicli ripetuti di vuoto e azoto. Il residuo in autoclave viene filtrato su celite e silice per eliminare il catalizzatore, quindi si riduce il volume ottenendo un liquido denso che cristallizza per aggiunta di EtOH. Si lascia cristallizzare a  $4^\circ\text{C}$  per una notte. I cristalli, filtrati, lavati con EtOH e asciugati rendono 5,7 g di **26**. Resa 62%.

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  7,82 (s; 1H; NH), 7,03 (d; 2H; 2 e 6), 6,64 (d; 2H; 3 e 5), 2,84 (s; 3H;  $\text{CH}_3$ ), 1,93 (s; 3H;  $\text{NH}_2$ ).

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M}-\text{H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 187,2310; trovato 187,2306.

4.2.4.3 Preparazione di 30

n)  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ , Pyr; o)  $\text{H}_2$ , Pd/C; p)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ; q)  $\text{HCl}$

Sintesi dell'N-(2-metossi-4-nitrofenil)-acetamide 27

Ad una soluzione di 2-metossi-4-nitroanilina (10,0 g, 59,5 mmoli) e  $\text{AcCOOH}$  (56 ml) raffreddata a  $10^\circ\text{C}$  è stata aggiunta anidride acetica (6,2 ml). Si riscalda la miscela a  $80^\circ\text{C}$  per 1 h e si monitora il decorso della reazione mediante (TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , :9/1). A reazione conclusa, per raffreddamento a rt si forma un precipitato che viene filtrato, lavato abbondantemente con acqua, e asciugato in stufa. Si ottengono 11,85 g di **27**. Resa: 95%

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.50 (d;  $J=8.4$  Hz, 1H; 6), 5.80 (d;  $J=2.3$  Hz; 1H; 3), 5.78 (dd;  $J=2.3$  Hz,  $J=8.4$  Hz; 1H; 5), 3.36 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ), 1.69 (s; 3H;  $\text{NHCOCH}_3$ ).

**MS (ESI-TOF)  $[\text{M-H}]^+$**  calcolato per  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$ : 210,1903; trovato 210,1872.

Sintesi di N-(4-amino-2-metossifenil)-acetamide 28

Si sciolgono 11,0 g (52,3 mmoli) di **27** in 250 ml di MeOH e si aggiungono 100 mg di 10% Pd/C. Si pone il tutto in atmosfera inerte di N<sub>2</sub> mediante ripetuti cicli vuoto/N<sub>2</sub> e quindi si pone in atmosfera di H<sub>2</sub> mediante vescica per 4 h, mantenendo una leggera pressione positiva di H<sub>2</sub> all'interno della reazione. Si elimina l' H<sub>2</sub> in eccesso con cicli vuoto-azoto e poi il catalizzatore per filtrazione su celite e silice. Il filtrato viene quindi concentrato a secchezza ottenendo 9,20 g (51,1 mmoli) di **28**. Resa: 98%

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz in CDCl<sub>3</sub>): δ 7.50 (d; J=8.4 Hz; 1H; 6), 5.80 (d; J= 2.3 Hz; 1H; 3), 5.78 (dd; J= 2.3 Hz, J= 8.4 Hz; 1H; 5), 3.36 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>), 1.69 (s; 3H; COCH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 180,2133; trovato 180,2145.

Sintesi di N-[2-metossi-4-(metansolfonil)-aminofenil]-acetamide 29

Ad una miscela di **28** (9,20 g, 51,1 mmoli) e piridina (5,7 ml, 70,3 mmoli) in 200 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> raffreddata a 5°C viene gocciolato in 30 minuti CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl ( metansolfonilcloruro (5,44 ml, 70,3 mmoli), mantenendo la temperatura al di sotto di 15°C. La miscela di reazione è mantenuta sotto agitazione a rt per 12 h, quindi concentrata a secchezza.

Il residuo semisolido ottenuto viene sospeso in acqua (350 ml) e mantenuto sotto agitazione per 30 minuti. Il solido residuo viene raccolto per filtrazione, lavato abbondantemente con acqua e asciugato. Si ottengono così 10,67 g (41,3 mmoli) di **29**. Resa: 81%

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 9.57 (s; 1H; NH solfonico), 9.10 (s; 1H; NH acetamidico), 7.78 (d; J<sub>3</sub>=8.6 Hz; 1H; 6), 6.87 (d; J<sub>4</sub>=2.3 Hz; 1H; 3), 6.74 (dd; J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.6 Hz; 1H, 5), 3.78 (s; 3H; CH<sub>3</sub> metossilico), 2.06 (s; 3H; COCH<sub>3</sub>), 2.05 (s; 3H; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 258,3245; trovato 258,3165.

Sintesi di N-(4-amino-3-metossifenil)-metansolfonamide 30:

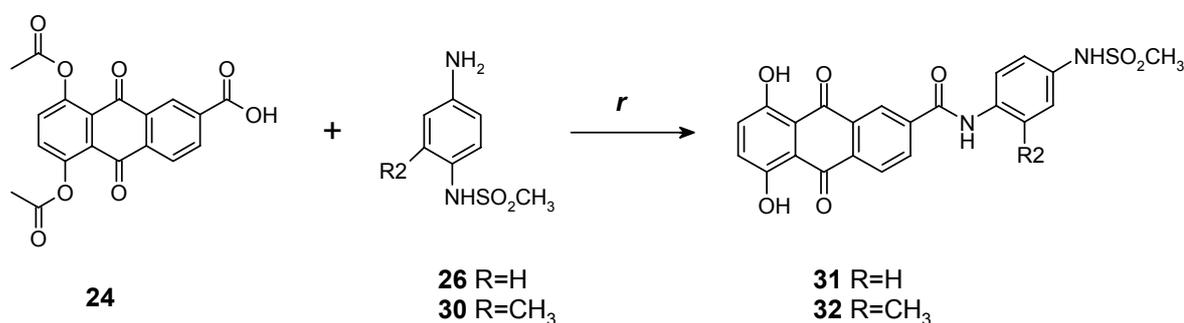
Una miscela di **29** (10,67 g, 41,3 mmoli) in EtOH 96% (40 ml), acqua (10 ml) e HCl concentrato (12 ml) viene scaldata a riflusso per 5 h. Si lascia raffreddare a rt per una notte poi ulteriormente raffreddata a 10°C, sotto agitazione per 45 minuti.

Il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con 2-propanolo (3 x10 ml) poi ripreso in acqua (80 ml) e portato a pH 7,8 con NH<sub>4</sub>OH. Si tratta, quindi la soluzione con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (81 mg) e si mantiene in agitazione per 2 h. Si forma un precipitato che viene filtrato, lavato con acqua (100 ml) e asciugato. Si ottengono 7,5 g (34,7 mmoli) di **30**. Resa: 84%

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz in CDCl<sub>3</sub>): δ 8.98 (s, 1H, NH solfonico), 6.68 (s; 1H; 2), 6.57 (m; 2H; 5 e 6), 4.65 (s; 2H; NH<sub>2</sub>), 3.73 (s; 3H; CH<sub>3</sub> metossilico), 2.83 (s; 3H; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 217,2587; trovato 217,2615.

## 4.2.4.4 Sintesi degli intermedi 31 e 32:



r) 1) SO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, 2) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Per la sintesi degli intermedi si è proceduto in maniera analoga per 31 e per 32.

Dapprima si è preparato il cloruro dell'acido 24. In un pallone viene disciolto l'acido **24** (5,0 g, 13,6 mmoli) in toluene (70ml) e sotto agitazione vengono aggiunti 1,5 ml di DMF e infine gocciolati 25 ml di cloruro di tionile (ml). La miscela viene quindi portata a riflusso per 3 h, monitorando il decorso per TLC. Si elimina il cloruro di tionile residuo mediante distillazione sotto vuoto, lavando ripetutamente con toluene.

Poi si è proceduto con il coupling delle catene 26 e 30.

Il residuo così ottenuto viene sospeso in 10 ml di toluene, aggiunto di 3,5 ml di trietilamina e, quindi di 1,1 equivalenti del sintone **26** o **30** disciolti in 50 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La reazione viene portata a riflusso per 1,5 h, trascorse le quali si forma un precipitato che viene raccolto e lavato con HCl 1M (3x50 ml) e con MeOH (3x50 ml). Si ricristallizza da MeOH, ottenendo l'intermedio **51** o **52** puro.

*Derivato 51: N-(4-metansulfonilamino-fenil)-ammide dell'acido 5,8-diacetossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico.*

Da 5,0g di 24 sono stati ottenuti 2,91 g. Resa 40%.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,73 (s; 1H; NH solfonico), 9,64 (s; 1H; NH amide), 8,65 (s; 1H; 1), 8,44 (dd; 1H; 3), 8,26 (d; 1H; 4), 7,83 (m; 4H; 2', 3', 5' e 6'), 7,26 (d; 2H; 6 e 7), 3,01 (s; 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,54 (s; 6H; CH<sub>3</sub> acetilici).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S: 536,5225; trovato 536,5218.

*Derivato 52: [2-metossi-4-(metansolfonilamino)-fenil]-ammide dell'acido 5,8-diacetossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico.*

Da 5,0 g di 24 sono stati ottenuti: 5,08 g (8,96 mmoli). Resa: 66%

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 10.05 (s; 1H; NH solfonilico), 9.76 (s; 1H; NH amide), 8.62 (d; J<sub>4</sub>=1.7Hz, 1H; 5), 8.36 (dd; J<sub>4</sub>=1.7 Hz, J<sub>3</sub>=8.2 Hz; 1H; 7), 7.77 (d; J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H; 8), 7.74 (s; 2H; 2 e 3), 7.55 (d; J<sub>3</sub>=8.4 Hz; 1H; 6'), 6,95 (d; J<sub>4</sub>=2.3 Hz; 1H; 3'), 6,84 (dd; J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.4 Hz; 1H; 5'), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.03 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.44 (s, 6H, CH<sub>3</sub> acetilici).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato per C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S: 566,5547; trovato 566,5498.

Per ottenere gli intermedi **31** e **32**, si è proceduto con la deprotezione degli ossidrili fenolici.

In un pallone da 250 ml si sciolgono 9 mmoli di derivato **51** o **52** in 90 ml di una soluzione al 5% di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La miscela viene quindi portata a riflusso per 2 h. Si neutralizza la soluzione con HCl 1 M e quindi si estrae con EtOAc (3x100 ml). Si forma un precipitato rosso che viene filtrato, lavato con EtOAc e asciugato.

*Derivato 31: 4-(metansolfonilammino)fenil-ammide dell'acido 5,8-diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico:*

Da 4,35 di 51 si ottengono 3,38g di 31 (resa 92%).

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,04 (s; 1H, NH solfonico), 9,67 (s; 1H; NH amide), 8,82 (s; 1H; 1), 8,53 (dd; 1H; 3), 8,46 (d; 1H; 4), 7,84 (d; 2H; 2' e 6'), 7,56 (s; 2H; 6 e 7), 7,28 (d; 2H; 3' e 5') 3,01 (s; 3H; CH<sub>3</sub> solfonico).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S: 452,4504; trovato 452,4423.

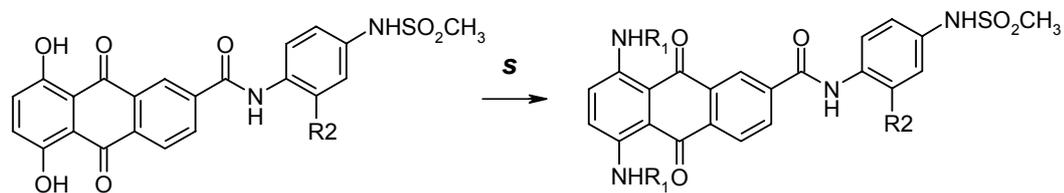
*Derivato 32: [2-metossi-4-(metansolfonilammino)fenil]-ammide dell'acido 5,8-diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico:*

Da 5,08g di 52 sono stati ottenuti: 4,22 g. Resa: 98%

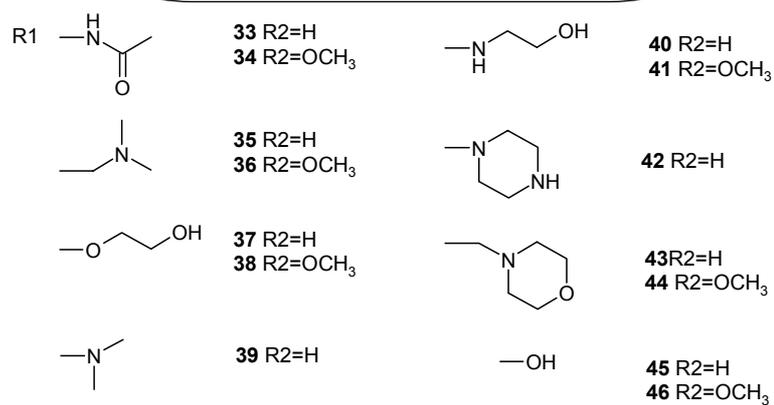
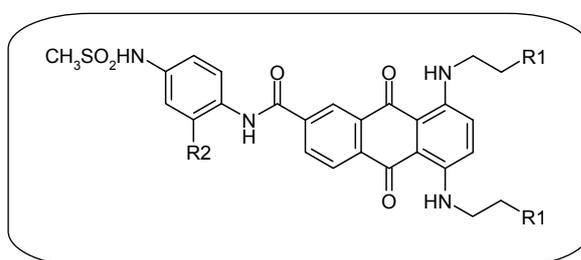
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 10.05 (s, 1H, NH solfonico), 9.97 (s, 1H, NH amide), 8.77 (d, J<sub>4</sub>=1.7Hz 1H, 5), 8.37 (dd, J<sub>4</sub>=1.7Hz, J<sub>3</sub>=8.2, 1H, 7), 8.37 (d, J<sub>3</sub>=8.2, 1H, 8), 7.56 (d, J<sub>3</sub>=8.6 Hz, 1H, 6'), 7.30 (s, 2H, 2 e 3), 6,93 (d, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, 1H, 3'), 6,82 (dd, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.6 Hz, 1H, 5'), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.99 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>+</sup>** calcolato C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S: 483,4745; trovato 482,4723.

4.2.4.5 Sostituzione delle catene:



s) 1)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{R}_1\text{-NH}_2$ ; 2)  $\text{O}_2$ , rt .



Procedura generale:

In un pallone a tre colli si scioglie 1 mmole di intermedio **31** o **32** in una minima quantità di una soluzione allo 0,5% di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (al massimo 50 ml). Si pone la reazione in atmosfera inerte con cicli vuoto/N<sub>2</sub> ed infine vuoto argon e sotto agitazione. Si aggiungono, quindi, 7,5 mmol di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e si porta a riflusso. Dopo circa 30 minuti si sggungono altre 2,5 mmol di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e quindi 10 mmoli di catena amminica scelta per la sostituzione.

Si lascia a riflusso per 12 h. Si monitora la reazione per TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/trietilamina: 5/1/0,5) e a reazione conclusa o all'equilibrio si porta a rt, si insuffla aria per 6 h per ottenere la riossidazione dell'anello.

Trascorso tale periodo, si neutralizza con HCl 1 M e si estrae il prodotto con CHCl<sub>3</sub> (3x 40ml). La fase organica, anidrificata e portata a secchezza dà il prodotto di sostituzione. All'occorrenza si purifica il prodotto mediante cromatografia in gel di silice.

*Derivato 33: 1,4-bis-[ N-acetil-etilendiammina]-N-(4-metansolfonilamminofenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione*

Catena: N-acetil-etilendiammina

Resa: da 1,11 mmoli di 31 si ottengono 304 mg di solido cristallino blu (44%).

Purificazione per cromatografia su gel di silice : EtOAc/MeOH, 8:2

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,03 (s, 1H, NH solfonico), 10,65 (s, 1H, NH aromatici ), 8,84 (s, 1H, 1), 8,44 (d, 1H, 4), 8,36 (dd, 1H, 3), 7,83 (d, 2H, 2' e 6'), 7,68 (s, 2H, 6 e 7), 7,28 (d, 2H, 3' e 5'), 3,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 1,93 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S: 622,6945; trovato 622,6935.

*Derivato 34: 1,4-bis-[N-acetil-etilendiammino]-N-(4-metansulfonilamino-2-metossifenil) -6-carbossammido-antracen-9,10-dione*

Catena: N-acetil-etilendiammina

Resa: da 1,0 mmoli di 32 si ottengono 279,8 mg di solido cristallino blu (41%).

Purificazione per cromatografia su gel di silice : CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1, 0,1% Et<sub>3</sub>N).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 11.07 (s, 1H, NH aromatici), 11.04 (s, 1H, NH solfonico), 8.79 (d, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, 1H, 5), 8.35 (dd, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 7), 8.275 (d, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 8), 7.62 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 6'), 7.66 (s, 2H, 2 e 3), 6.958 (d, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, 1H, 3'), 6.85 (dd, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 5'), 4.06 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub> prossimali catena), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub> distali della catena), 2.55 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>)

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S: 652,7425; trovato 652,7436.

*Derivato 35: 1,4-bis-[2-(N,N-dimetil)amminopropil]-ammino-N-(4-metansulfonilammino fenil) -6-carbossammido-antracen-9,10-dione*

Catena: 3-dimetilamino-1-propilamina

Resa: da 1,11 mmole: 300 mg di solido cristallino blu (43%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice :

Fase 1: toluene/MeOH, 7:3, 1% Et<sub>3</sub>N;

Fase 2: toluene/MeOH, 6:4, 1% Et<sub>3</sub>N fino a quando eluisce il prodotto;

Fase 3: toluene/MeOH, 1:1, 1% Et<sub>3</sub>N.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,05 (s; 2H; NH), 10,66 (s; 1H; NH), 8,84 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 1), 8,47 (d, J = 8.2Hz, 1H, 4), 8,35 (dd, J = 1.7 Hz, J = 8.2 Hz, 1H, 3), 7,84 (d, J = 8.96, 2H, 2' e 6'), 7,57 (s, 2H, 6 e 7), 7,28 (d, J = 8.96 Hz, 2H, 3' e 5'), 3,53 (m, J = 6.3 Hz, J = 6.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub> catena prossimali a N-AQ), 3,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,39 (t, J = 6.3 Hz, 4H, CH<sub>2</sub> catena distali), δ 1.81 (t, J = 6.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub> catena mediali), 2,24 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S: 622,7745; trovato 622,7723.

**Derivato 36:** 1,4-bis-[2-(N,N-dimetil)amminopropil-ammino]-N-(4-metansulfonilamino-2-metossifenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione

Catena: 3-dimetilamino-1-propilamina

Resa: da 1 mmol : 349,1 mg di solido cristallino blu-viola ( 44%)

Purificazione per cromatografia in gel di silice : CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 5:1, 0,1% Et<sub>3</sub>N.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 11.07 (s, 2H, NH aromatico), 11.04 (s, 1H, NH solfonico), 8.79 (d, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, 1H, 5), 8.35 (dd, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 7), 8.28 (d, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 8), 7.55 (s, 2H, 2 e 3), 6.96 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 6'), 6.85 (d, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, 1H, 3'), 6.84 (dd, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 5'), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.50 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2,35 (t, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.17 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub>), 1.80 (tt, 4H, 2CH<sub>2</sub> centrali della catena).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S: 652,8574; trovato 652,8523.

**Derivato 37:** 1,4-bis-[2-(idrossietossi)etilamino]-N-(4-metansolfonilamminofenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione

Catena: 2-(idrossietossi)etilammino

Resa: da 1,11 mmol si sono ottenuti 350mg di solido cristallino blu (50%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice: EtOAc/MeOH 8:2.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,64 (s, 1H, NH solfonico), 9,66 (s 1H, NH anilina), 8,85 (s, 1H, 5), 8,44 (d, 1H, 8), 8,37 (dd, 1H, 3), 7,85 (d, 2H, 2' e 6'), 7,67 (s, 2H, 6 e 7), 7,28 (d, 2H, 3' e 5'), 3,68 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> delle catene etossiliche), 3,54 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> delle catene etilamminiche) 3,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S: 628,6945; trovato 628,6923.

**Derivato 38:** 1,4-bis-[2-(idrossietossi)etilamino]-N-(2-metossi-4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione

Catena: 2-(idrossietossi)etilammino

Resa: da 1,0 mmol si sono ottenuti : 289 mg di solido cristallino blu (42%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 5:1, 0,1% Et<sub>3</sub>N.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 11.07 (s, 1H, NH anilina), 11.04 (s, 1H, NH solfonico), 8.79 (d, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, 1H, 5), 8.35 (dd, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 7), 8.275 (d, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 8), 7,62 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 6'), 7.65 (s, 2H, 2 e 3), 6.96 (d, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, 1H, 3'), 6.85 (dd, J<sub>4</sub>=2.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 5'), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> delle catene etossiliche distali), 3.54 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> delle catene etossiliche prossimali), 3.03 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S: 658,7105; trovato 658,7121.

*Derivato 39: 1,4-bis-[2-N,N-dimetilammino-etilamino]-N-(4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione*

Catena: N,N-dimetiletilammina

Resa: da 1,0 mmol si sono ottenuti 299 mg di solido cristallino blu (40%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice: Toluene/MeOH, 1:1, 0,1% Et<sub>3</sub>N.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 11.12 (s, 1H, NH solfonico), 10.64 (s, 1H, NH anilina), 8.79 (s, 1H, 5), 8.4 (d, J<sub>3</sub>=8.1 Hz, 1H, 8), 8.25 (d, J<sub>3</sub>=8.1 Hz, 1H, 7), 7.81 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 2H, 2' e 6'), 7.55 (s, 2H, 2 e 3), 7.23 (d, J<sub>4</sub>=7.3 Hz, 2H, 3' e 5'), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.03 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,28 (s, 12H, catena etilamino).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S: 594,7435; trovato 594,7411.

*Derivato 40: 1,4-bis-[2-(2idrossietilammino)etilamino]-N-(4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: : 2-(2-aminoetilamino) -etanolo

Resa: da 1,11 mmol ottengono 300mg di sostanza pura(43%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice: toluene/MeOH 1:1, 1% di Et<sub>3</sub>N.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,63 (s, 1H, NH solfonico), 9,67 (s 1H, NH anilina), 8,87 (s, 1H, 1), 8,45 (d, 1H, 4), 8,27 (dd, 1H, 3), 7,85 (d, 2H, 2' e 6'), 7,67 (s, 2H, 6 e 7), 7,28 (d, 2H, 3' e 5'), 3,65 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub> delle catene etanoliche), 3,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,97 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub> delle catene etanolamminiche),

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S: 626,7415; trovato 626,7423.

*Derivato 41: 1,4-bis-[2-(2idrossietilammino)etilamino]-N-(2-metossi-4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: : 2-(2-aminoetilamino) -etanolo

Resa: da 1,0 mmol ottengono 340 mg di sostanza pura (50%).

Purificazione per cromatografia in gel di silice: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 5:1, 0,1% Et<sub>3</sub>N.

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz in (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): δ 11.72 (s, 1H, 1NH anilina), 11.54 (s, 1H, NH solfonico), 8.28 (d, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, 1H, 5), 8.15 (dd, J<sub>4</sub>=1.3 Hz, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 7), 7.68 (d, J<sub>3</sub>=8.2 Hz, 1H, 8), 7.22 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 6'), 7.05 (s, 2H, 2 e 3), 6.55 (s, 1H, 3'), 6.42 (d, J<sub>3</sub>=8.4 Hz, 1H, 5'), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> legati all'O delle catene laterali), 2.97 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub> legati all'NH delle catene), 2.55 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S: 656,7598; trovato 656,7542.

*Derivato 42: 1,4-bis-[ N-(2-aminoetil)piperazinil]-N-(4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: 2 N-(2-aminoetil)-piperazina

Resa: da 1,11 mmoli di 31 ottengono 300mg di sostanza pura (40%).

Purificazione per cromatografia: Fase 1: gel di silice CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 9:1.

Fase 2: RP-Flash C18 Acqua100% → 0 %

Fase 3: toluene/MeOH, 1:1

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,03 (t, J= 6,5 Hz, 2H, NH aromatici), 8,87 (d, J<sub>4</sub>=1.7Hz, 1H, 5), 8,30 (d, J<sub>3</sub>=8,2Hz, 1H, 8), 8,25 (dd, J<sub>3</sub>= 8,2 Hz, J<sub>4</sub>= 1,7 Hz, 1H, 3), 7,8 (d, J<sub>3</sub>=8.9 Hz, 2H, 2' e 6'), 7,58 (s, 2H, 2 e 3), 7,22 (d, J<sub>3</sub>=8.9 Hz, 2H, 3' e 5'), 3,60 (m, 8H, piperazina), 3,55 (m, 4H, catena etilica), 2,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,39 (m, 8H, piperazina), 1,66 (m, 4H, catena etilica).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>S: 676,8345; trovato 676,8333.

*Derivato 43: 1,4-bis-[ N-(aminopropilmorfolinil)-N-(4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: Amino-propil-morfolina

Resa: da 1,11 mmoli di 31 ottengono 400mg di solido cristallino blu (51%).

Purificazione per cromatografia: Toluene/MeOH, 8:2

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,05 (t, J= 6,5 Hz, 2H, NH aromatici), 8,85 (d, J<sub>4</sub>=1.7Hz, 1H, 5), 8,37 (d, J<sub>3</sub>=8,2Hz, 1H, 8), 8,28 (dd, J<sub>3</sub>= 8,2 Hz, J<sub>4</sub>= 1,7 Hz, 1H, 3), 7,80 (d, J<sub>3</sub>=8.9 Hz, 2H, 2' e 6'), 7,58 (s, 2H, 2 e 3), 7,22 (d, J=8.9 Hz, 2H, 3' e 5'), 3,60 (m, 8H, morfolina), 3,55 (m, 4H, catena), 2,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,39 (m, 8H, morfolina), 1,83 (m, 4H, catena propilica), 1,66 (m, 4H, catena propilica).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S: 706,8523; trovato 706,8547.

*Derivato 44: 1,4-bis-[ N-(aminopropilmorfolinil)-N-(2-metossi-4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: Amino-propil-morfolina

Resa: da 1,11 mmoli di 31 ottengono 400mg di solido cristallino blu (51%).

Purificazione per cromatografia: Toluene/MeOH, 8:2

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,05 (t, J= 6,5 Hz, 2H, NH aromatici), 8,85 (d, J<sub>4</sub>=1.7Hz, 1H, 5), 8,37 (d, J<sub>3</sub>=8,2Hz, 1H, 8), 8,28 (dd, J<sub>3</sub>= 8,2 Hz, J<sub>4</sub>= 1,7 Hz, 1H, 3), 7,80 (d, J<sub>3</sub>=8.9 Hz, 1H, 6'), 7,58 (s, 2H, 2 e 3), 7,22 (dd, J<sub>3</sub>=8.9 Hz J<sub>4</sub>=2.2 Hz, 1H, 5'), 7,20 (d, J<sub>3</sub>=8.9 Hz, 1H, 3'), 3,60 (m, 8H, morfolina), 3,55 (m, 4H, catena), 3,40 (s, 3H, metossile), 2,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico), 2,39 (m, 8H, morfolina), 1,83 (m, 4H, catena propilica), 1,66 (m, 4H, catena propilica).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S: 736,8853; trovato 736,8834.

*Derivato 45: 1,4-bis (2 idrossi-etilammino)-N-(4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: 2-idrossi-etilammina

Resa: da 1,11 mmoli di 31 ottengono 412 mg di solido cristallino blu (49%).

Purificazione per cromatografia: Toluene/MeOH, 8:2

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,12 (t, J= 6,5 Hz, 2H, NH aromatici), 9,86 (s, 1H, NH solfonico), 8,80 (d, J<sub>4</sub>=1.8Hz, 1H, 5), 8,35 (d, J<sub>3</sub>=8,1Hz, 1H, 8), 8,27 (dd, J<sub>3</sub>= 8,1 Hz, J<sub>4</sub>= 1,6 Hz, 1H, 7), 7,63 (d, J<sub>3</sub>=8.5 Hz, 1H, 6'), 7,54 (s, 2H, 2 e 3), 6,96 (d, J<sub>3</sub>=2.2 Hz, 1H, 3'), 6,83 (dd, J<sub>3</sub>=8.9 Hz J<sub>4</sub>=2.2 Hz, 1H, 5'), 3,34 (bs, OH), 3,67 (t, 4H, catena prossimali a N), 3,56 (t, 4H, catena distale a N) 3,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico).

**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S: 538,5835; trovato 538,5834.

*Derivato 46: 1,4-bis (2 idrossi-etilammino)-N-(2-metossi-4-metansulfonilamino-fenil)-6-carbossammido-antracen-9,10-dione.*

Catena: 2-idrossi-etilammina

Resa: da 1,0 mmoli di 31 ottengono 400 mg di solido cristallino blu (45%).

Purificazione per cromatografia: Toluene/MeOH, 8:2

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,12 (t, J= 6,5 Hz, 2H, NH aromatici), 9,86 (s, 1H, NH solfonico), 8,80 (d, J<sub>4</sub>=1.8Hz, 1H, 5), 8,35 (d, J<sub>3</sub>=8,1Hz, 1H, 8), 8,27 (dd, J<sub>3</sub>= 8,1 Hz, J<sub>4</sub>= 1,6 Hz, 1H, 7), 7,63 (d, J<sub>3</sub>=8.5 Hz, 1H, 6'), 7,54 (s, 2H, 2 e 3), 6,96 (d, J<sub>3</sub>=2.2 Hz, 1H, 3'), 6,83 (dd, J<sub>3</sub>=8.9 Hz J<sub>4</sub>=2.2 Hz, 1H, 5'), 3,34 (bs, OH), 3,82 (s, 3H, metossile), 3,67 (t, 4H, catena prossimali a N), 3,56 (t, 4H, catena distale a N) 3,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> solfonico).

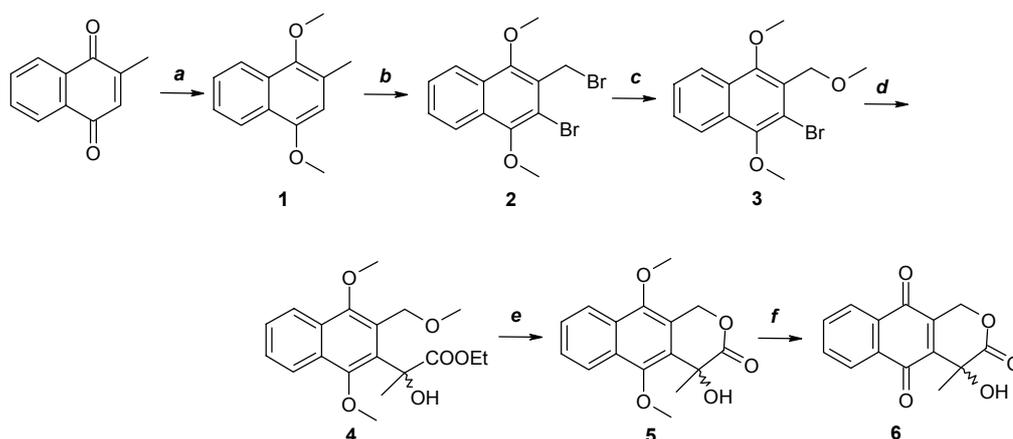
**MS (ESI-TOF) [M-H]<sup>2+</sup>** calcolato C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S: 570,6123; trovato 570,6098.



## **5. Discussione dei risultati**

## 5.1 Sintesi di derivati della camptotecina

Questo schema di sintesi è stato pensato con lo scopo di adattare al nucleo naftalenico la metodologia di costruzione dell'anello lattonico descritta da Comins<sup>31</sup> per la sintesi della Camptotecina.



**Schema di sintesi 1:** a)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{EtOAc}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$ ; b) NBS,  $\text{CCl}_4$  rif 3h, NBS, dibenzoilperossido rif 3,5h; c)  $\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$  rif 3,5h; d) 1)  $n\text{-BuLi}$ , THF  $-80^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{CH}_3\text{COCOOEt}$  3)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat; e) 1) TMSCl/NaI ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); 2) HCl 5M ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ); f)  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ).

Il 2-bromo-1,4-dimetossi-3-metossimetilnaftalene **3** è stato ottenuto a partire dal 2-metil-1,4-naftochinone, commercialmente disponibile, per riduzione del sistema chinonico e successiva metilazione del sistema idrochinonico, seguita da bromurazione e sostituzione nucleofila in posizione benzilica.

Nella prima reazione dello schema di sintesi (reazione **a**) il sistema  $\alpha,\beta$  insaturo viene convertito in un anello aromatico molto attivato. Questo passaggio risulta necessario per l'attivazione della posizione 2 dell'anello naftalenico nei confronti della bromurazione effettuata nel passaggio **b**; protezione dei gruppi carbonilici (attraverso riduzione e metilazione). La protezione dei gruppi carbonilici, oltre a favorire l'attivazione dell'anello è necessaria per la reazione **d**: infatti, rappresenterebbero dei siti di attacco nucleofilo da parte del  $n\text{-BuLi}$ . Il decorso della reazione **d** necessita la formazione di un intermedio caratterizzato dalla presenza di un legame aril-litio (quindi l'anello naftalenico deve essere aromatico e non chinonico). Inizialmente la riduzione del naftochinone era stata effettuata per mezzo di  $\text{SnCl}_2$  in HCl concentrato, ma dopo la successiva metilazione si otteneva una miscela di prodotti mono- e di-metossilati che risultavano difficilmente separabili. Si è, quindi, optato per il ditionito di sodio in quanto questo si dimostra un miglior agente riducente e si può separare chiaramente l'intermedio di reazione **46**.

La bromurazione del composto **1** avviene agevolmente "one-pot" con NBS in CCl<sub>4</sub>. Infatti, in una prima fase non si è usato alcun iniziatore radicalico e si è ottenuta la bromurazione dell'anello naftalenico grazie alla lenta liberazione di bromo elementare da parte dell'NBS; nella seconda fase, dopo l'introduzione di quantità catalitiche di benzoil-perossido, si bromura anche la posizione benzilica (bromurazione di Wohl-Ziegler). Il 2-bromo-3-(bromometil)-1,4-dimetossinaftalene **2** così ottenuto viene sottoposto a sostituzione nucleofila del bromo in posizione benzilica con metossido di sodio portando al composto **3**.

La litiazione del derivato **3** avviene con n-BuLi in tetraidrofurano anidro. In questo caso si verifica una reazione di metatesi tra il litio e il bromo legato all'anello aromatico in posizione 2 con la quale si genera *in situ* un "sale" di aril-litio che viene fatto reagire subito con un' $\alpha$ -chetoestere (etilpiruvato). Il principale inconveniente di questo passaggio sintetico è l'estrema sensibilità del sale di aril-litio alla presenza di acqua nell'ambiente di reazione.

La reazione di ciclizzazione (**e**) per ottenere composto **5** è stata adattata dalla reazione proposta da Comins per la sintesi della Camptotecina. Il composto di partenza **4** è trattato, nel primo step di reazione, con TMSI generato *in situ* da TMSCl e NaI. Tale reagente causa la formazione di un trimetilsililetere con liberazione di metil ioduro nella posizione benzilica e molto probabilmente anche sul gruppo funzionale ossidrilico<sup>40</sup>. Il successivo trattamento con acidi forti, nel secondo step di reazione, provoca l'idrolisi molto veloce dei silil-eteri e, di conseguenza, una ciclizzazione spontanea dell'intermedio per transesterificazione intramolecolare acido-catalizzata. Questa ciclizzazione è stata favorita per riscaldamento a riflusso, in modo da innescare termodinamicamente la transesterificazione intramolecolare che porta alla formazione del derivato lattonico.

La reazione è stata provata sia con HCl che con HBr concentrati. Si è notato che con HCl si favorisce la formazione del prodotto **48** derivante dalla disidratazione della funzione alcolica terziaria; questo è probabilmente dovuto al sensibile all'innalzamento della temperatura durante la reazione. L'utilizzo di HBr, invece, promuove la ciclizzazione a **5** a temperature più basse con conseguente diminuzione della formazione del sottoprodotto di disidratazione **48**. La miglior efficienza di HBr nel promuovere la reazione è probabilmente imputabile alla maggiore nucleofilicità dello ione bromuro, rispetto al cloruro, a cui corrisponde una maggior efficacia nella scissione dei silil-eteri anche se è noto che le energie di formazione dei legami Si-alogeno sono nella scala seguente: Si-F > Si-Cl > Si-Br > Si-I. Un altro fattore che si è preso in considerazione è stato il sistema solvente: nel caso della sintesi di Comins la reazione di ciclizzazione avviene su un substrato piridinico che presenta, quindi, una buona solubilità negli acidi concentrati. Il derivato **4**, invece, mostra una solubilità molto bassa nel

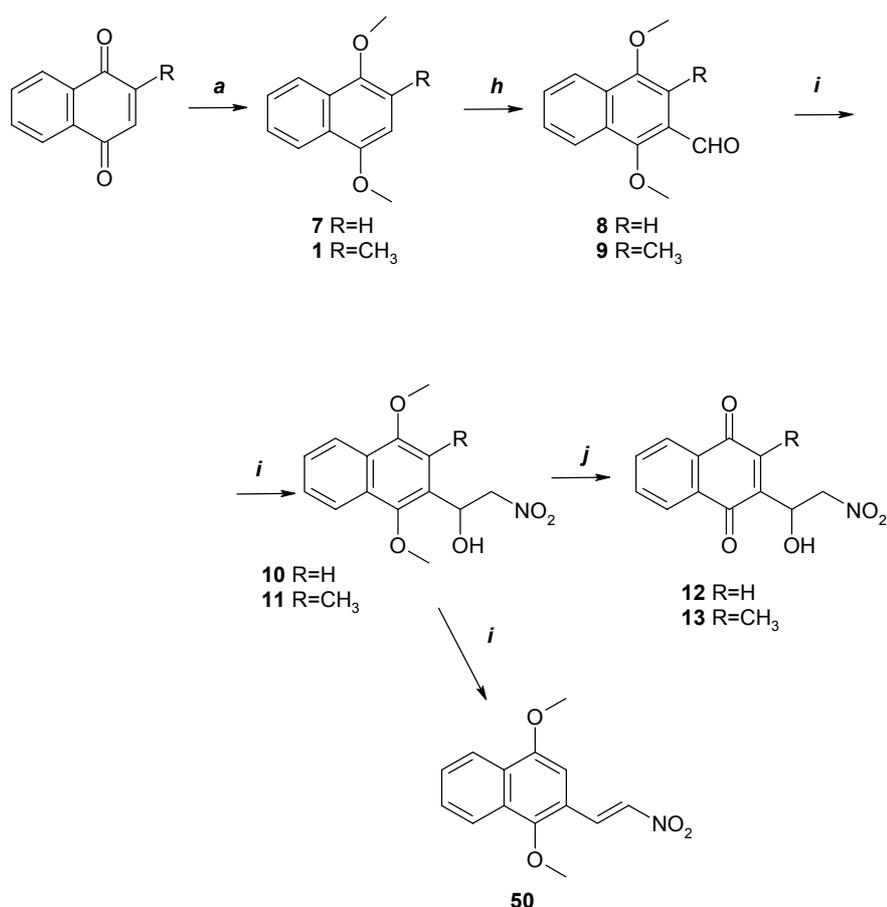
solvente acida, richiedendo l'uso di un cosolvente, l'acetonitrile, scelto per le sue caratteristiche di polarità e miscibilità con la fase acquosa.

Il prodotto finale 4-idrossi-4-metil-1,4-diidro-nafto[2,3-c]piran-3,5,10-trione **6** è stato ottenuto per demetilazione ossidativa (**f**) dell'intermedio **5** con C.A.N. in acetonitrile ed acqua.

La resa complessiva di questa sintesi è del 9% a partire dal prodotto commercialmente disponibile, 2-metil-1,4-naftochinone. La reazione che porta all'intermedio **4**, reazione di metatesi (resa del passaggio 55%), e la ciclizzazione (resa 48%) sono i passaggi che influiscono maggiormente sul valore di resa complessiva.

## 5.2 Sintesi di analoghi della alkannina-shikonina

Gli analoghi della Shikonina sintetizzati sono il 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-3-metil-1,4-naftochinone **11** e la serie di derivati della nitrobenzaldeide.



**Schema di sintesi 2:** **a)** Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/EtOAc, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>; **f)** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN); **h)** R=H, POCl<sub>3</sub>/DMF; R=CH<sub>3</sub> TiCl<sub>4</sub>, Cl<sub>2</sub>CHOCH<sub>3</sub> **i)** CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>; **j)** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **k)** Ac<sub>2</sub>O, TFA.

Gli analoghi della shikonina sono stati sintetizzati a partire dal 1,4-naftochinone e dal 2-metil-1,4-naftochinone.

Nel primo passaggio della sintesi si sono ridotte e protette le funzioni carboniliche mediante sodio ditionito e dimetilsolfato con una reazione tipo Williamson. Si sono ottenuti dapprima gli intermedi 46 e 47 per riduzione con sodio ditionito che sono poi stati sottoposti a metilazione con dimetilsolfato in metanolo per ottenere i composti **1** e **7**. La reazione avviene in presenza di sodio metilato per ottenere il fenato che reagisce con il dimetilsolfato nelle condizioni previste dalla reazione di Williamson.

La formilazione viene quindi condotta su questi composti. Inizialmente si era tentato di formilare entrambi i composti tramite la reazione di Vilsmeier ( $\text{POCl}_3/\text{DMF}$ ) ipotizzando che l'anello naftalenico fosse sufficientemente attivato in entrambi i substrati. Per il composto **1**, però, nonostante la presenza di due metossili e un metile, si è potuto constatare che tale reazione forniva l'aldeide desiderata solo in basse rese, dopo tempi molto lunghi e in presenza di un forte eccesso di miscela formilante.

Quindi, per ottenere il composto **8** si è proceduto formilare l'anello aromatico in posizione 2 tramite una reazione di Vilsmeier. Il reagente di Vilsmeier si forma per reazione tra un'amide sostituita (DMF) e il fosforo ossicloruro nell'ambiente di reazione. Questo reattivo dà un attacco elettrofilo su un'arene in posizione attivata per formare un addotto che viene decomposto in acqua per dare l'aldeide **8**.

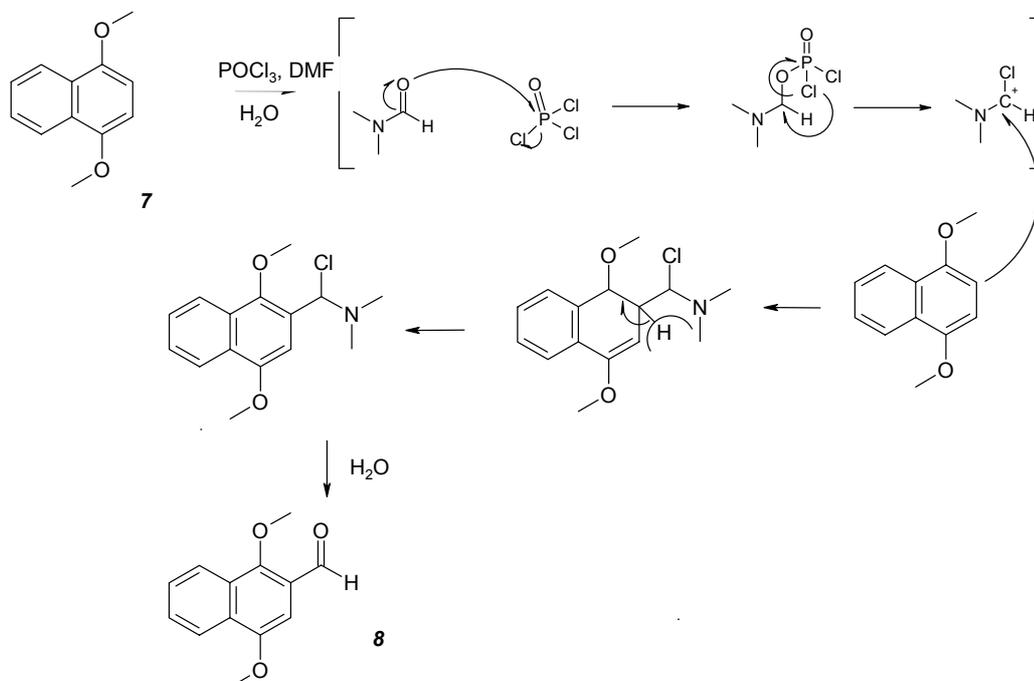


Figura 18 Meccanismo della reazione di Vilsmeier.<sup>41</sup>

Il composto **9** viene, invece, formilato regioselettivamente in posizione 2 dell'anello naftalenico mediante reazione con diclorometil-metiletere catalizzata da un acido di Lewis. La reazione è una formilazione da parte di un diclorometil-metiletere che formila un anello aromatico in presenza di catalisi di tipo Friedel-Crafts: come acido di Lewis si è scelto cloruro di titanio(IV). Si forma un intermedio aromatico-clorometil metil etere, emiacetale che fornisce rapidamente l'aldeide **9** in acqua. La posizione disponibile, per il composto **1** è quella in 2 e si ottiene così il composto **9** con una resa del 81%.

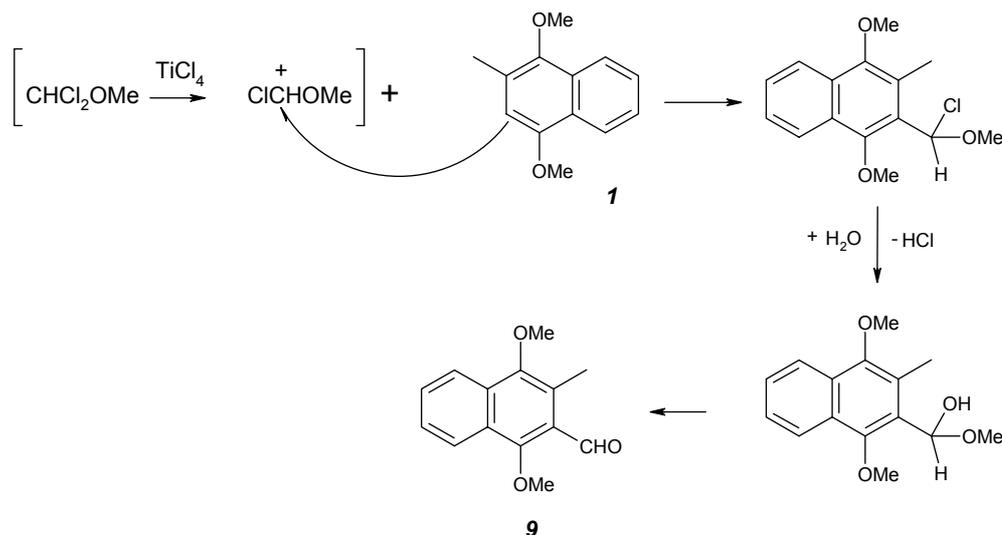
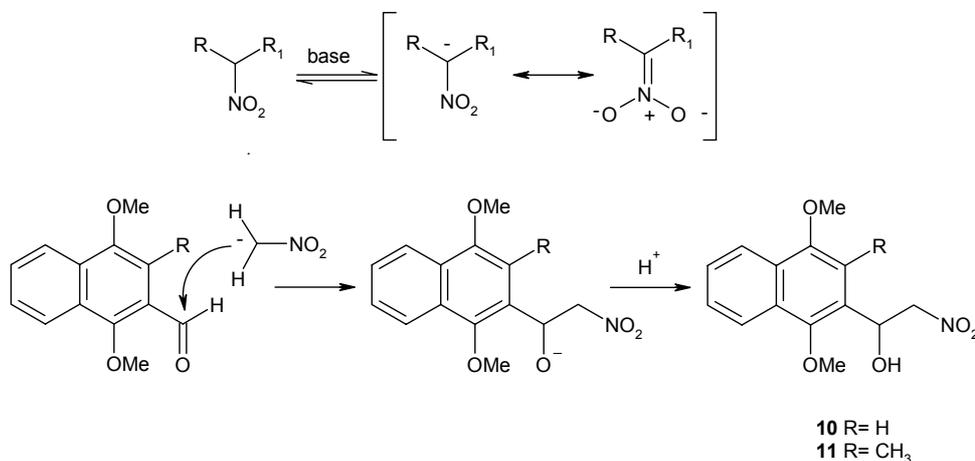
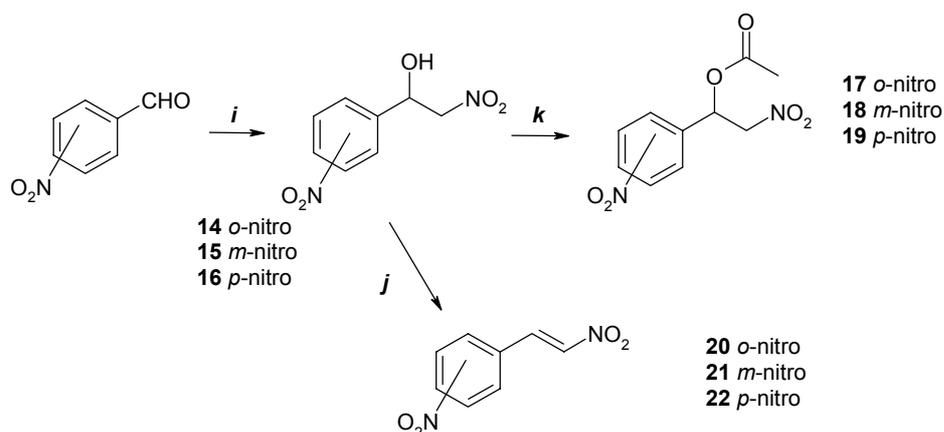


Figura 19 Meccanismo per la formilazione di **1**.<sup>41</sup>

Per ottenere i derivati **10** e **11**, l'aldeide introdotta nei composti **8** e **9** viene fatta reagire con nitrometano e una base forte e non nucleofila per dare un'addizione (1,2) al gruppo carbonilico (reazione di Henry). Come catalizzatore si è utilizzato il ter-butossido di potassio in ter-butanolo con THF come cosolvente per solubilizzare il substrato. Si ottiene così un carbanione per distacco di uno degli idrogeni acidi del nitrometano e questo dà un attacco nucleofilo sul carbonile aldeidico, come illustrato nello schema seguente:



I composti **10** e **11** così ottenuti vengono ossidati con C.A.N. per ottenere i derivati **12** e **13**. La sintesi della serie di derivati nitrobenzilici aventi una funzione nitroalcolica è stata eseguita in modo analogo a quanto sopra descritto a partire dalle nitrobenzaldeidi, commercialmente disponibili.

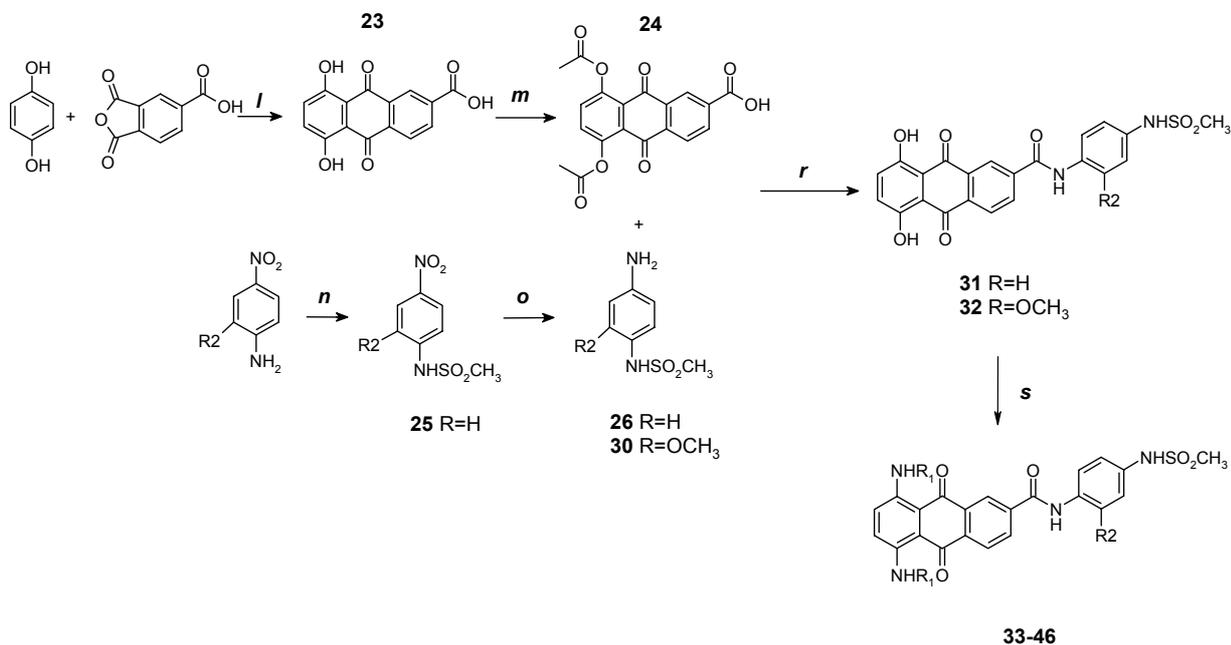


**Schema di sintesi 3:** i)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ; j)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; k)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , TFA.

L'addizione nitroaldolica viene qui applicata con una variante operativa che consiste nell'utilizzo di una base diversa, KOH invece di ter-butossido, in quantità stechiometrica e in metanolo invece che in THF/ter-butanolo. In queste nuove condizioni di reazione, e solo su questi composti, si ottengono rese più elevate e tempi di reazione ridotti; avendo anche il vantaggio di usare reagenti più comuni ed economici. Per i derivati nitrobenzenici si sono sintetizzati anche gli analoghi acetilati poiché in letteratura sono riportate osservazioni sulla maggior attività citotossica dell'acetil-shikonina rispetto alla forma con l'ossidrile libero<sup>39, 42</sup>. Si sono riscontrate difficoltà nelle reazioni di acetilazione, soprattutto riguardo all'isomero para, poiché la catena nitroalcolica si disidrata facilmente in ambiente fortemente acido.

I test biologici hanno evidenziato, per questi composti, una buona citotossicità ma il meccanismo di azione di tali derivati necessita ulteriori indagini in quanto l'attività *in vivo* si mostra a concentrazioni di farmaco inferiori alle concentrazioni necessarie per inibire la topoisomerasi I *in vitro*.

### 5.3 Gli ibridi tra mitoxantrone ed amsacrina



**Schema di sintesi 4:** I)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ; m)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; n)  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ , Pyr; o)  $\text{H}_2$ , Pd/C; r) 1)  $\text{SO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , 2)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . s) 1)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{R}_1\text{-NH}_2$ ; 2)  $\text{O}_2$ , rt.

Lo schema prevede la reazione tra l'anidride 1,2,4-benzentricarbossilica e l'idrochinone per ottenere l'acido 5,8-diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico **23**. Tale reazione è un'acilazione di Friedel-Craft tradizionale con  $\text{AlCl}_3$  in  $\text{NaCl}$  ad alta temperatura. L'addotto che si forma viene decomposto con acqua e si ottiene il derivato **23** con il 58% di resa.

In seguito i fenoli sono stati protetti mediante acetilazione acido-catalizzata con anidride acetica in presenza di tracce di acido solforico concentrato. Questa protezione si rende necessaria per la reazione successiva di formazione dell'ammide tra i derivati **26** e **30** e l'intermedio **24** che prevede la formazione del cloruro dell'acido carbossilico con cloruro di tionile.

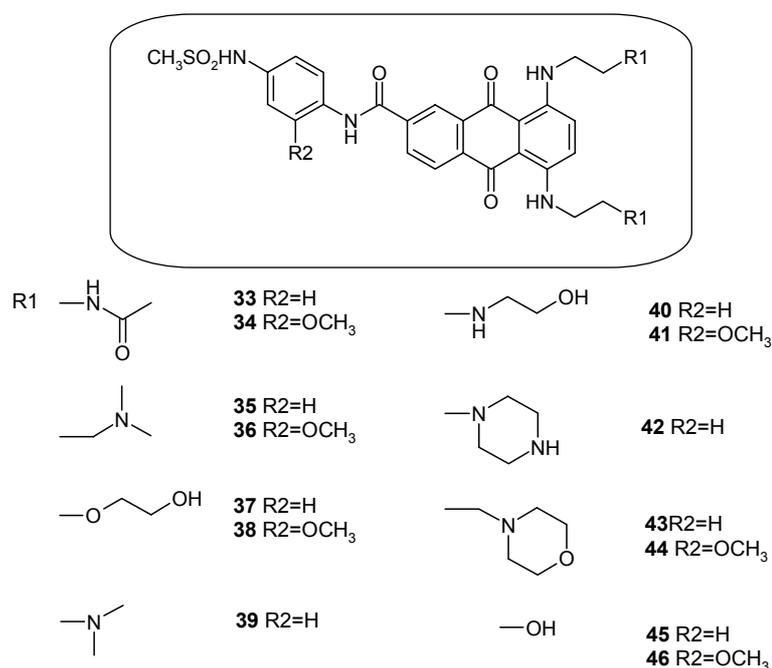
Le catene **26** (AMSA) o **30** (m-AMSA) sono state ottenute a partire dalla p-nitroanilina o dalla 3-metossi-4-nitroanilina seguendo una procedura simile a quella riportata in letteratura.

Per il composto **26** si è proceduto mediante formazione dell'ammide direttamente con metansolfonilcloruro e p-nitroanilina. Il composto **25** così ottenuto è stato quindi ridotto con  $\text{H}_2$  supportato da Pd su C in autoclave. Questa reazione dà il composto **26**.

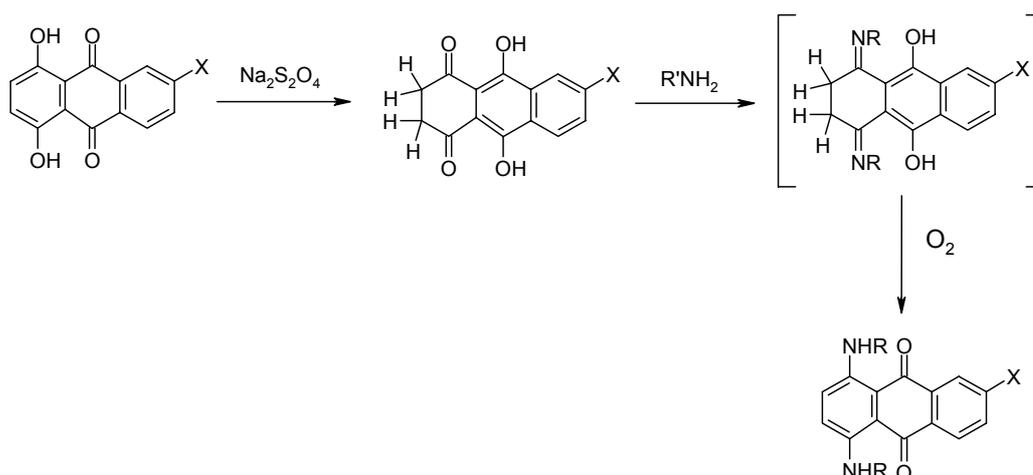
Per il composto **30**, invece, si è proceduto dapprima alla protezione della 2-metossi-4-nitroanilina acetilando l'ammina. Poi è stato ridotto il nitrogruppo con  $\text{H}_2$  e Pd/C e quindi

ottenuta la metansolfonilamide con metansolfonilcloruro. Il composto **30** è stato quindi ottenuto per idrolisi dell'acetammide con una resa complessiva del 62%.

La formazione dell'ammide nei derivati **31** e **32** è stata conseguita previa attivazione dell'acido **24** a cloruro con cloruro di tionile e successiva reazione del cloruro dell'acido con le catene amminiche **26** o **30** in presenza di trietilamina. Questo porta alla formazione degli intermedi **51** e **52** di cui si sono deprotetti i fenoli mediante idrolisi basica con potassio carbonato in acqua. La resa complessiva per la formazione degli intermedi **31** e **32** è, rispettivamente, 37% e 62%.



Gli intermedi **31** e **32** sono, quindi, sottoposti a riduzione di un legame dell'anello fenolico con sodio ditionito. Questa riduzione determina il riarrangiamento dei doppi legami aromatici con formazione di diidrossinaftalene negli anelli centrali. A questo punto avviene la sostituzione nucleofila delle catene amminiche con formazione di base di Schiff nelle posizioni 5,8 del nucleo. La successiva esposizione all'aria determina la riossidazione dell'anello chinonico ad antrachinone, spinto dalla maggiore energia di risonanza fornita da due anelli benzenici (36 kcal/mol) a confronto con quella di un nucleo naftalenico (61kcal/mol). Si formano così i derivati sostituiti in 5 e 8 del nucleo antrachinonico.



**Figura 20** Meccanismo della reazione di sostituzione dei fenoli con le catene.<sup>43</sup>

I prodotti, opportunamente purificati sono stati caratterizzati mediante NMR e spettrometria di massa. I derivati **31-46** sono stati quindi sottoposti a test di citotossicità su linee cellulari tumorali<sup>4</sup>.

| Composto     | 2008       | A375      | MCF-7     | HL-60     |
|--------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Mitoxantrone | 0.03±0.001 | 0.96±0.33 | 0.52±0.11 | 0.33±0.01 |
| Amsacrina    | 4.02±0.53  | 2.20±0.13 | 4.39±0.50 | 0.98±0.05 |
| 31           | 56±2       | >100      | 65±2      | 81±2      |
| 32           | 48.5±1.1   | 55.3±2.2  | 47.32±1.9 | 67.43±2.9 |
| 33           | 70±3       | >100      | 82.2±2    | >100      |
| 34           | N.D.       | N.D.      | N.D.      | N.D.      |
| 35           | 6.3±3.0    | 5.3±1.1   | 6.6±1.9   | 4.6±1.0   |
| 36           | 2.25±2.2   | 1.98±1.3  | 3.5±2.3   | 0.99±0.5  |
| 37           | >100       | >100      | >100      | >100      |
| 38           | N.D.       | N.D.      | N.D.      | N.D.      |
| 39           | 9.4±2.4    | 5.34±2.1  | 7.41±3.3  | 6.2±2.2   |
| 40           | 61±4       | >100      | 53±2      | 69±2      |
| 41           | 43.2±3.1   | 51.32±2.7 | 61.31±2.0 | 62.21±1.4 |
| 42           | 57±2       | >100      | 68±3      | 72±3      |
| 43           | >100       | >100      | >100      | >100      |
| 44           | N.D.       | N.D.      | N.D.      | N.D.      |
| 45           | 67±2       | >100      | 59±3      | 63±3      |
| 46           | 78.1±2.0   | 84.31±2.3 | 94.27±2.1 | 89.34±3.6 |

I valori di  $IC_{50}$  sono stati calcolati usando l'analisi porbit ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$  test). Le cellule ( $3-8 \cdot 10^4 \cdot ml^{-1}$ ) sono state trattate per 72 ore con concentrazioni crescenti dei composti esaminati. S.D. = deviazione standard. Gli acronimi indicano: 2008 cancro ovarico umano, A375 melanoma umano maligno, MCF-7 carcinoma polmonare umano, HL-60 leucemia premyelocitica umana.

<sup>4</sup> Citotossicità: Laboratorio della Dr.ssa Marzano del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova.

DNA Binding e inibizione della topoisomerasi II: Laboratorio della Dr.ssa Sissi del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova.

Test condotti sulla Topoisomerasi I non rivelano nessuna attività in nessuno di questi composti.

Test condotti sulla Topoisomerasi II mostrano che tali composti sono più attivi su tale enzima e, in particolare, **35**.

|  | Composti  |           |           |           |           |           |           |               |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
|  | <b>31</b> | <b>33</b> | <b>35</b> | <b>37</b> | <b>40</b> | <b>42</b> | <b>43</b> | <b>m-AMSA</b> |
| <b>Inibizione della Topoisomerasi II</b> | -         | -         | +         | -         | -         | -         | -         | +             |

*Saggi di rilassamento. Simboli: +, 100% inibizione della topoisomerasi II a concentrazioni  $\geq 5 \mu\text{M}$ ; -, 0% inibizione in tutte le concentrazioni provate (5-25  $\mu\text{M}$ ).*

Ulteriori caratterizzazioni dell'attività e del meccanismo d'azione di tali composti, particolarmente su linee cellulari resistenti all'amsacrina o al mitoxantrone sono ancora in corso. Ma da risultati preliminari si vede che la citotossicità è dell'ordine del micromolare mentre, per quanto riguarda il meccanismo d'azione, sembra che l'isoforma beta della topoisomerasi II sia più sensibile all'inibizione da parte di tali molecole.



## **6. Bibliografia**

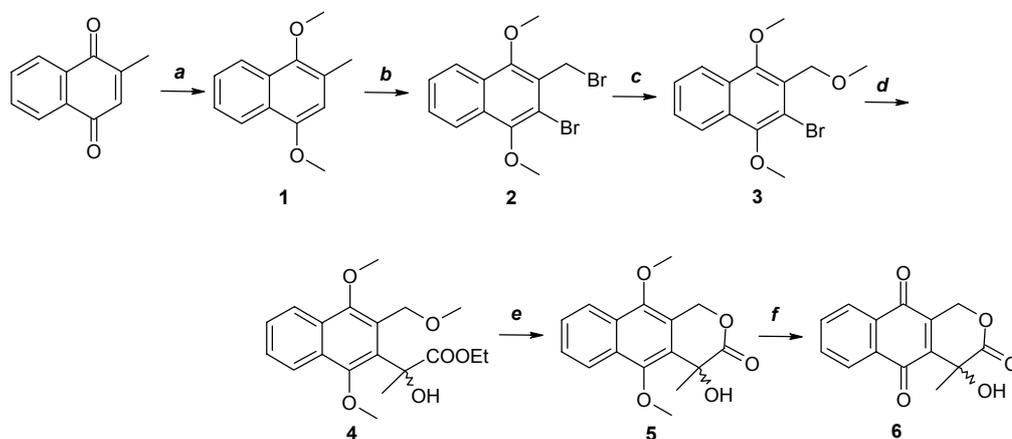
## Bibliografia

1. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Biochemistry. Fifth Edition. In Co., W. H. F. a., Ed. 2002.
2. Micheli, A.; Mugno, E.; Krogh, V.; Quinn, M. J.; Coleman, M.; Hakulinen, T.; Gatta, G.; Berrino, F.; Capocaccia, R. Cancer Prevalence in European registry areas *Annals of Oncology* **2002**, 13, 840-865.
3. Gasser, S.; Raulet, D. The DNA damage response, immunity and cancer. *Seminars in Cancer Biology, Natural killer cells in cancer* **2006**, 16, 344-347.
4. Karp, G. *Biologia cellulare e molecolare* EDISES: 1998.
5. Bishop, J. M.; Weinberg, R. A. Molecular Oncology *Scientific American* **1996**.
6. Vazquez, A.; Bond, E. E.; Levine, A. J.; Bond, G. L. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, 7, 979-987.
7. Kufe, D. W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R. R.; Bast, R. C. J.; Gansler, T. S.; Holland, J. F.; Frei, E. *Cancer Medicine*. 2003; Vol. 6.
8. Foye, W. O.; Williams, D. A.; Lemke, T. L. *Foye's Principi di Chimica Farmaceutica*. Piccin: 2005.
9. Adams, R. L. P.; Knowler, J. T.; Leader, D. P. In *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 1992; Chapman&Hall, Ed. 1992.
10. PDBID: 425D. (01/2009).
11. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *I Principi di Biochimica di Lehninger* Zanichelli.
12. Li, T. K.; Liu, L. F. Tumor Cell Death Induced by Topoisomerase-Targeting Drugs. *Annual Reviews Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 53-77.
13. Pindur, U.; Lenster, T. Antitumor drug Design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I *Pharmazie* **1998**, 53, 79-86.
14. Wang, J. C. CELLULAR ROLES OF DNA TOPOISOMERASES: A MOLECULAR PERSPECTIVE. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002**, 3, 430-440.
15. Berger, J. M. Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1998**, 1400, 3-18.
16. Wang, J. C. DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **1996**, 635-692.
17. Forterre, P.; Gribaldo, S.; Gadelle, D.; Serre, M. C. Origin and Evolution of DNA Topoisomerases. *Biochimie* **2007**.
18. Redinbo, M. R.; Stewart, L.; Kuhn, P.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. J. Crystal Structures of Human Topoisomerase I in Covalent and Noncovalent Complexes with DNA. *Science* **1998**, 279, 1504-1513.
19. Stewart, L.; Redinbo, M. R.; Qiu, X.; Hol, W. G. J.; Champoux, J. J. A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. *Science* **1998**, 279, 1534-1541.
20. Wei, H.; Ruthenberg, A. J.; Bechis, S. K.; Verdine, G. L. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **2005**, 280, 37041-7.
21. Berger, J. M.; Gamblin, S. J.; Harrison, S. C.; Wang, J. C. Structure and Mechanism of DNA topoisomerases II *Nature* **1996**, 379, 225-232.
22. Travers, A. *DNA-Protein Interactions*. Springer Berlin Heidelberg New York ed.; 1993; p 192.
23. Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2007**, 623, 3-13.
24. LERMAN, L. S. The structure of the DNA-acridine complex. *PNAS* **1963**, 49, 94-102.
25. Huggins, C. C.; Yang, N. C. Induction and extinction of mammary cancer. A striking effect of hydrocarbons permits analysis of mechanisms of causes and cures of cancer. *Science* **1962**, 137, 257-262.

26. Hendry, L. B.; Mahesh, V. B.; Bransome, E. D. J.; Ewing, D. E. Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2007**, 623, 53-71.
27. Snyder, R. D.; Ewing, D.; Hendry, L. B. DNA intercalative potential of marked drugs testing positive in *in vitro* cytogenetics assays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2006**, 609, 47-56.
28. Topcu, Z. DNA Topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J. Clin. Pharm. Therap.* **2001**, 26, 405-416.
29. Li, T.-K.; Liu, L. F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2001**, 41, 53-77.
30. Vassilios P. Papageorgiou; Assimopoulou, A. N.; Couladouros, E. A.; Hepworth, D.; Nicolaou, K. C. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. In 1999; Vol. 38, pp 270-301.
31. Du, W. Towards new anticancer drugs: a decade of advances in synthesis of camptothecins and related alkaloids. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8649-8687.
32. Dallavalle, S.; Giannini, G.; Alloatti, D.; Casati, A.; Marastoni, E.; Musso, L.; Merlini, L.; Morini, G.; Penco, S.; Pisano, C.; Tinelli, S.; DeCesare, M.; Beretta, G. L.; Zunino, F. Synthesis and Cytotoxic Activity of Polyamine Analogues of Camptothecin. **2006**, 49, 5177-5186.
33. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **2006**, 6, 789-802.
34. Hecht, S. M. Camptothecin: Roles of the D and E Rings in Binding to the Topoisomerase I-DNA Covalent Binary Complex. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **2005**, 5, 353-362.
35. Nagarajan, M.; Morrell, A.; Ioanoviciu, A.; Antony, S.; Kohlhagen, G.; Agama, K.; Hollingshead, M.; Pommier, Y.; Cushman, M. Synthesis and Evaluation of Indenoisoquinoline Topoisomerase I Inhibitors Substituted with Nitrogen Heterocycles. **2006**, 49, 6283-6289.
36. Staker, B. L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin, A. B., Jr.; Stewart, L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *PNAS* **2002**, 99, 15387-15392.
37. Pommier, Y.; Marchand, C. Interfacial Inhibitors of Protein-Nucleic Acid Interactions. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **2005**, 5, 421-429.
38. Staker, B. L.; Feese, M. D.; Cushman, M.; Pommier, Y.; Zembower, D.; Stewart, L.; Burgin, A. B. Structures of Three Classes of Anticancer Agents Bound to the Human Topoisomerase I-DNA Covalent Complex. In *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005; Vol. 48, pp 2336-2345.
39. Papageorgiou, V. P.; Assimopoulou, A. N.; Couladouros, E. A.; Hepworth, D.; Nicolaou, K. C. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. In 1999; Vol. 38, pp 270-301.
40. Kondo, Y.; Asai, M.; Miura, T.; Uchiyama, M.; Sakamoto, T. Mesityllithium as a Reagent for Chemoselective Halogen-Lithium Exchange Reaction. *Org. Lett.* **2001**, 3, 13-15.
41. Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*. 6th Edition ed.; Wiley: New York, 2007; p pg 724, 726.
42. Plyta, Z. F.; Li, T.; Papageorgiou, V. P.; Mellidis, A. S.; Assimopoulou, A. N.; Pitsinos, E. N.; Couladouros, E. A. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, 8, 3385-3390.
43. Bayer, O. *Methoden der Organische Chemie, (Houben weyl)*. G. Thieme Verlag: Stuttgart, 1977; Vol. VII/3c p90.

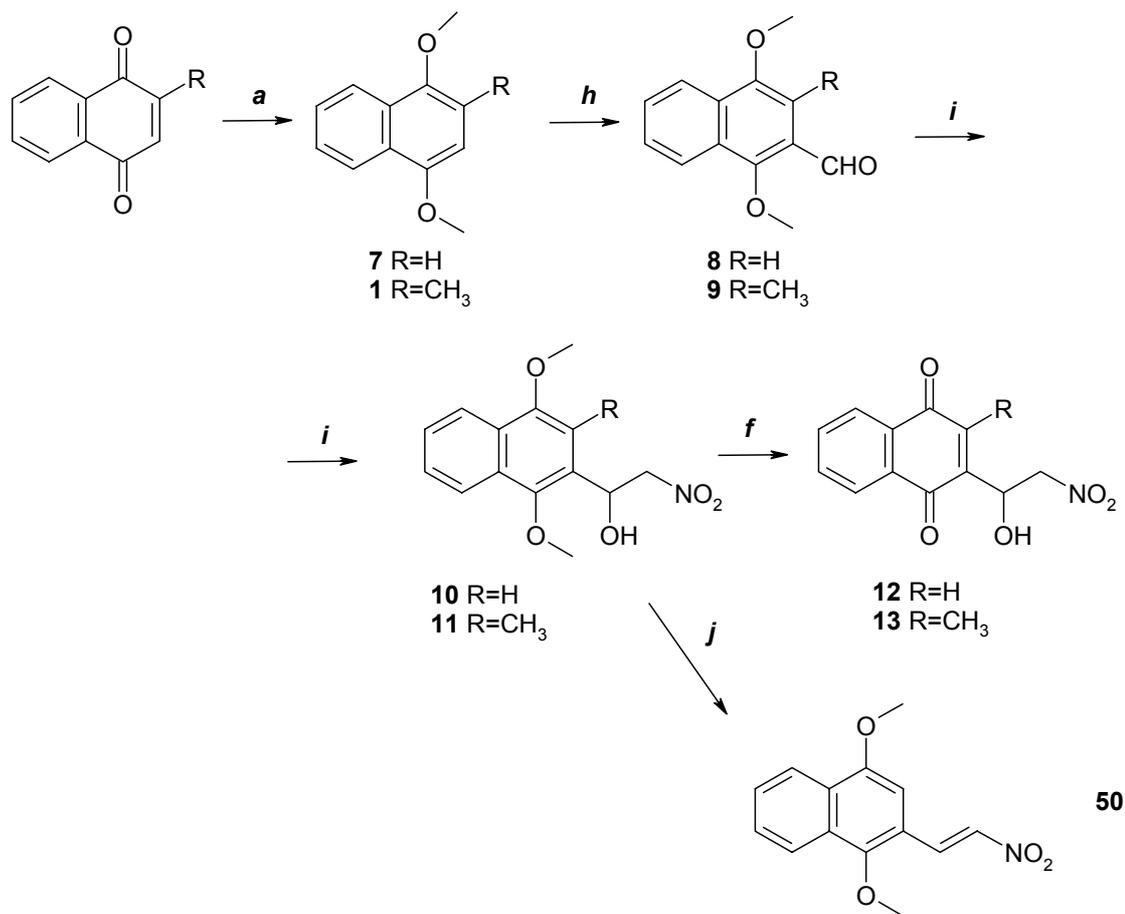
## 6.1 Allegato I

### 6.1.1 Schema di sintesi 1:



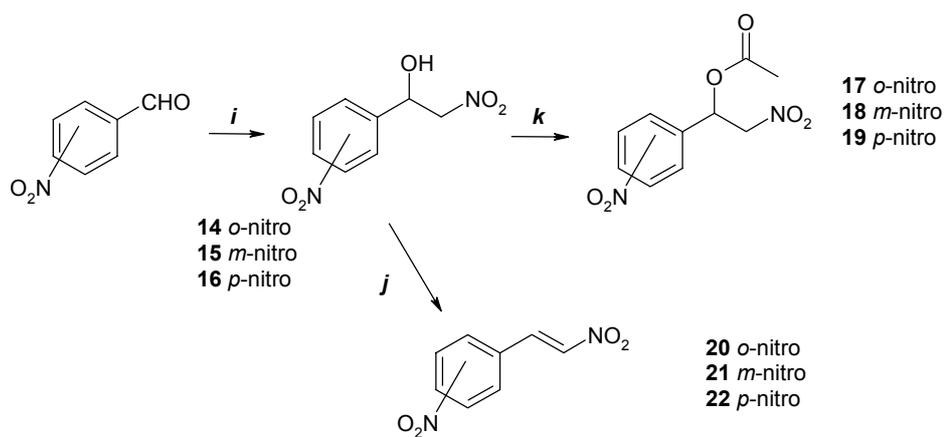
**a)**  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{EtOAc}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$ ; **b)** NBS,  $\text{CCl}_4$  rif 3h, NBS, dibenzoilperossido rif 3,5h; **c)**  $\text{Na}^+\text{CH}_3\text{O}^-$  rif 3,5h; **d)** 1)  $n\text{-BuLi}$ , THF  $-80^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{CH}_3\text{COCOOEt}$  3)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat; **e)** 1)  $\text{TMSCl}/\text{NaI}$  ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); 2)  $\text{HCl}$  5M ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ); **f)**  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ).

## 6.1.2 Schema di sintesi 2:



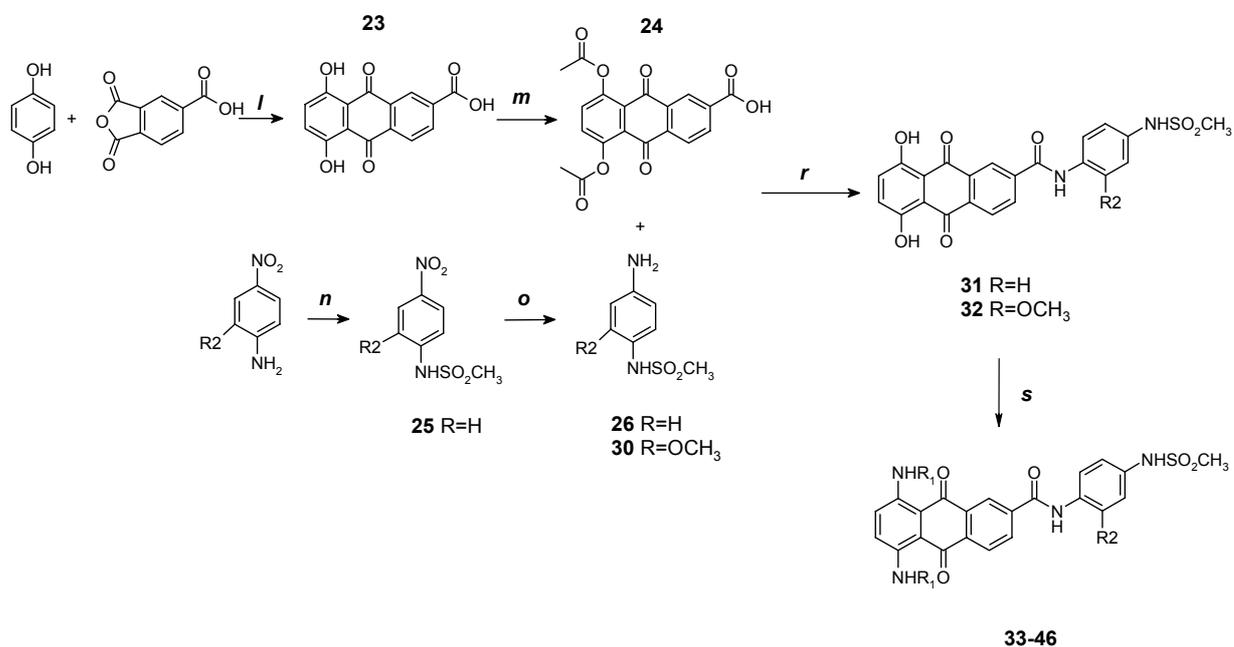
**a)** Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/EtOAc, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>; **f)** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN); **h)** R=H, POCl<sub>3</sub>/DMF; R=CH<sub>3</sub> TiCl<sub>4</sub>, Cl<sub>2</sub>CHOCH<sub>3</sub> **i)** CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>; **j)** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **k)** Ac<sub>2</sub>O, TFA.

## 6.1.3 Schema di sintesi 3:

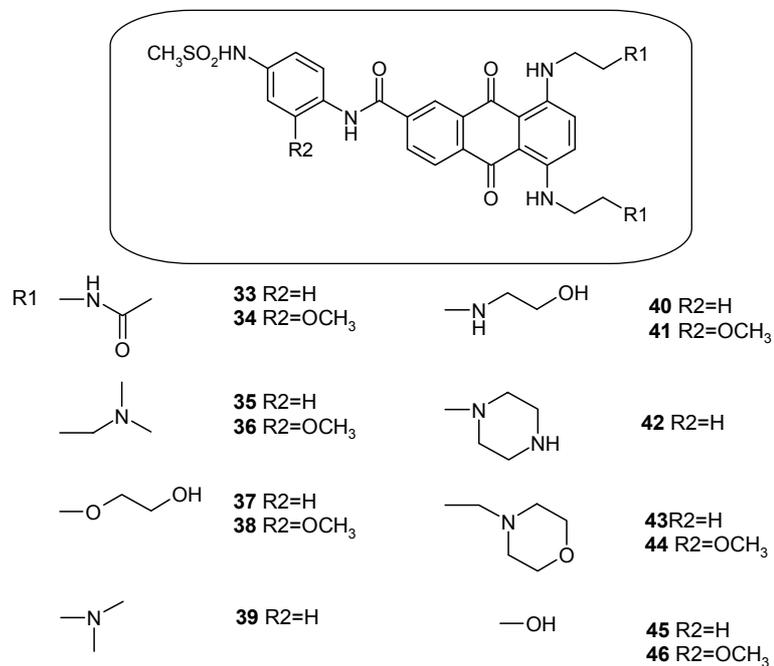


i)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ; j)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; k)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , TFA.

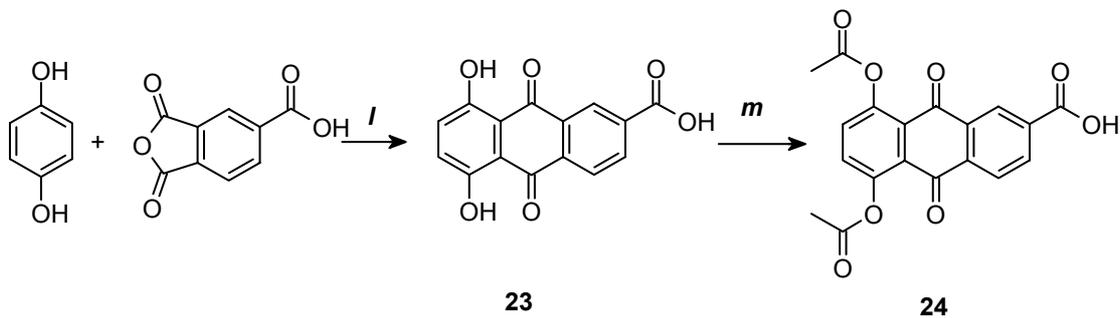
## 6.1.4 Schema di sintesi 4:



**l)** AlCl<sub>3</sub>, NaCl; **m)** Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **n)** CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, Pyr; **o)** H<sub>2</sub>, Pd/C; **r)** 1) SO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, 2) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.  
**s)** 1) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>; 2) O<sub>2</sub>, rt.

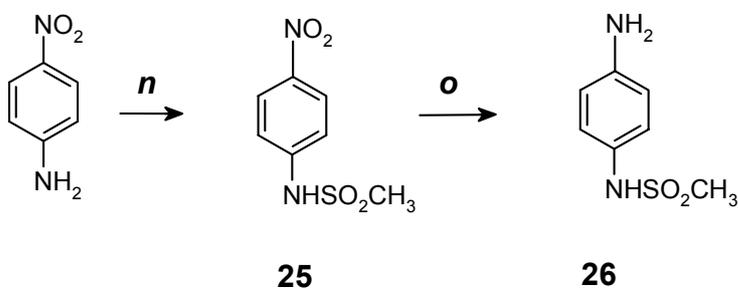


6.1.4.1 Schema di sintesi di 24:



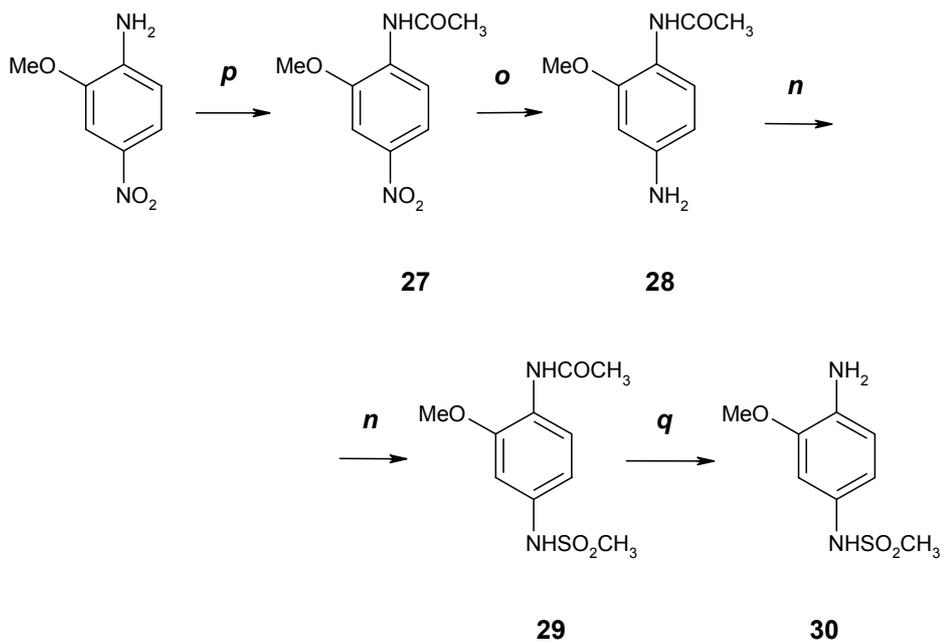
**l)** AlCl<sub>3</sub>, NaCl; **m)** Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

6.1.4.2 Preparazione di 26:

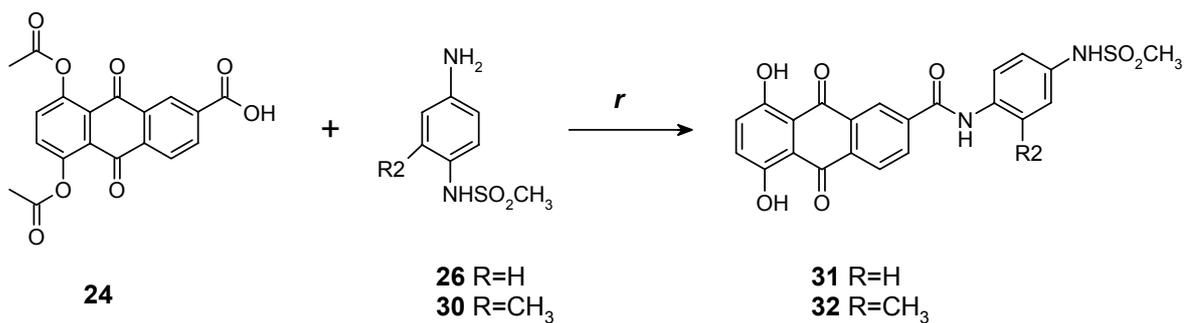
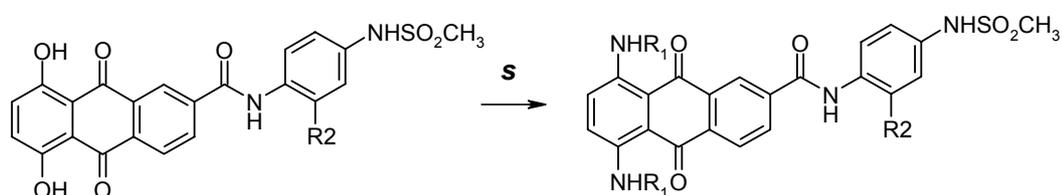
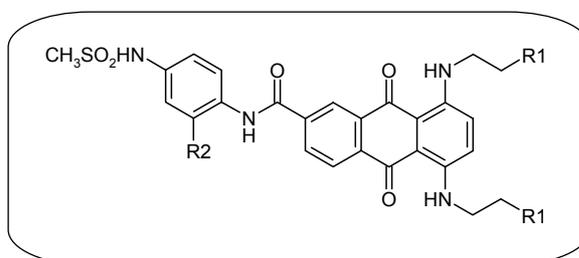


**n)** CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, Pyr; **o)** H<sub>2</sub>, Pd/C;

6.1.4.3 Preparazione di 30

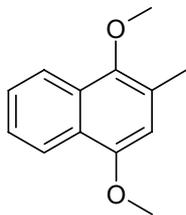


**n)** CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl, Pyr; **o)** H<sub>2</sub>, Pd/C; **p)** CH<sub>3</sub>COOH, Ac<sub>2</sub>O; **q)** HCl

6.1.4.4 Sintesi degli intermedi 31 e 32:r) 1) SO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, 2) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.6.1.4.5 Sostituzione delle catene:s) 1) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>-NH<sub>2</sub>; 2) O<sub>2</sub>, rt .

|    |   |  |   |
|----|---|--|---|
| R1 | <b>33</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>34</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |  | <b>40</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>41</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |
|    | <b>35</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>36</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |  | <b>42</b> R <sub>2</sub> =H   |
|    | <b>37</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>38</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |  | <b>43</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>44</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |
|    | <b>39</b> R <sub>2</sub> =H   |  | <b>45</b> R <sub>2</sub> =H<br><b>46</b> R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |

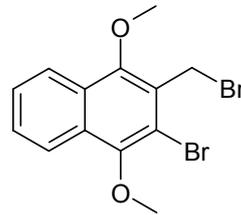
6.2 Allegato II:



1

1,4-Dimetossi-2-metil-naftalene

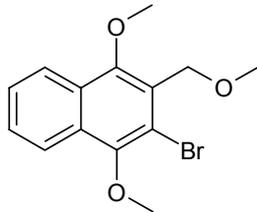
PM = 202,26  
C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>



2

2-bromo-3-bromometil-1,4-dimetossi-naftalene

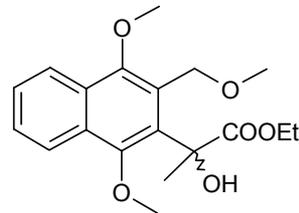
PM = 360,05  
C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



3

2-bromo-1,4-dimetossi-3-metossimetil-naftalene

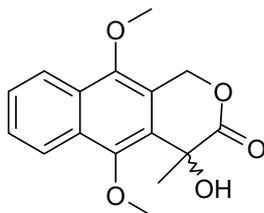
PM = 311,18  
C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>3</sub>



4

3-(1,4-dimetossi-3-metossimetil-naftalen-2-il)-2-idrossi-propionato di etile

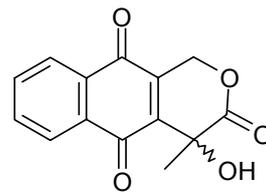
PM = 348,40  
C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>



5

4-idrossi-5,10-dimetossi-4-metil-1,4-diidro-benzo[g]isocromen-3-one

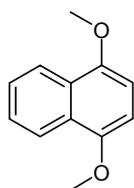
PM = 288,30  
C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>



6

4-idrossi-4-metil-1,4-diidro-benzo[g]isocromene-3,5,10-trione

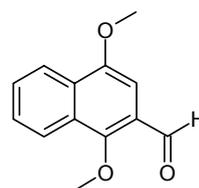
PM = 258,23  
C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>



**7**

1,4-Dimetossi-naftalene

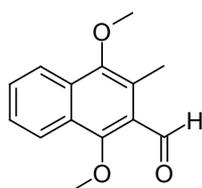
PM =188,23  
C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>



**8**

1,4-Dimetossi naftalenaldeide

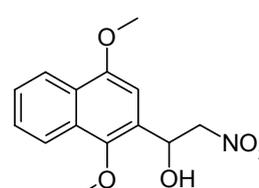
PM =216,24  
C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>



**9**

1,4-Dimetossi-3-metil-naftaldeide

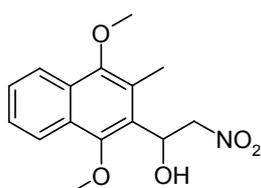
PM =230,27  
C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>



**10**

1,4-dimetossi-2-(1-idrossi-2-nitroetil)-naftalene

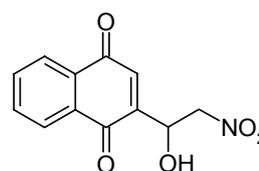
PM =277,28  
C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>



**11**

1,4-dimetossi-2-(1-idrossi-2-nitroetil)-  
3-metilnaftalene

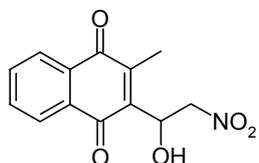
PM =291,31  
C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>



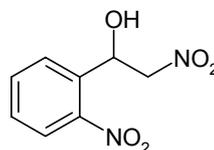
**12**

2-(1-idrossi-2-nitroetil)-1,4-naftochinone

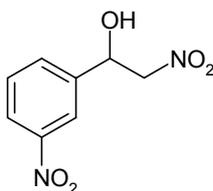
PM =247,21  
C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>



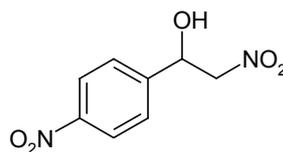
**13**  
 2-(1-idrossi-2-nitroetil)-  
 3-metil-1,4-naftochinone  
 PM = 261,24  
 $C_{13}H_{11}NO_5$



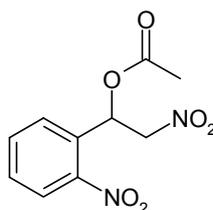
**14**  
 2-(1-idrossi-2-nitroetil)  
 -1-nitrobenzene  
 PM = 212,16  
 $C_8H_8N_2O_5$



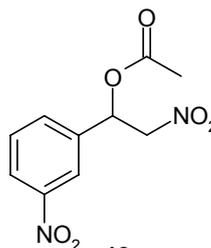
**15**  
 3-(1-idrossi-2-nitroetil)  
 -1-nitrobenzene  
 PM = 212,16  
 $C_8H_8N_2O_5$



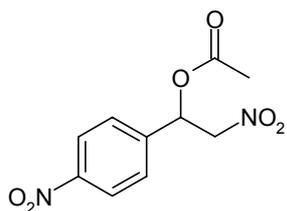
**16**  
 4-(1-idrossi-2-nitroetil)  
 -1-nitrobenzene  
 PM = 212,16  
 $C_8H_8N_2O_5$



**17**  
 2-(1-acetossi-2-nitroetil)  
 -1-nitrobenzene  
 PM = 254,20  
 $C_{10}H_{10}N_2O_6$



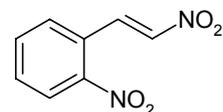
**18**  
 3-(1-acetossi-2-nitroetil)  
 -1-nitrobenzene  
 PM = 254,20  
 $C_{10}H_{10}N_2O_6$



**19**

4-(1-acetossi-2-nitroetil)  
-1-nitrobenzene

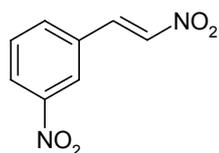
PM = 254,20  
C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>



**20**

1-nitro-2-((E)-2-  
nitrovinil)benzene

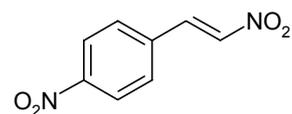
PM = 194,15  
C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



**21**

1-nitro-3-((E)-2-  
nitrovinil)benzene

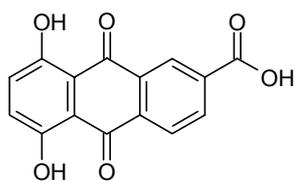
PM = 194,15  
C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



**22**

1-nitro-4-((E)-2-  
nitrovinil)benzene

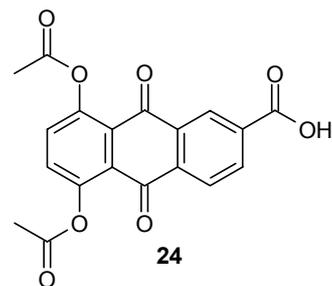
PM = 194,15  
C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



**23**

Acido 5,8 diidrossi-antracen  
-9,10-dione-2-carbossilico

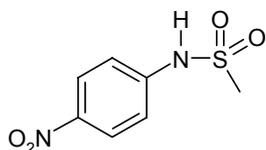
PM = 284,23  
C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>



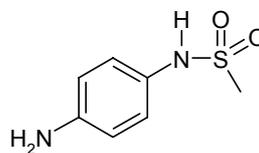
**24**

Acido 5,8 diacetossi-antracen  
-9,10-dione-2-carbossilico

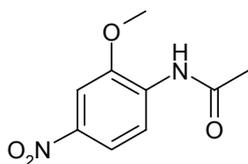
PM = 368,30  
C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>



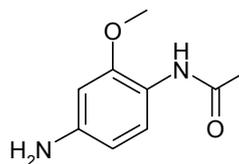
**25**  
N-(4-nitro-fenil)-metan  
sulfonamide  
PM = 216,22  
C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S



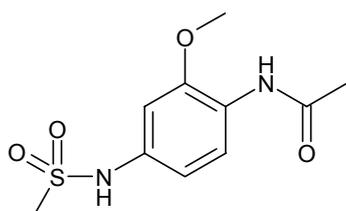
**26**  
N-(4-ammino-fenil)-metan  
sulfonamide  
PM = 186,23  
C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S



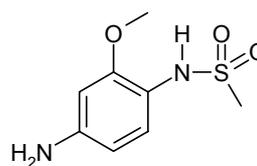
**27**  
N-(2-metossi-4-nitro-fenil)-  
acetammide  
PM = 210,19  
C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>



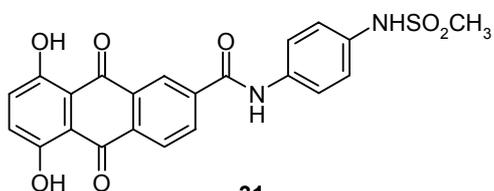
**28**  
N-(2-metossi-4-amminofenil)-  
acetammide  
PM = 180,21  
C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**29**  
N-[2-metossi-4-(metansolfonil)-  
aminofenil]-acetammide  
PM = 258,30  
C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S



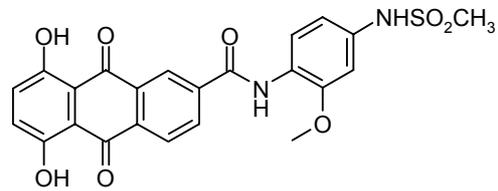
**30**  
N-(4-amino-3-metossifenil)-  
metansolfonamide  
PM = 216,26  
C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S



**31**

4-(metansolfonilammino)fenil-ammido dell'acido 5,8 diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

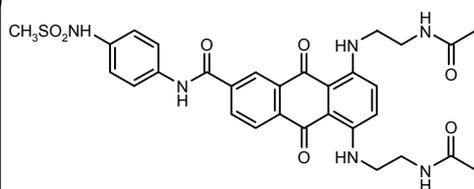
PM =452,45  
C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S



**32**

[2-metossi-4-(metansolfonilammino)fenil]-ammido dell'acido 5,8 diidrossi-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

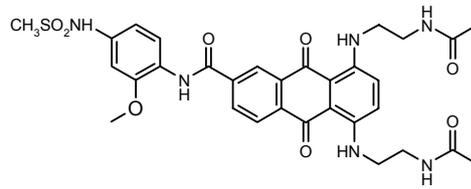
PM = 482,47  
C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S



**33**

(4-metansolfonilaminofenil)-ammido dell'acido 5,8-bis-(3-acetilamino-etilamino)-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

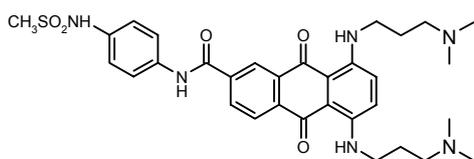
PM =620,69  
C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S



**34**

(4-metansolfonilammino-2-metossifenil)-ammido dell'acido 5,8-bis-(3-acetilamino-etilamino)-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

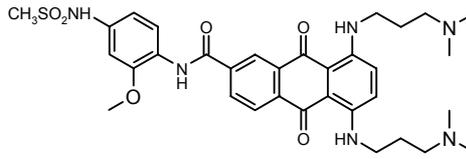
PM =650,72  
C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S



**35**

(4-metansolfonilaminofenil)-ammido dell'acido 5,8-bis-(3-N-dimetilamino-propilamino)-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

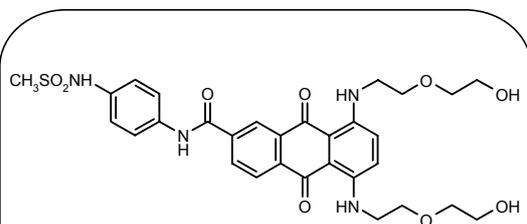
PM =620,78  
C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S



**36**

(4-metansolfonilammino-2-metossifenil)-ammido dell'acido 5,8-bis-(3-N-dimetilamino-propilamino)-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

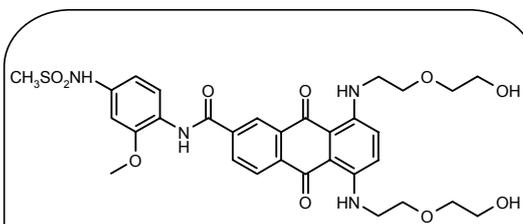
PM =650,80  
C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S



**37**

(4-metansulfonilaminofenil)-ammide dell'acido  
5,8-bis-(2-(idrossietossi)etilammino)  
-antracen-9,10-dione  
-2-carbossilico

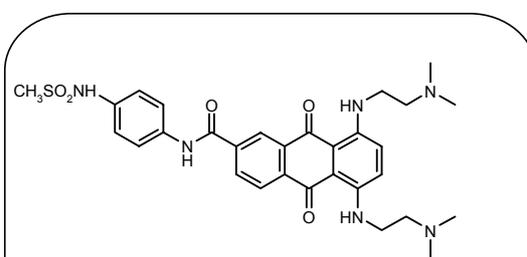
PM =626,69  
C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S



**38**

(4-metansulfonilamino-2-metossi-fenil)-ammide  
dell'acido 5,8-bis-(2-(idrossietossi)etilammino)  
-antracen-9,10-dione  
-2-carbossilico

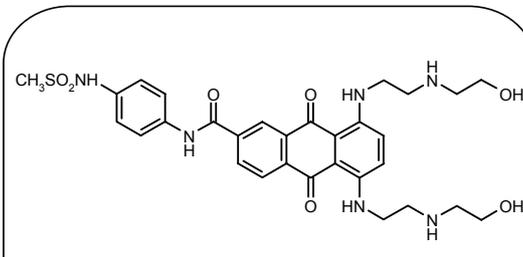
PM =656,72  
C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S



**39**

(4-metansulfonilaminofenil)-ammide dell'acido  
5,8-bis-(2-N,N-dimetilammino-etilammino)  
-antracen-9,10-dione  
-2-carbossilico

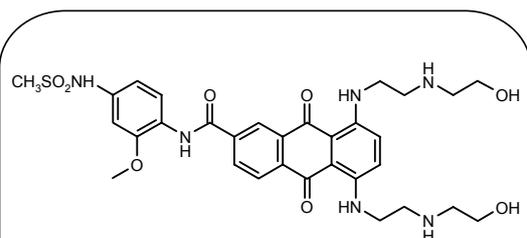
PM =592,74  
C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S



**40**

(4-metansulfonilamino-fenil)-ammide  
dell'acido 5,8-bis-(2-(2idrossietilammino)etilammino)  
-antracen-9,10-dione-2-carbossilico

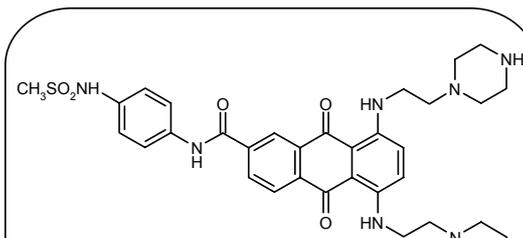
PM =624,74  
C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S



**41**

(4-metansulfonilamino-2-metossifenil)-ammide  
dell'acido 5,8-bis-(2-(2idrossietilammino)  
etilammino)-antracen-9,10-dione  
-2-carbossilico

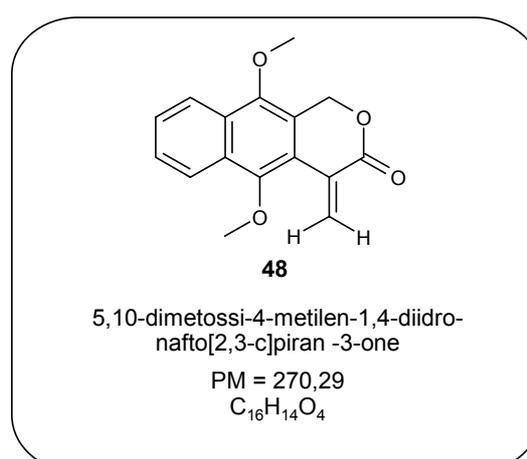
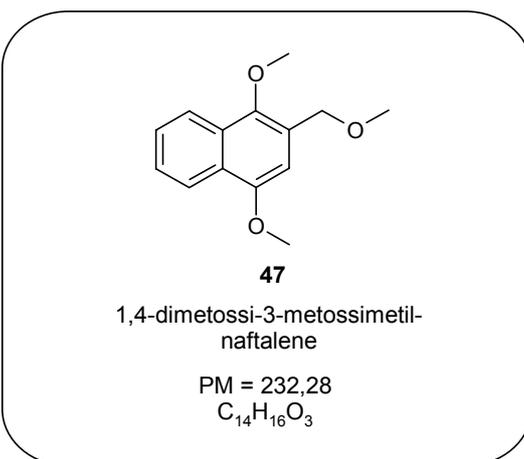
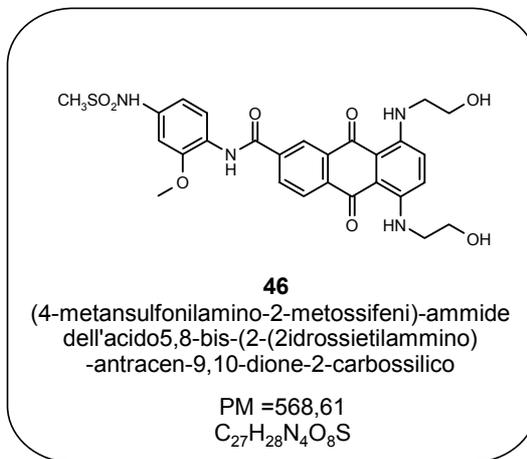
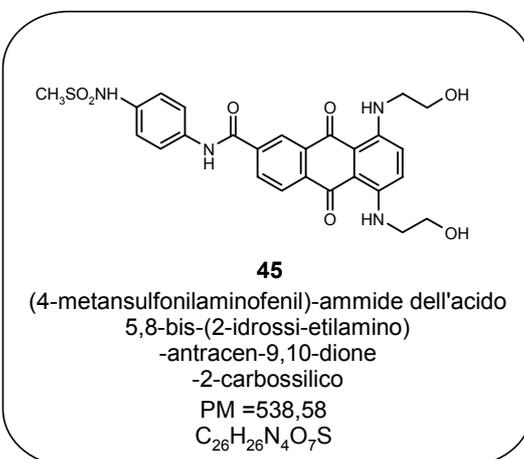
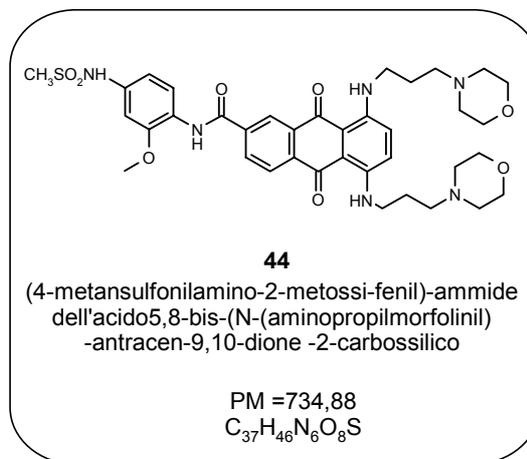
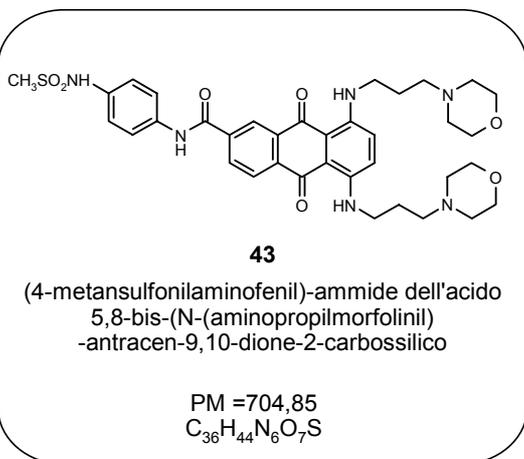
PM =654,76  
C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S

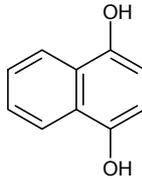


**42**

(4-metansulfonilamino-fenil)-ammide  
dell'acido 5,8-bis-(2-aminoetil)piperazinil)  
-antracen-9,10-dione  
-2-carbossilico

PM =674,83  
C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>S

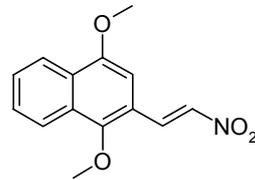




**49**

1,4-Diidrossi-naftalene

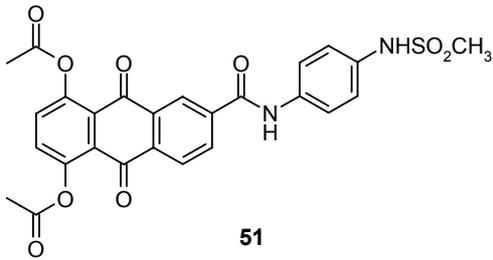
PM =160,17  
C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>



**50**

1,4-dimetossi-2-(2-nitro-1-etilen)-naftalene

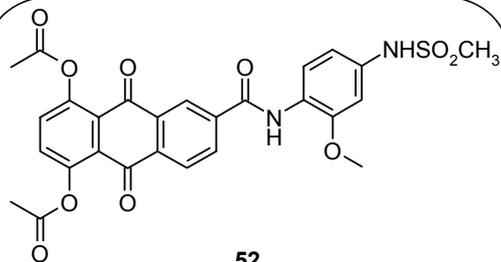
PM =259,26  
C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>



**51**

N-(4-metansulfonilamino-fenil)-ammide  
dell'acido 5,8-diacetossi-antracen-  
9,10-dione-2-carbossilico

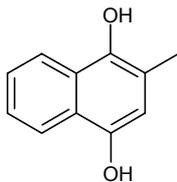
PM =536,52  
C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S



**52**

N-(2-metossi-4-metansulfonilamino  
-fenil)-ammide dell'acido 5,8-diacetossi-antracen-  
9,10-dione-2-carbossilico

PM =566,55  
C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S



**53**

1,4-Diidrossi-2-metil-naftalene

PM =174,20  
C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>