



Università degli Studi di Palermo



Ministero dell'Università e della Ricerca
Scientifica e Tecnologica

Facoltà di Farmacia

Dottorato in Scienze Farmaceutiche

Bando A.A. 2011-2013 (CICLO XXIV) SSD:CHIM/08

**Sintesi ed Attività Biologica di nuovi derivati
Triazenici e Triazinici**

Dott. Alessia Alfio

Tutor

Chiar.mo Prof. Anna Maria Almerico

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Girolamo Cirrincione

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
(STEBICEF)

INDICE

1.	Introduzione	pag.	1
	a. Caratterizzazione delle cellule tumorali	pag.	3
	i. Autosufficienza dei fattori di crescita	pag.	3
	ii. Insensibilità agli inibitori della crescita	pag.	4
	iii. Resistenza all'apoptosi	pag.	5
	iv. Illimitato potenziale replicativi	pag.	6
	v. Angiogenesi	pag.	6
	vi. Invasione tissutale e metastasi	pag.	7
2.	Farmaci antitumorali	pag.	8
3.	Triazeni e bioisosteri come farmaci antitumorali	pag.	15
4.	Scopo della tesi	pag.	23
5.	Risultati e discussione	pag.	24
	a. Sintesi	pag.	24
	i. Benzotieno[3,2- <i>d</i>]-1,2,3-triazine	pag.	24
	ii. Pirido[3',2':4,5]tieno[3,2- <i>d</i>]-1,2,3-triazine	pag.	30
	iii. Pirido[3',2':4,5]furo[3,2- <i>d</i>]-1,2,3-triazine	pag.	35
	b. Studi di attività biologica	pag.	38
	i. Screenings antiproliferativi del DTP	pag.	38
	ii. Attività antiproliferativa (saggio MTT)	pag.	45
	iii. Studi computazionali	pag.	48
	1. Analisi VLAK	pag.	48
	2. Analisi compare	pag.	49
	iv. Studi di interazione con il DNA	pag.	51
	1. Spettroscopia UV-Visibile	pag.	52
	2. Denaturazione termica del DNA	pag.	54
	3. Dicroismo Circolare	pag.	55
	4. Viscosità	pag.	56
	v. Analisi del ciclo cellulare	pag.	57

6.	Conclusioni	pag.	60
7.	Parte sperimentale	pag.	61
	a. Chimica	pag.	61
	b. Studi computazionali	pag.	73
	i. Protocollo VLKA (Virtual Lock-and-Key)	pag.	73
	c. Saggi biologici	pag.	74
	i. Metodologia DTP-NCI per lo screening in vitro	pag.	74
	ii. Attività antiproliferativa	pag.	75
	d. Studi di interazione con ct-DNA	pag.	78
8.	Bibliografia	pag.	80

1.INTRODUZIONE

Le patologie tumorali costituiscono una delle principali cause di morte nelle società industriali, seconde solo alle malattie del sistema circolatorio (Fig. 1). Nel 2008 in Italia, secondo quanto riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per un campione 100.000 abitanti, sono stati registrati di 158 decessi di uomini e 91 decessi di donne per patologie tumorali [1].

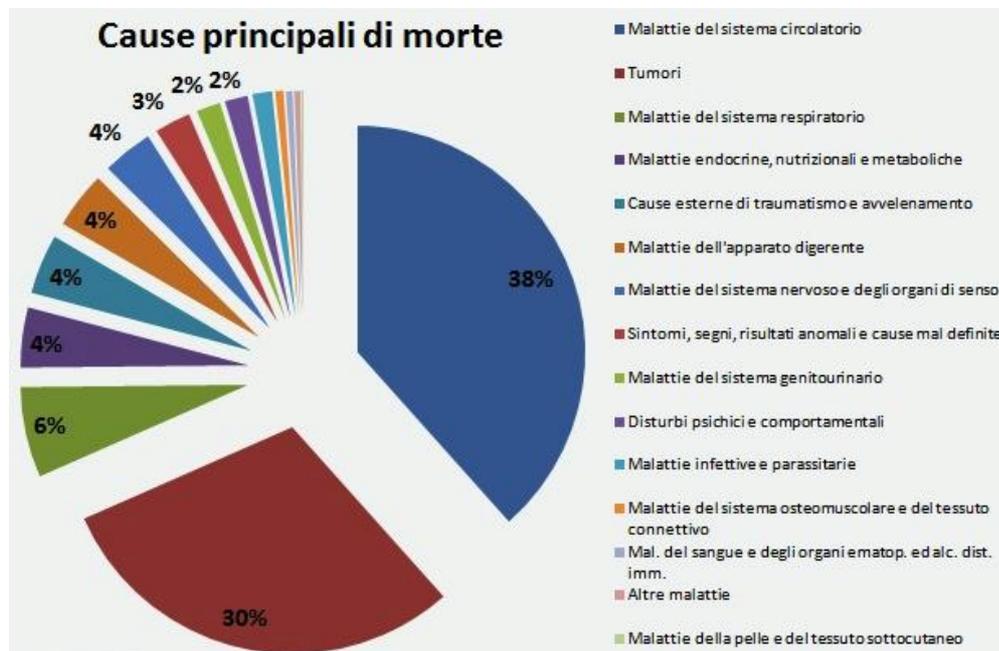


Figura 1. Fonte ISTAT (dati anno 2007)

Il tumore è una malattia caratterizzata da una crescita incontrollata di cellule anomali, che smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare a seguito di danni al loro patrimonio genetico. Queste cellule anomale progeneratrici proliferano in modo incontrollato e indipendente, dando luogo ad una 'neoplasia', una neoformazione tissutale atipica.

La maggior parte dei tumori ha origine dalla progressiva trasformazione di cellule minimamente alterate che, attraverso un meccanismo multi-step, possono generare cellule capaci di crescita illimitata, invasività locale, e colonizzazione di nuove aree tissutali dando luogo a metastasi.

Il processo carcinogenico risulta progressivo sia a livello fenotipico che genetico. Le caratteristiche tipiche dei vari tumori sono il frutto di molteplici mutazioni assunte in

maniera graduale nell'arco di un processo definito progressione tumorale. A livello molecolare questa progressione deriva dall'accumulo di lesioni genetiche che in alcuni casi sono favorite da deficit nei meccanismi di riparazione del DNA.

Negli ultimi decenni, la ricerca ha individuato una serie di caratteristiche di tipo molecolare, biochimico, e cellulare comuni alla maggior parte di tumori umani. Ciò è stato possibile grazie allo sviluppo delle conoscenze nell'ambito della biologia cellulare che ha dimostrato come tutte le cellule dei mammiferi posseggano un apparato molecolare simile il quale regola la proliferazione, la differenziazione, e la morte cellulare.

Il genoma di cellule tumorali è invariabilmente alterato in più siti, avendo subito lesioni sia in seguito a mutazioni puntiformi che ad evidenti cambiamenti nel corredo cromosomico.

Le modifiche essenziali che originano una crescita maligna possono essere così riassunte [2]:

1. autosufficienza dei fattori di crescita,
2. insensibilità agli inibitori della crescita,
3. evasione alla morte cellulare programmata (apoptosi),
4. illimitato potenziale replicativo,
5. capacità di rifornirsi di nutrienti e di ossigeno in maniera autonoma (angiogenesi),
6. capacità di invasione dei tessuti e metastasi.

Ciascuno di questi cambiamenti rappresenta la violazione dei meccanismi di difesa di cellule e tessuti. Queste funzionalità, come già detto, sono condivise da diversi tipi di tumori umani (Fig. 2).



Figura 2. Capacità acquisite dalle cellule tumorali

a. Caratterizzazione delle Cellule Tumorali

i. Autosufficienza dei fattori di crescita

Le cellule normali richiedono segnali di crescita mitogeni (growth signal, GS) per poter passare da uno stato quiescente ad uno stato proliferativo. Questi vengono trasmessi da recettori transmembrana che legano classi distinte di molecole: fattori di crescita, componenti della matrice extracellulare e molecole per l'adesione/interazione cellula-cellula. Nessun tipo di cellula normale può proliferare in assenza di tali segnali. Questa dipendenza è evidente quando si osserva la moltiplicazione di cellule normali in coltura. Le cellule di solito proliferano solo se alimentate con opportuni fattori mitogeni ed in presenza di un adeguato substrato per le loro integrine. Un tale comportamento contrasta con quello delle cellule tumorali, che mostrano una dipendenza dai fattori di crescita notevolmente ridotta. Risulta evidente che le cellule tumorali autogenerano molti dei propri segnali di crescita, riducendo la loro dipendenza dalla stimolazione da parte del microambiente tissutale. L'assenza di dipendenza da segnali esogeni annulla un meccanismo omeostatico importante che opera normalmente per garantire un adeguato comportamento dei vari tipi di cellule all'interno di un tessuto.

Per il raggiungimento di tale autonomia molecolare vi sono evidenze di tre comuni strategie: l'alterazione di segnali di crescita extracellulari, di trasduttori transcellulare di tali segnali o di circuiti intracellulari che traducono tali segnali in azione.

Mentre i fattori di crescita (GF) mitogeni solubili sono prodotti da un dato tipo di cellule al fine di stimolare la proliferazione di altre cellule, molte cellule tumorali acquisiscono la capacità di sintetizzare GF, a cui sono sensibili, creando un loop di segnali a feedback positivo definito stimolazione autocrina. Chiaramente, la sintesi di un GF da parte di una cellula tumorale dipende all'interno del tessuto da fattori di altre cellule. I recettori della superficie cellulare, che i segnali di stimolazione della crescita trasducono verso l'interno delle cellule, sono essi stessi obiettivo di deregolamentazione durante la crescita tumorale. Tali recettori, che presentano nei loro domini citoplasmatici attività tirosin-chinasica, sono spesso sovraespressi in molti tipi di cancro.

ii. Insensibilità agli inibitori della crescita

Nei tessuti normali operano una serie di segnali antiproliferativi allo scopo di mantenere la quiescenza cellulare e l'omeostasi dei tessuti. Questi segnali includono da un lato inibitori dei fattori di crescita cellulare solubili, dall'altro inibitori della crescita cellulare incorporati nella matrice cellulare e sulla superficie delle cellule vicine.

Questi fattori inibitori della crescita, come la loro controparte che agisce positivamente, sono captati da recettori della superficie cellulare transmembrana accoppiati a circuiti di segnalazione intracellulare.

Gli inibitori della crescita cellulare possono bloccare la proliferazione cellulare attraverso due distinti meccanismi. Le cellule possono essere mantenute in uno stato di quiescenza (G0) fino a quando segnali extracellulari lo consentono. Alternativamente, le cellule possono essere indotte ad abbandonare definitivamente il loro potenziale proliferativo entrando in stati postmitotici di solito associati con l'acquisizione di specifici tratti di differenziazione. La cellula normale risponde in genere ai fattori inibitori della crescita grazie ad elementi del ciclo cellulare ed in particolare a componenti che regolano il transito delle cellule attraverso la fase G1.

In questa fase le cellule monitorano il loro ambiente esterno ed in base ai segnali rilevati decidono se proliferare, rimanere in uno stato di quiescenza, o entrare in uno stato postmitotico. Nello stato proliferativo i fattori inibitori della crescita sono numerosi e

convergono sulle proteine del retinoblastoma che regolano il transito delle cellule attraverso la fase G1. Una ipofosforilazione del retinoblastoma blocca la proliferazione sequestrando e alterando la funzione dei fattori trascrizionali E2F che controllano l'espressione di una grande varietà di geni essenziali per la progressione dalla fase G1 alla fase S.

iii. Resistenza all'apoptosi

La capacità di un tumore di espandersi in maniera illimitata non è dovuta solo alla velocità di proliferazione cellulare ma anche allo stato di deterioramento delle cellule cancerose. La morte cellulare programmata, apoptosi, rappresenta una delle principali cause di degrado cellulare. Una volta innescata l'apoptosi grazie ad una serie di segnali fisiologici si verifica un susseguirsi di eventi che portano alla morte della cellula: distruzione delle membrane cellulari, collasso dello scheletro citoplasmatico e nucleare, espulsione del citosol, degradazione dei cromosomi e frammentazione del nucleo.

Il sistema apoptotico è essenzialmente costituito da due classi di componenti: sensori ed effettori. I sensori monitorano l'ambiente intra ed extracellulare al fine di verificare le condizioni che possono favorire la vita della cellula. Tali segnali regolano a loro volta i componenti effettori che inducono morte per apoptosi. Questi componenti includono anche recettori, posti sulla superficie cellulare, che legano fattori di sopravvivenza o morte. I sensori intracellulari monitorano il benessere delle cellule e attivano l'apoptosi in caso di anomalie.

Inoltre, la maggior parte delle cellule sono mantenute in vita da segnali di sopravvivenza cellula-matrice e cellula-cellula la cui abrogazione induce apoptosi. I segnali regolatori apoptotici sia solubili che legati alla membrana cellulare riflettono le esigenze dei tessuti di mantenere i loro costituenti cellulari in opportune configurazioni architettoniche.

L'alterazione di tali componenti può drammaticamente influenzare la progressione di un tumore fornendo una spiegazione razionale per l'inattivazione di tale processo durante lo sviluppo del tumore [3].

Le cellule cancerose possono divenire resistenti all'apoptosi attraverso una vasta serie di meccanismi: l'apoptosi può essere inibita attraverso l'attivazione di un pathway di segnali per la sopravvivenza cellulare o da una minore espressione di fattori proapoptotici.

iv. Illimitato potenziale replicativo

Autonomia nella produzione dei fattori di crescita, insensibilità ai segnali anticrescita e resistenza all'apoptosi possono causare irregolarità nella proliferazione cellulare generando una popolazione di cellule che costituiscono il tumore.

Nelle colture cellulari tutte le cellule hanno un potenziale replicativo finito, ed in seguito ad un certo numero di duplicazioni, smettono di crescere attraverso un processo definito senescenza.

Il processo di senescenza può essere aggirato rendendo inattive le proteine soppressori di un tumore pRb e p53, che consentono la replicazione cellulare per generazioni fino a quando la cellula non entra in una fase critica caratterizzata da una massiccia morte cellulare ma anche dalla comparsa occasionale di cellule che hanno acquisito la capacità di moltiplicarsi senza limite in uno stato definito immortalizzazione.

La maggior parte delle cellule tumorali che vengono poste in coltura appaiono immortalizzate, suggerendo che il potenziale replicativo illimitato è una caratteristica acquisita *in vivo* durante la progressione del tumore. Ciò suggerisce che ad un certo punto nel percorso della progressione del tumore, le cellule precancerose che perdono la loro capacità di riprodursi, possono completare il loro programma solo superando la barriera della senescenza e acquisendo un potenziale replicativo illimitato.

Durante questa fase si ha normalmente un progressivo accorciamento dei telomeri ad ogni ciclo cellulare. Ciò è attribuibile all'incapacità della DNA polimerasi di replicare in maniera completa l'estremità 3' del DNA durante la fase S.

La progressiva perdita dei telomeri attraverso cicli replicativi successivi causa la perdita della capacità cellulare di proteggere le estremità del DNA cromosomico inducendo la morte delle cellule colpite. In quasi tutti i tipi di cellule maligne si ha una manutenzione del telomero attraverso l'espressione dell'enzima telomerasi, che aggiunge sequenze nucleotidiche sulle estremità del DNA telomerico.

v. Angiogenesi

L'ossigeno ed i nutrienti forniti dal sistema vascolare sono cruciali per la funzione e la sopravvivenza cellulare, costringendo quasi tutte le cellule di un tessuto a risiedere in uno spazio inferiore a 100 μ m all'interno di un vaso sanguigno capillare. Durante l'organogenesi, questa vicinanza è garantita da una crescita coordinata dei vasi e del

parenchima. Una volta formato il tessuto, la crescita di nuovi vasi sanguigni, processo di angiogenesi, è transitoria e viene regolata con molta attenzione. A causa di questa dipendenza da capillari vicini, sembrerebbe plausibile che le cellule che proliferano all'interno di un tessuto abbiano una capacità intrinseca di incoraggiare la crescita dei vasi sanguigni. Tale capacità angiogenica viene incrementata durante lo sviluppo del tumore tramite una sostituzione angiogenica della stasi vascolare. Una strategia comune per il riequilibrio comporta la trascrizione del gene alterato. L'espressione coordinata di altre molecole segnale pro e anti angiogeniche, quali fattori di crescita, integrina o plasmina e la loro modulazione da parte di proteolisi sembrano riflettere la complessa regolazione omeostatica della normale angiogenesi e dell'integrità del tessuto vascolare.

vi. Invasione tissutale e metastasi

Durante lo sviluppo della maggior parte dei tipi di cancro umano, masse tumorali primarie producono cellule esploratrici che si muovono all'esterno, invadono i tessuti adiacenti, e da lì si trasferiscono in luoghi lontani dove poter fondare nuove colonie [4]. Questa invasione origina delle metastasi le quali sono la causa del 90% delle morti per cancro umano. La capacità di invasione e metastasi permette alle cellule tumorali di sfuggire alla massa tumorale primaria e colonizzare nuove parti del corpo dove, almeno inizialmente, nutrienti e spazio non sono limitanti. Le metastasi appena formatesi nascono come amalgami di cellule tumorali e cellule normali circoscritte dal tessuto ospite. Diverse classi di proteine, coinvolte nelle funzioni cellulari, vengono alterate acquisendo capacità invasive o metastatiche. Le proteine interessate includono molecole di adesione cellula-cellula (Cell adhesion molecules, CAMs), membri delle famiglie immunoglobulina e caderina calcio-dipendente che mediano le interazioni cellula-cellula, e le integrine che collegano le cellule a substrati della matrice extracellulare.

Un altro parametro generale della capacità invasiva e metastatica coinvolge proteasi extracellulari. Geni della proteasi sono sovraregolati, geni inibitori della proteasi sono inibiti, e proenzimi inattivi delle proteasi sono convertiti in enzimi attivi. Proteasi degradanti la matrice, come metalloproteinasi-2, sono tipicamente associati con la superficie cellulare, mediante sintesi con un dominio transmembrana, legandosi a specifici recettori proteasi, o in associazione con integrine. La metalloproteinasi-2 (MMP2) può degradare la matrice, consentendo alle cellule tumorali un accesso al sistema vascolare e linfatico, con conseguente diffusione del tumore.

2.FARMACI ANTITUMORALI

Data l'incidenza delle patologie neoplastiche, la ricerca di nuovi agenti chemioterapici antitumorali è sempre attuale. Recentemente l'enorme sviluppo della chimica farmaceutica ha contribuito alla possibilità di curare e migliorare la qualità di vita di pazienti affetti da tumore. Le possibilità terapeutiche variano a seconda dei casi: esistono diversi tipi di interventi che devono essere mirati per ogni specifica forma di tumore e stadio di sviluppo in cui esso si trova.

Occorre analizzare le caratteristiche citologiche e biologiche della cellula cancerosa, nel tentativo di cogliere i momenti della sua trasformazione maligna. Infatti la malignità può essere considerata a diversi livelli: citologico, istologico, biologico e clinico.

I farmaci classicamente adoperati nella terapia antitumorale sono principalmente agenti citotossici o antiproliferativi, i quali di norma svolgono una marcata azione genotossica. Infatti, interferendo con le normali funzioni del DNA, o inibendo la biosintesi degli acidi nucleici (antimetaboliti), la chemioterapia classica diviene responsabile dell'arresto e/o della diminuzione della velocità di crescita e divisione cellulare, riducendo in ultima analisi l'espansione della massa tumorale.

Gli agenti antineoplastici possono esplicare la loro attività in svariati modi interagendo: con la membrana cellulare, con il nucleo della cellula o con altri organuli cellulari. I farmaci antitumorali possono essere suddivisi in **composti naturali** ed in **derivati sintetici**.

I **composti naturali** comprendono: enzimi, ormoni steroidei, antimetotici, tra cui gli alcaloidi della vinca (come ad esempio la vincristina), ed antibiotici, di cui fanno parte le antracicline (come ad esempio la doxorubicina), actinomicine, mitomicine, e bleomicine (Fig. 3).

I **derivati sintetici**, alcuni dei quali sono riportati in Figura 4, possono essere a loro volta suddivisi in:

1. Agenti DNA-interattivi;
2. Antimetaboliti: antifolici, antimetaboliti purinici e pirimidinici;
3. Inibitori della traduzione del segnale: inibitori di proteinchinasi;
4. Agenti attivi sui microtubuli.

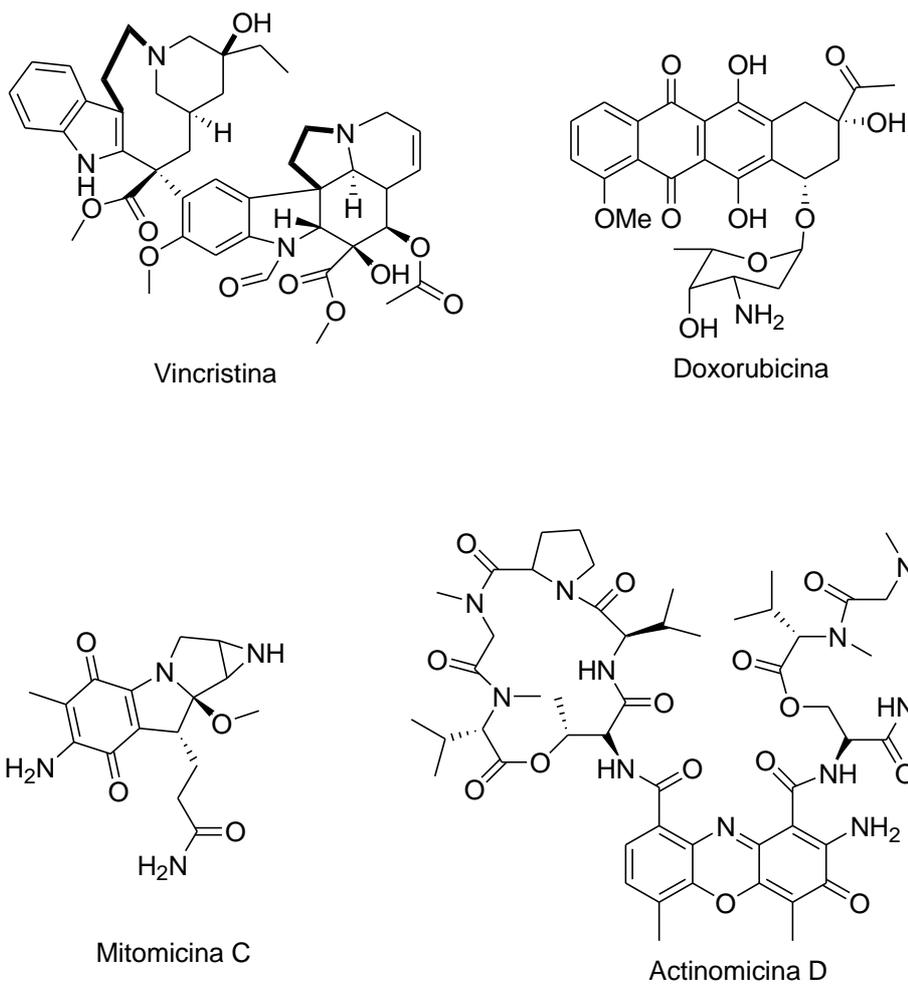


Figura 3. Composti di origine naturale ad attività chemioterapica

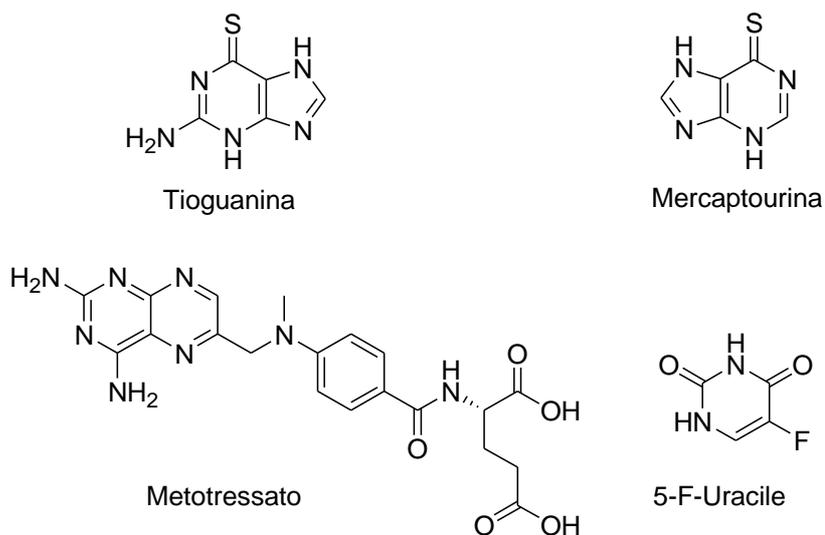


Figura 4. Derivati sintetici ad attività chemioterapia

Uno dei principali inconvenienti dovuto all'utilizzo dei chemioterapici antitumorali è dato dalla non totale eliminazione delle cellule maligne alle dosi dei tradizionali

protocolli terapeutici. Nell'ambito della terapia farmacologica, tutti i farmaci antitumorali correntemente impiegati agiscono "uccidendo" le cellule neoplastiche, lasciando tuttavia intatta, nelle cellule che sopravvivono, la capacità di invasione, di metastatizzazione, e di indurre angiogenesi. Pertanto lo sviluppo di resistenza è spesso esteso a molti dei farmaci antitumorali correntemente usati in terapia. Inoltre, l'azione citocida di tali farmaci, infatti, non è selettiva per le cellule neoplastiche, manifestandosi anche a livello delle cellule non-neoplastiche in fisiologica rapida replicazione (midollo osseo), con gravi effetti collaterali tossici. Ne deriva pertanto una ridotta "compliance" da parte del paziente, migliorata comunque dall'introduzione in terapia di eritropoietina e fattori stimolanti le colonie di granulociti, atti a ristabilire la funzione del midollo osseo che altrimenti sarebbe nettamente limitata o quasi soppressa dall'uso del farmaco antitumorale.

Le terapie tradizionali contro il cancro si basano su agenti chimici o fisici, o su farmaci e radiazioni ionizzanti, la maggioranza dei quali sono mirati a produrre nelle cellule cancerose un danno al DNA o l'inibizione della loro replicazione. Conseguentemente, questi agenti risultano tossici non soltanto per le cellule tumorali, ma anche per quelle normali che vanno incontro a proliferazione. La tossicità nei confronti delle cellule cancerose è alquanto superiore in virtù del ritmo proliferativo più rapido, tuttavia l'instabilità genetica della maggior parte delle popolazioni cellulari maligne può rendere l'eliminazione del cancro più difficile, poiché esse diventano progressivamente eterogenee e difficilmente sensibili ai trattamenti costituiti da farmaci singoli.

I farmaci attualmente impiegati in terapia si possono ulteriormente classificare in **ciclo cellulari specifici** e **ciclo cellulari non specifici**.

I farmaci **ciclo cellulari specifici** intervengono in determinate fasi del ciclo cellulare provocando la morte cellulare. Con l'avvento delle rivoluzionarie scoperte nel campo della biologia molecolare, si possono infatti identificare, in seno alla cellula tumorale, specifici target essenziali, legati alla replicazione. Questi target vengono specificatamente bloccati da molecole progettate e sintetizzate in modo mirato.

Il primo agente clinicamente disponibile per la terapia molecolare mirata fu il Glivec[®], imatinib mesilato, inibitore di BCR-ABL (proteine attivatrici dei processi cellulari), utilizzato per il trattamento della leucemia mieloide cronica e dei tumori stromali gastrointestinali (Fig. 5).

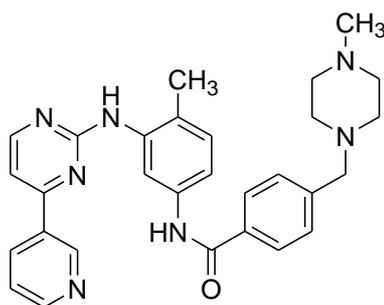


Figura 5. Glivec

Particolarmente interessanti, in terapia antitumorale, risultano anche gli alcaloidi della vinca (vinblastina), composti dimerici asimmetrici con elevata affinità selettiva per la β -tubulina (Fig. 6). Questi interagendo con i dimeri della tubulina già assemblati in microtubuli, ne impediscono la depolimerizzazione a basse dosi. Ad alte dosi, invece, favoriscono una depolimerizzazione non regolata, con conseguente collasso della struttura citoscheletrica a causa della formazione di filamenti a spirale con struttura non microtubulare. Risultato finale è l'arresto della cellula trattata in metafase. L'assenza di un fuso, infatti, fa sì che i cromosomi duplicati non si possano allineare lungo il piano di divisione disperdendosi così nel citoplasma o associandosi in raggruppamenti anomali con morfologia stelliforme.

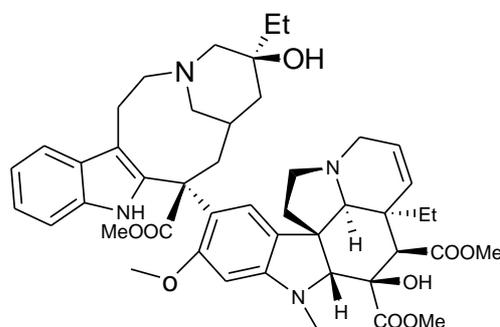


Figura 6. Vinblastina

I farmaci **ciclo cellulare non specifici** sono rappresentati essenzialmente da agenti antiproliferativi e citotossici. Questi interferiscono generalmente con la normale funzione fisiologica del DNA o inibiscono la sintesi degli acidi nucleici, inibendo o rallentando la crescita cellulare. Farmaci di tipo ciclo cellulare non specifici possono essere gli antimetaboliti, e gli agenti DNA-interattivi (intercalanti, alchilanti e strand breakers).

Di notevole importanza in terapia antitumorale è la famiglia degli **antimetaboliti**, i primi ad indurre remissione nelle leucemie. Tra gli antimetaboliti si annoverano composti chimici di diversa natura ma con struttura chimica e morfologica molto simile a metaboliti essenziali per la sintesi di DNA e RNA. Le loro caratteristiche strutturali fanno sì che possano essere erroneamente incorporati come nucleotidi o possano interagire con complessi enzimatici. A seconda del loro meccanismo d'azione gli antimetaboliti possono essere distinti in: antifolati, analoghi delle purine e delle pirimidine.

Gli **agenti DNA-interattivi** possono essere suddivisi in tre classi principali (Fig. 7).

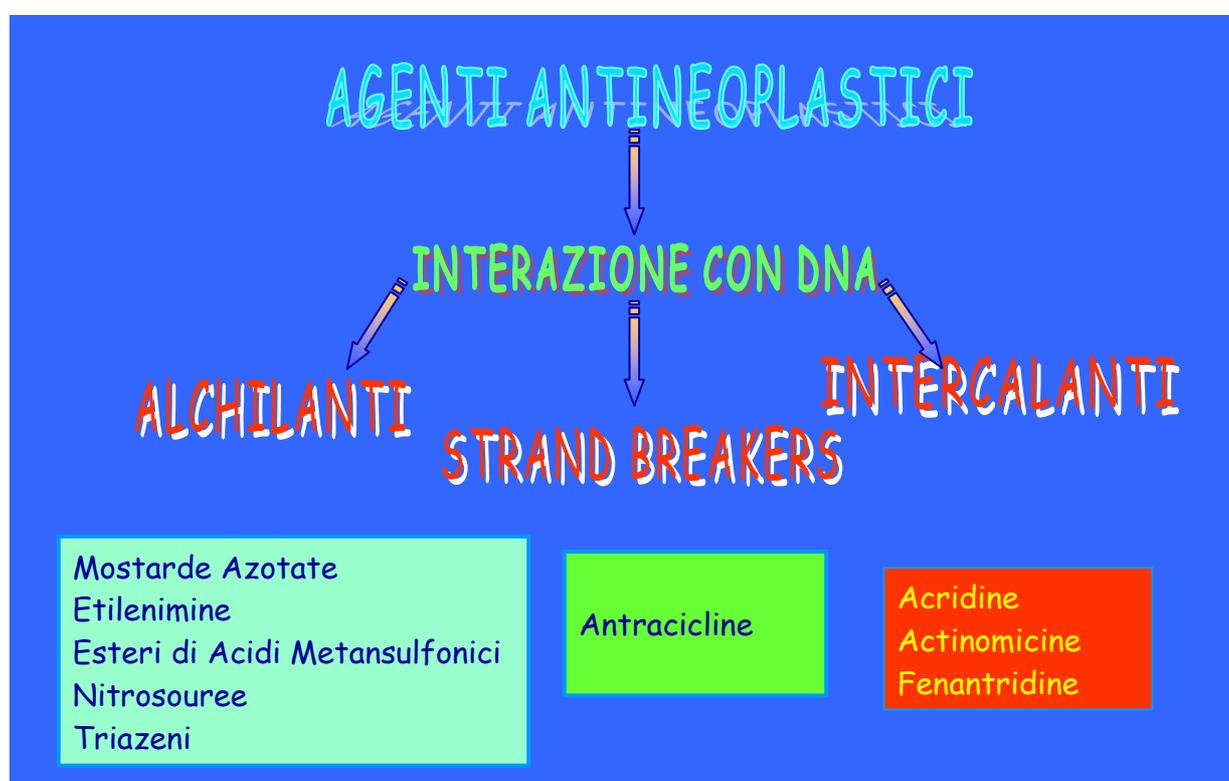


Figura 7

Gli **strand breakers** possono inizialmente intercalarsi nel DNA, ma in particolari condizioni possono generare delle specie radicaliche che generalmente reagiscono con la porzione zuccherina del DNA, determinando la rottura del filamento polinucleotidico. Nel meccanismo d'azione di questi agenti DNA-interattivi può anche essere coinvolta la topoisomerasi.

Gli **agenti intercalanti** sono generalmente molecole aromatiche o eteroaromatiche planari, che si inseriscono trasversalmente negli spazi inter-nucleotidici della doppia elica del DNA. Le interazioni farmaco-DNA sono di natura prevalentemente elettrostatica a trasferimento di carica. Tali interazioni non rompono i legami ad idrogeno di appaiamento delle basi azotate ma inducono una variazione conformazionale della doppia elica, alterandone la fisiologica regolarità (Fig. 8). Pertanto gli agenti antitumorali intercalanti impediscono il normale srotolamento del DNA interferendo di conseguenza con i processi di trascrizione e replicazione delle cellule tumorali.

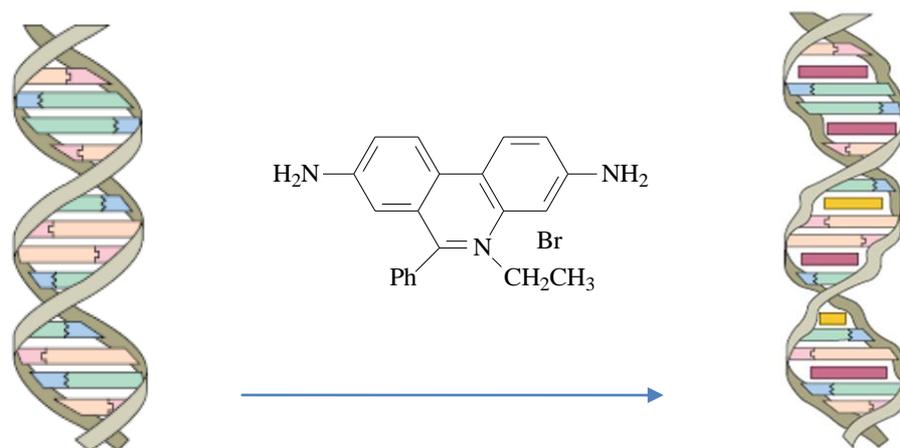


Figura 8. Effetti dell'intercalazione di Etidio Bromuro nel DNA

Altra classe di farmaci DNA-interattivi è costituita dagli **agenti alchilanti**, composti strutturalmente molto eterogenei, ma accomunati dalla capacità di divenire potenti elettrofili in seguito a bioattivazione, originando intermedi carbocationici reattivi, capaci di legarsi covalentemente con porzioni nucleofile del DNA o delle varie macromolecole ad esso associate, quali gruppi aminici, sulfidrilici ed atomi di ossigeno, presenti nel DNA, RNA, lipidi e proteine.

Gli agenti alchilanti sono composti genotossici dotati di un elevato potere mutagenico, cancerogenico, e citotossico. Costituiscono la classe di antitumorali più antichi e comprendono un'ampia varietà di farmaci accomunati dalla loro capacità di alchilare i siti nucleofili. Sebbene questi composti siano in grado di indurre danni in tutti i costituenti cellulari, i loro principali effetti biologici, quali citotossicità e mutagenesi, sono ascrivibili principalmente alle lesioni inflitte al DNA.

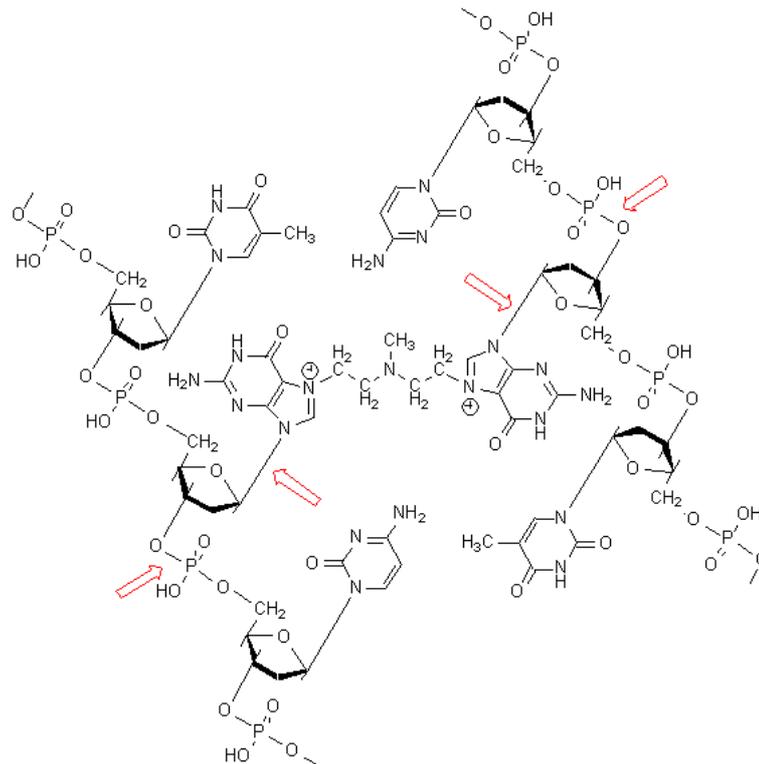
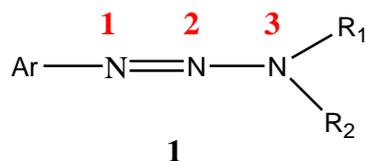


Figura 9. Effetti della bis-alcilazione delle basi azotate ad opera di mecloretamina

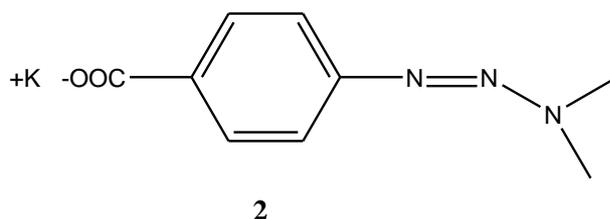
Gli agenti alchilanti possono reagire con il DNA direttamente o attraverso composti secondari, derivanti dall'attivazione metabolica o dalla degradazione chimica spontanea delle sostanze originarie. I principali target nel DNA sono gli atomi di ossigeno e di azoto presenti nelle basi puriniche/pirimidiniche (N-7 e O-6 della guanina, N-3 della citosina) e gli atomi di ossigeno nello scheletro fosfodiesterico da cui si possono originare ben 12 differenti addotti. La quantità relativa di ciascun addotto dipende principalmente dalla natura chimica del composto ma anche dalla reattività del sito target. Nella chemioterapia si utilizzano principalmente agenti bifunzionali capaci di reagire con due siti nucleofili contemporaneamente, generando così legami crociati tra due catene di DNA o all'interno della stessa catena (es. le mostarde azotate come ciclofosfamide e clorambucile); le lesioni risultanti interferiranno sia con la trascrizione sia con la replicazione (Fig. 9).

3.TRIAZENI E BIOISOSTERI COME AGENTI ANTITUMORALI

Le prime molecole che presentano una porzione triazenica sono state descritte in letteratura nel 1862 da Griess [5] tuttavia solo un secolo dopo si è manifestato un grande interesse farmacologico per tali molecole. Infatti, molti derivati 1-aril-3,3-dimetil-triazenici del tipo **1** hanno evidenziato un'elevata attività antitumorale [6-8].

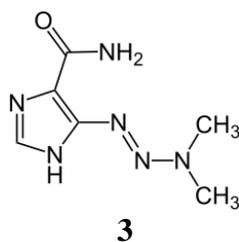


La funzione triazenica conferisce una considerevole attività antineoplastica ad innumerevoli derivati arilici ed eteroarilici. Approfonditi studi, tendenti ad evidenziare eventuali relazioni struttura-attività di ariltriazenici, hanno condotto alla sperimentazione clinica di un derivato triazenico dell'acido benzoico, DM-COOK [1-p-(3,3-dimetil-1-triazeno)-benzoato di potassio] **2**, quale agente antimetastasi [9-11].



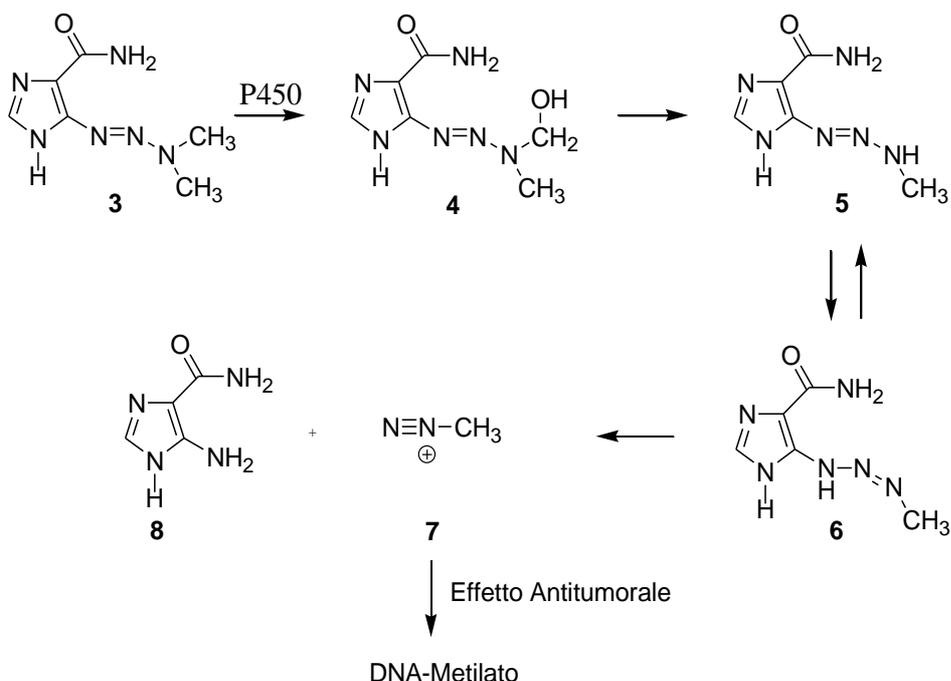
La sostituzione sull'azoto N-1 della porzione arilica con una eterociclica aromatica ha incrementato l'attività antineoplastica delle molecole triazeniche consentendo di identificare nella serie azolo-triazenica una importante classe di agenti antitumorali usati ancora oggi nei protocolli terapeutici. Infatti i derivati triazeno-triazolici, triazeno-pirazolici, e triazeno-imidazolici si sono mostrati potenti agenti antiproliferativi nel trattamento di diversi tipi di tumori.

In particolare il triazeno-imidazolo 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)-1H-imididazol-4-carbossammide, dacarbazina (DTIC) (**3**), è risultato il farmaco più attivo per il trattamento del melanoma maligno oltre ad essere indicato nella terapia del linfoma di Hodgkin per tumori resistenti alla terapia combinata di mecloretamina, oncovina® (vincristina), prednisone e procarbazine (MOPP).



Nonostante la DTIC mostri un'apparente semplicità strutturale, è stato abbastanza complesso chiarirne il meccanismo d'azione e tuttora l'analisi delle relazioni struttura-attività nella serie degli agenti antineoplastici triazenoazolici non è semplice ed immediata, in quanto l'efficacia e la tossicità sono così simili che spesso l'attività viene mascherata dalla tossicità.

La dacarbazina è in grado di dare origine a diversi frammenti citotossici per attivazione metabolica. Infatti, in seguito ad N-dealchilazione ossidativa, una reazione di C-ossidazione catalizzata a livello epatico dall'ossidasi a funzione mista citocromo P450, si forma l'intermedio α -idrossi-metiltriazenico **4**, che in presenza di un residuo nucleofilo enzimatico subisce la rottura chimica del gruppo α -idrossi-alchilico, fornendo il monometiltriazene (MTIC) **5**. Il derivato **5**, coniugato al sistema aromatico imidazolico, tautomerizza nella forma **6** non coniugata, instabile e pertanto capace di liberare la specie metil-diazonio **7**, responsabile dell'alchilazione del DNA (Schema 1, Fig. 10).



Schema 1. Meccanismo di bio-attivazione della dacarbazina

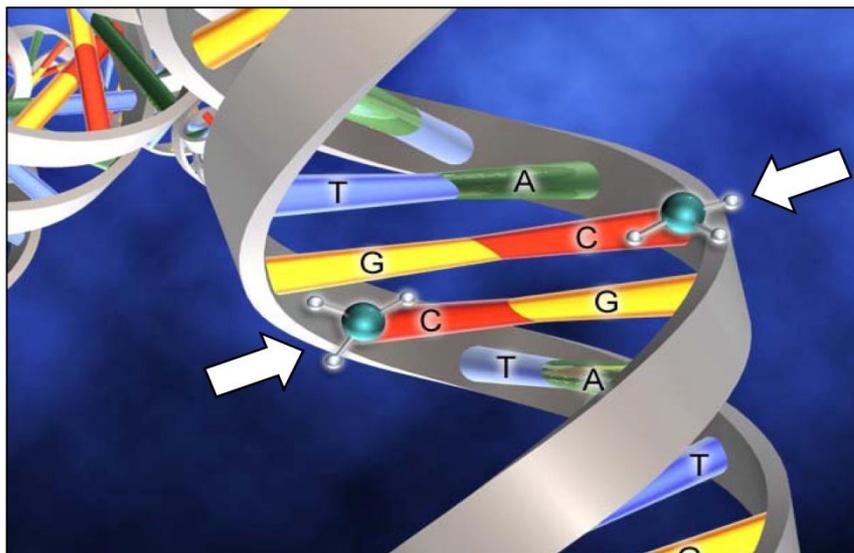


Figura 10. Metilazione del DNA per effetto della specie reattiva metil-diazonio

L'anello imidazolico della DTIC riveste la funzione di semplice carrier della porzione triazenica. Infatti, sebbene la DTIC sia un analogo strutturale del metabolita 5-aminoimidazol-4-carbossammide (AIC) (**8**), un intermedio che viene convertito ad acido inosinico da parte degli enzimi preposti alla biosintesi delle basi puriniche, la sua citotossicità deriva dalla conversione ad agente alchilante e non alla somiglianza strutturale all'intermedio metabolico AIC. In passato ciò ha indotto a pensare che la DTIC agisse come antimetabolita inibendo il metabolismo purinico e quindi la sintesi del DNA [12,13].

In alternativa al meccanismo d'azione alchilante, il prodotto di metabolismo della DTIC, il monometiltriazene nella sua forma aldeidica, potrebbe ciclizzare originando un addotto che interferisce con la doppia elica del DNA e che blocca la replicazione delle cellule cancerose.

La potente attività antitumorale mostrata dalla dacarbazina ha indirizzato la ricerca farmaceutica verso la sintesi di nuovi derivati triazenici dove la porzione carrier eterociclica sembra modulare l'effetto antiproliferativo.

Infatti, secondo dati riportati in letteratura, derivati triazenici che presentano nuclei eteroclici π -elettronricchi mostrano *in vitro* un'inibizione di crescita di cellule tumorali più elevata anche se a spese della stabilità chimica.

In particolare i derivati 3-triazenopirrolici **9**, i più π -elettronricchi nell'ambito della serie azolica, hanno evidenziato una buona attività citotossica contro le linee cellulari tumorali

umane eritroleucemiche di Friend (FLC) in un range 1.1-3.1 μM , ed un effetto mutagenico su colonie cellulari di *Streptomyces Coelicolor* [14,15] (Fig. 11).

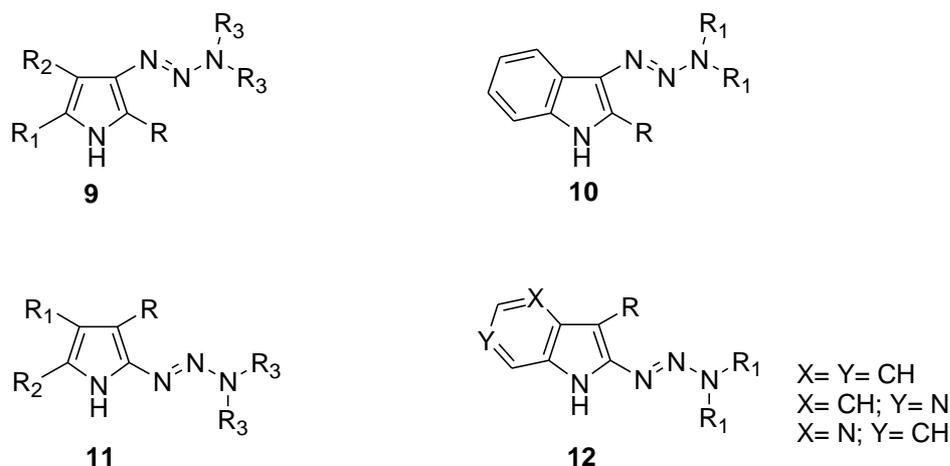


Figura 11. Derivati eterociclici triazenici ad attività antitumorale

Nella medesima serie di derivati la benzocondensazione ha condotto ai 3-triazenoindoli di tipo **10**. Tali composti hanno mostrato attività biologica maggiore rispetto agli analoghi pirrolici nei confronti di cellule FLC e *multidrug-resistant* (ARN2), con valori di IC_{50} in un range 0.053-0.080 μM e 0.10-0.14 μM , rispettivamente [16]. I derivati 2-triazenopirroli di tipo **12** hanno evidenziato invece attività citotossica nei confronti di svariate tipologie di tumori (leucemiche, linfomi e carcinomi), con valori di IC_{50} nel range di 3.9-21 μM [17]. In ultimo i derivati triazenopirroli condensati di tipo **12** hanno confermato la buona attività antineoplastica contro linee cellulari di tumori umani al polmone, all'ovaio e al sistema nervoso centrale, oltre che contro linee cellulari *multidrug-resistant* [18,19].

Importanti analoghi (bioisosteri) degli aril/eteroariltriazenici si sono dimostrati svariati 1,2,3,5-tetrazinoni [20-22]. Infatti numerosi derivati pirazolo- ed imidazolo-tetrazinoni del tipo **13** hanno mostrato potente attività antiproliferativa (Fig. 12).

Estesi studi SAR hanno condotto all'identificazione del più importante analogo ciclico della DTIC, temozolomide (**14**), un imidazo-tetrazinone con potente attività antineoplastica nei confronti del melanoma maligno, della micosi fungoide e dei tumori del cervello. Come tutti gli agenti citotossici alchilanti, la temozolomide viene convertita a pH fisiologico nella forma attiva, che ha breve durata d'azione, e coincide con l'intermedio attivo **6** (MTIC) della dacarbazina.

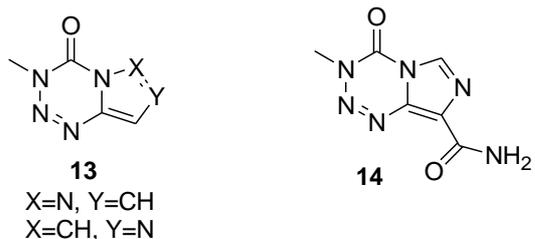
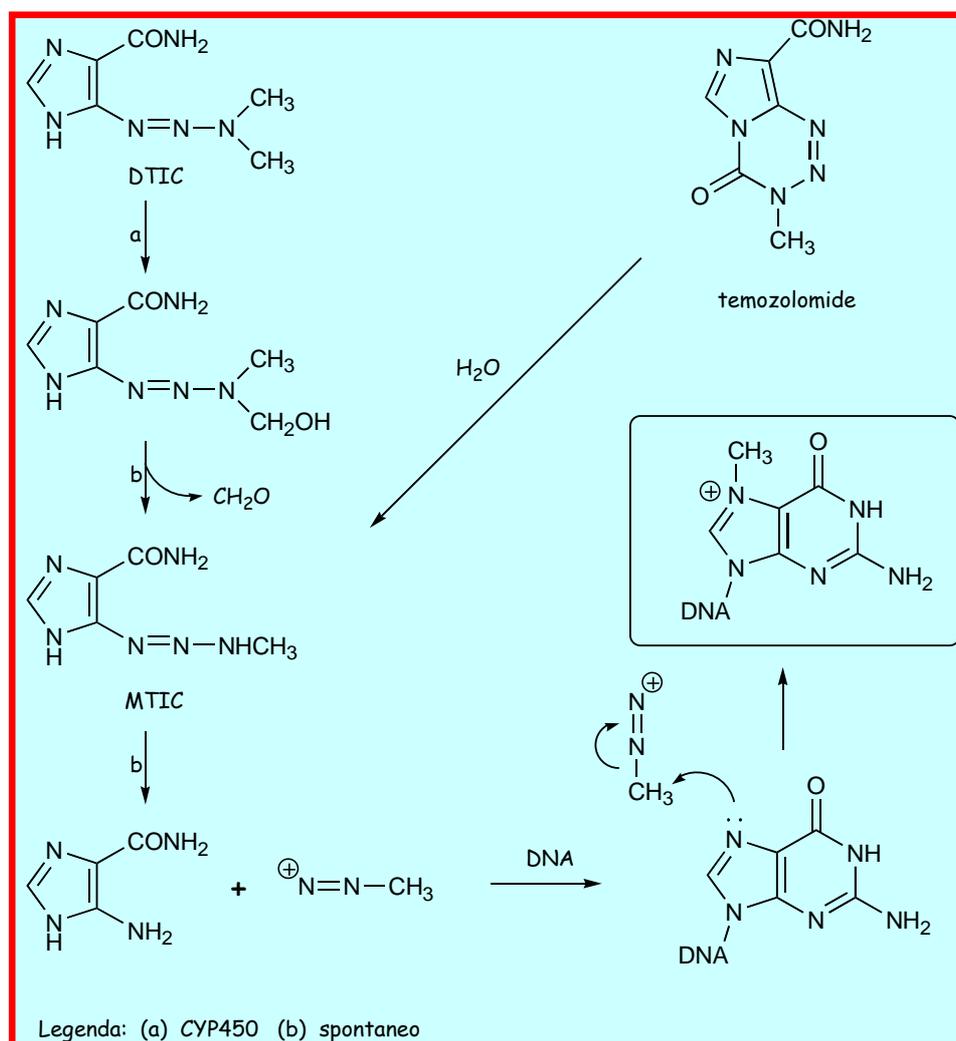


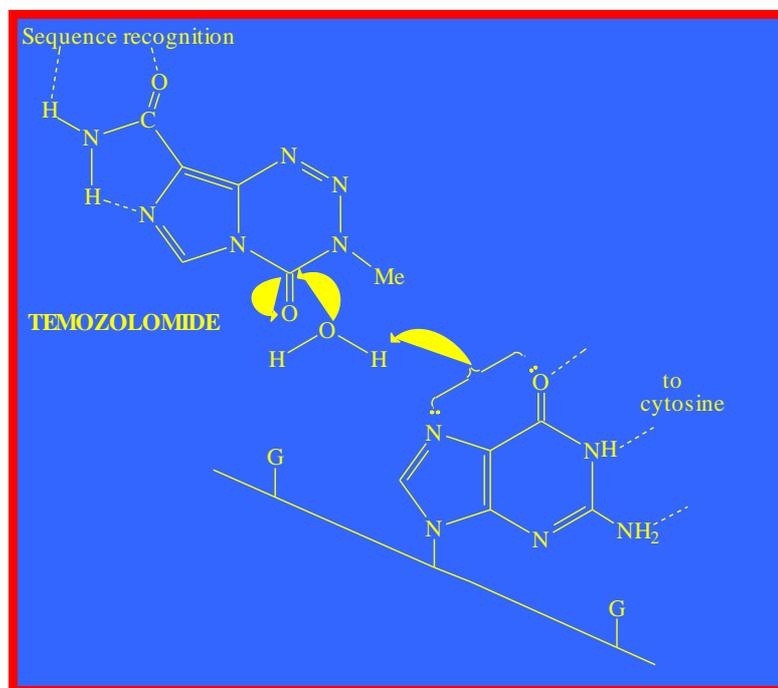
Figura 12. Derivati azolo-tetrazinonici

La forma attiva del farmaco è prodotta attraverso l'idrolisi enzimatica con l'acqua in corrispondenza della posizione C-4 altamente elettrofila della temozolomide, provocando la rottura dell'anello tetrazinonico, con rilascio di CO₂ e MTIC (Schema 2).



Schema 2. Meccanismo di bio-attivazione della DTIC e della temozolomide

E' stato dimostrato che l'idrolisi enzimatica della temozolomide avviene nel microambiente acquoso presente in una sequenza di DNA ricca di guanine dopo la ricognizione della sequenza da parte del farmaco (Schema 3).



Schema 3

La temozolomide è brevettata e commercializzata dalla Shering-Plough Corporation con il nome di *Temodal*[®]; dal 2010 l'EMA ha autorizzato la commercializzazione del farmaco in forma di generico. Il farmaco è indicato nel trattamento di pazienti con: glioblastoma multiforme di prima diagnosi in concomitanza a radioterapia e in seguito come ionoterapia, o anche in caso di glioma maligno, quale il glioblastoma multiforme o l'astrocitoma anaplastico, che manifestino recidiva o progressione dopo la terapia standard [23].

Anche nel caso della temozolomide sono stati proposti analoghi strutturali che incorporano eterocicli π -elettronricchi. Infatti i sistemi pirrolotetrazinonici del tipo **13** (X=Y=C-R, Fig. 12) sono stati ampiamente studiati ed hanno mostrato attività antiproliferativa nel range micro/submicromolare [24]. Poiché nel meccanismo d'azione proposto per l'attività antitumorale della temozolomide il passaggio chiave è l'attacco nucleofilo al C-4, posizione che presenta carenza elettronica, la densità di carica su questo atomo può rappresentare un buon parametro per predire l'attività antineoplastica di questa classe di composti. Calcoli teorici della carica sul C-4 hanno fornito per i

pirrolotetrazinoni e per la temozolomide valori simili (0.438-0.442 e 0.444, rispettivamente). Comunque, una prima valutazione preliminare SAR, unita alla considerazione che i pirrolotetrazinoni sono anche attivi *in vitro*, ha consentito di evidenziare che il meccanismo d'azione di questi composti è differente da quello della temozolomide.

Nell'ambito degli studi SAR la ricerca farmaceutica si è anche orientata verso la sintesi di nuovi derivati triazenici dove la porzione carrier eterociclica sembra modulare l'effetto antiproliferativo. Più recentemente è stato riportato che la sostituzione dell'anello imidazolico della dacarbazina con un anello tiofenico, per natura lipofilo, potrebbe incrementare il legame al sito bersaglio grazie ad una migliore interazione con gruppi tiolici sulla superficie del tumore [25]. Inoltre l'anello tiofenico, grazie alla sua configurazione elettronica, ha una capacità superiore alla DTIC di inibire la sintesi del DNA mediante attivazione come analogo purinico nonché come agente alchilante.

Anche i derivati 1,2,3-triazinici possono essere considerati bioisosteri dei triazeni in quanto in opportune condizioni fisiologiche sono capaci di subire apertura dell'anello eterociclico fornendo intermedi reattivi capaci di interagire con macromolecole biologiche. Anche se in letteratura sono stati riportati molti dati sull'attività antitumorale di nuclei isosterici 1,2,4-triazine (anche variamente condensate in strutture più complesse) di recente è stata evidenziata l'interessante attività antitumorale di svariati derivati s-triazinici, che è stata anche oggetto di recenti coperture brevettuali [26-29].

Anche il gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia tesi di dottorato da tempo si è interessato alla progettazione, alla sintesi e alla valutazione dell'attività antitumorale di sistemi policondensati che incorporassero la porzione triazinica. Particolare interesse è stato rivolto allo studio di classi di composti, come ad esempio i derivati del nucleo indolo[1,2-c]benzo[1,2,3]triazina **15** e pirrolo[2,1-c][1,2,4]triazine **16** che hanno evidenziato interessante attività inibitoria sulla proliferazione delle cellule tumorali (Fig. 13) [30,31]. Tutti questi sistemi sono caratterizzati dalla presenza di un anello triazinico e da estesa aromaticità che li rende ottimi candidati quali agenti DNA-interattivi.

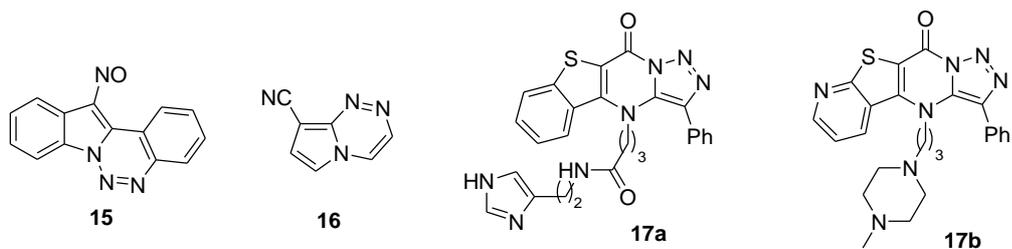


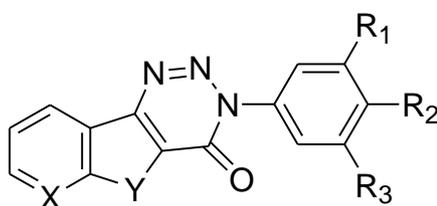
Figura 13

Recentemente, anche composti eterociclici di tipo **17a,b**, che presentano porzioni poliazotate adeguatamente decorate ed il nucleo tiofenico nello scheletro, hanno mostrato un'eccellente attività antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* [32].

4.SCOPO DELLA TESI

Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia tesi di dottorato da tempo si interessa alla progettazione, alla sintesi e alla valutazione dell'attività antitumorale di sistemi eterocicli azotati policondensati. Particolare interesse inoltre è stato rivolto allo studio delle eventuali abilità DNA-interattive dei vari policicli.

Considerato quindi il ruolo svolto dalla dacarbazina e dalla temozolomide nel campo dell'oncologia, e l'importanza del nucleo 1,2,3-triazinico in chimica farmaceutica, analizzato il fatto che la sostituzione bioisosterica di una porzione eteroaromatica con un anello tiofenico possa aumentare la potenza del farmaco, si è deciso di sintetizzare e valutare l'attività biologica di sistemi di tipo **18**. Questi sistemi costituiscono un'inesplorata classe di eterocicli con requisiti strutturali consueti per la comparsa di una possibile attività antitumorale, combinando eventualmente meccanismi d'azione diversi. Infatti, se per un verso la porzione triazinica potrebbe rivelarsi capace di originare specie alchilanti di substrati biologici, dall'altro l'estesa aromaticità del cromoforo tricyclico e la presenza di eteroatomi, quali zolfo o ossigeno, potrebbe esaltare le eventuali abilità di interazione con il DNA.



18 X: CH, N
Y: S, O

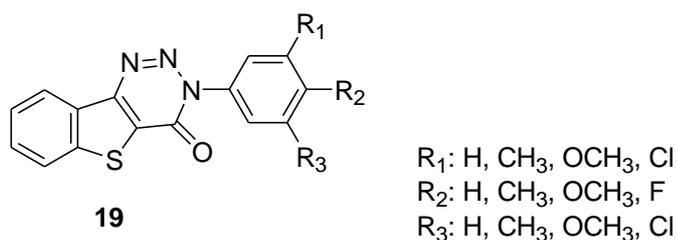
Inoltre le varie metodologie di sintesi utilizzabili per l'ottenimento dei prodotti oggetto del mio studio prevedono l'impiego di intermedi chiave (derivati triazenici ed analoghi) che possono essi stessi risultare interessanti quali potenziali agenti chemioterapici.

5.RISULTATI E DISCUSSIONE

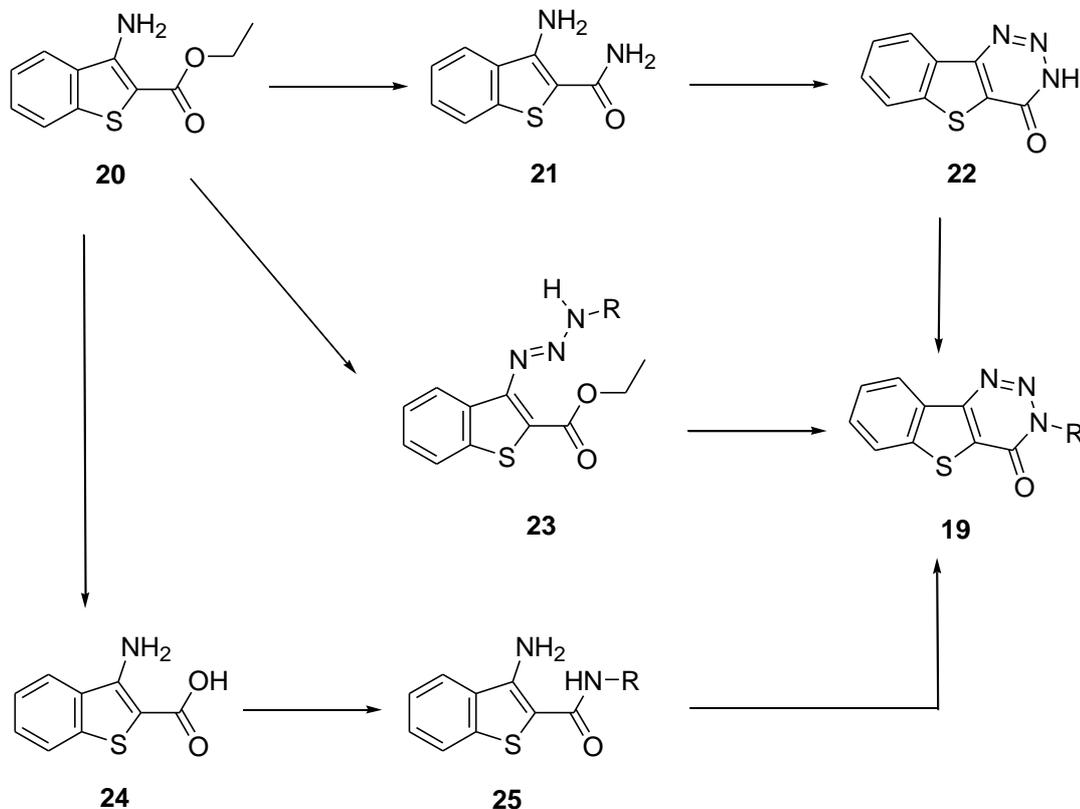
a.Sintesi

i.Benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazine

Mi sono inizialmente interessata allo studio dei derivati nucleo benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazinico di tipo **19** che poteva risultare interessante per la presenza della porzione tiofenica e della porzione triazinica, oltre che per un'aromaticità sufficientemente estesa del sistema.



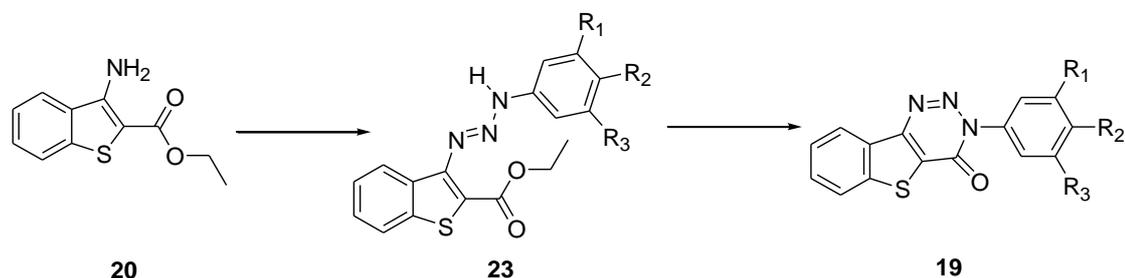
Anche se in letteratura sono state riportate procedure per la sintesi del nucleo benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazinico [33], non sono noti dati sull'attività biologica con l'eccezione dell'attività anti-dislipidemica da parte di alcuni tetraidroderivati [34-36].



Schema 4

Le strategie sintetiche per la preparazione di questi composti sono varie e prevedono la formazione di intermedi che potrebbero risultare più o meno interessanti anche dal punto di vista dell'attività biologica. Il prodotto di partenza è in ogni caso il derivato etil 3-aminobenzo[b]tiofene-2-carbossilato (**20**) (Schema 4).

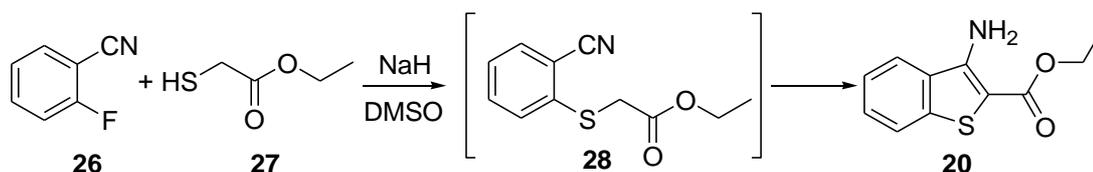
La via sintetica che tuttavia è risultata di maggiore interesse prevede la formazione di intermedi triazenici, composti anch'essi potenzialmente importanti dal punto di vista dell'attività farmaceutica, i quali successivamente vengono fatti ciclizzare a triazine. Questa metodica presenta inoltre il vantaggio di un minor numero di passaggi sintetici (Schema 5).



Schema 5

Secondo quanto previsto da questo iter sintetico, si sono studiate le reazioni di diazotazione che hanno permesso di isolare gli intermedi triazenici **23**. Tali reazioni coinvolgono un substrato aromatico primario, un acido (HCl, H₂SO₄, AcOH) che permette di liberare un radicale nitroso ed un nitrito alcalino (in genere NaNO₂) che porta alla formazione della corrispondente specie eteroarildiazonio. Questo viene quindi fatto copulare, in ambiente neutro, con le opportune amine dando origine ai composti **23**.

Il composto di partenza per la sintesi dei derivati triazenici, l'etil 3-aminobenzo[b]tiofene-2-carbossilato (**20**), particolarmente interessante per la possibilità di sfruttare la reattività della funzione amminica e dell'adiacente gruppo carbossietilico, è ottenuto in un unico stadio per reazione di 2-fluorobenzonitrile (**26**) con etil tioglicolato (**27**) utilizzando dimetilsolfossido come solvente in ambiente basico (resa 96%) [37] (Schema 6).

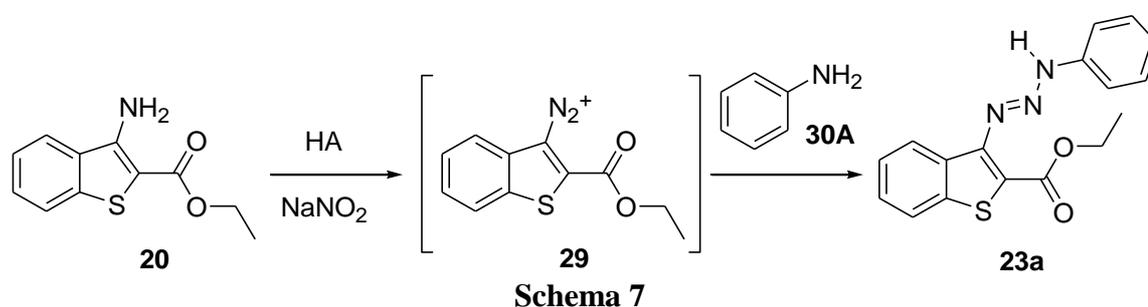


Schema 6

La reazione è condotta a temperatura ambiente ed in condizioni rigorosamente anidre. Il meccanismo di reazione ipotizzato prevede una sostituzione nucleofila aromatica dell'alogeno da parte del gruppo tiolico dell'etil tioglicolato e la conseguente formazione dell'intermedio **28**. Quest'ultimo, in presenza di idruro di sodio, da origine all'anione metilenico che mediante attacco al carbonitrile porta alla ciclizzazione intramolecolare con la formazione del nucleo **20**.

Questo composto è quindi convertito nei corrispondenti triazeni **23** per reazione di diazotazione e copulazione con amine primarie opportunamente scelte.

Inizialmente si è deciso di condurre delle reazioni pilota per individuare le condizioni di reazione ottimali (Schema 7).



Il 3-aminobenzotiofene **20** viene diazotato in ambiente acido ed il corrispondente sale di 3-diazonio-2-etossicarbonilbenzotiofene (**29**) è poi posto a reagire con un eccesso di anilina (**30A**) per formare l'atteso 3-triazenobenzotiofene **23a**.

Le diverse condizioni di reazione utilizzate hanno previsto la variazione della forza dell'acido, passando dall'acido cloridrico diluito (metodo A), che non ha permesso la formazione dell'intermedio sale di diazonio, ad acido acetico glaciale (metodo B) [17], mantenendo costante la base utilizzata per la neutralizzazione (carbonato di potassio). La reazione è stata condotta in atmosfera inerte, a 0°C e al riparo dalla luce.

Dopo la scomparsa del prodotto di partenza, monitorata tramite TLC, la miscela di reazione è stata neutralizzata con carbonato di potassio ottenendo così un precipitato giallo-arancio. Il sale di diazonio **29** è stato isolato mediante filtrazione e disidratato in essiccatore per una notte, mantenendo costantemente al riparo dalla luce. La successiva copulazione con anilina in DCM anidro ha portato alla formazione del derivato triazenico **23**, ma con rese molto basse.

Si è deciso allora di invertire il substrato da diazotare e l'agente copulante, per cui è stata effettuata la diazotazione dell'anilina in acido acetico glaciale con una quantità stechiometrica di nitrito di sodio (metodo C) seguita da copulazione con il derivato 3-

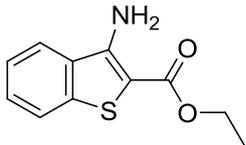
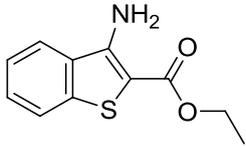
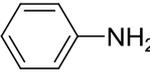
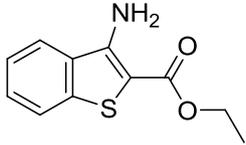
aminobenzotiofene. La scarsa nucleofilia dell'amina **20** non ha permesso una sostanziale formazione del triazene.

È stata anche condotta la diazotazione del derivato **20** in acido acetico glaciale, utilizzando un largo eccesso di acetato d'ammonio (metodo D); in questo caso si è deciso di formare il triazene senza isolare l'intermedio sale di diazonio.

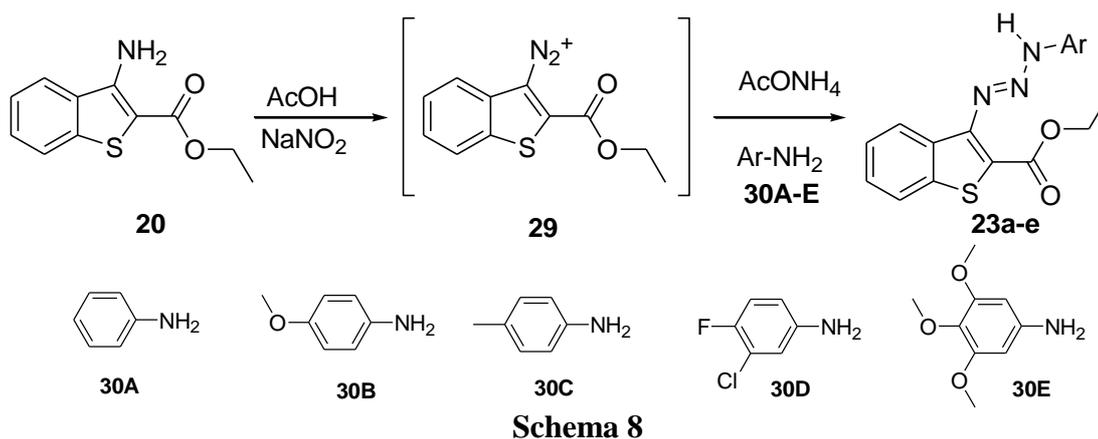
Come ultimo tentativo (metodo E) si è deciso di effettuare la diazotazione in una soluzione bifasica di HCl/DMF [38] in presenza di un largo eccesso di agente copulante. Tuttavia anche in questo caso non si è evidenziata la formazione di alcun prodotto.

Come è possibile osservare dai dati riportati nella Tabella 1, solo il metodo D ha permesso di ottenere rese accettabili.

Tabella 1

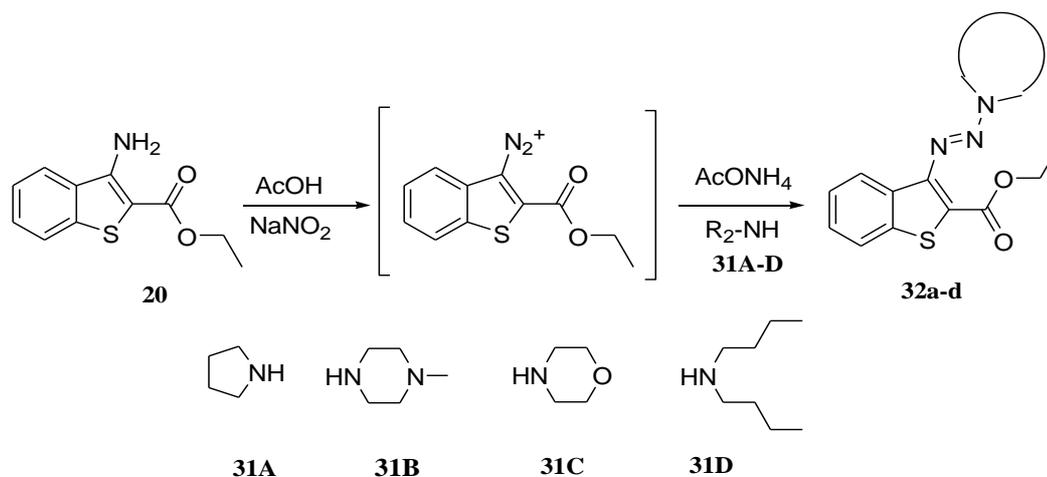
METODO	AMINA	CONDIZIONI	BASE	RESA
A		HCl	K ₂ CO ₃	0%
B		CH ₃ COOH	K ₂ CO ₃	25%
C		CH ₃ COOH	K ₂ CO ₃	10%
D		CH ₃ COOH	AcONH ₄	80%
E		HCl/DMF	Na ₂ CO ₃	0%

La procedura sperimentale utilizzata per la preparazione di tutti i triazeni ha quindi previsto la diazotazione del composto **20** in acido acetico glaciale con nitrito di sodio (1:2), al riparo dalla luce, alla temperatura di -10°C (Schema 8).

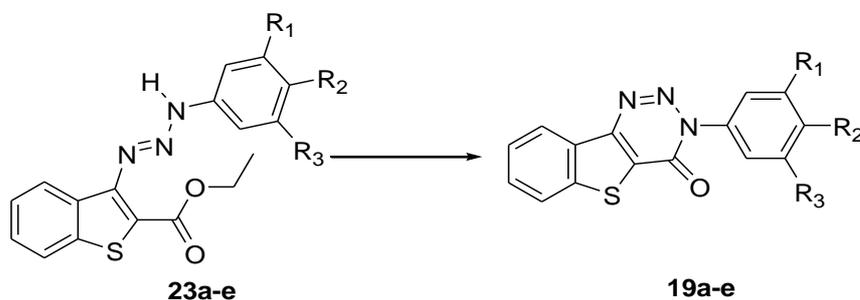


Dopo la scomparsa del prodotto di partenza, monitorata tramite TLC, sulla miscela di reazione è stata fatta percolare una soluzione di arilamina **30A-E** ed acetato d'ammonio nell'arco di 5-10 minuti, mantenendo la temperatura a -10°C . La miscela è stata lasciata ad agitare per un'ulteriore ora alla stessa temperatura di reazione. L'attacco nucleofilo del doppietto elettronico dell'azoto aminico sullo ione diazonio porta alla formazione del triazene. Il prodotto solido ottenuto è stato filtrato e cristallizzato da etanolo (resa 50-90%). Lo stretto controllo della temperatura a -10°C durante il processo di diazotazione e di copolazione è cruciale per ottenere rese elevate.

Considerata l'importanza rivestita nel campo dell'oncologia da parte dei triazeni e per studiare meglio le relazioni struttura-attività, si è deciso di ampliare la serie triazenica sintetizzando altri derivati mediante copolazione del sale di diazonio **29** con le amine secondarie **31A-D**. Utilizzando la metodica D è stato possibile preparare in buone rese i triazeni disostituiti **32a-d** (Schema 9).



I triazeni monosostituiti **23a-e** sono stati sottoposti a reazione di ciclizzazione per ottenere le triazine di tipo **19**. Il protocollo sperimentale ha previsto l'utilizzo di carbonato di potassio, in DMF anidra, riscaldando a 80°C per 3 ore (Schema 10).



Schema 10

I prodotti sono stati isolati in rese 50-80% ed identificati tramite analisi IR, NMR, e GC-MS. Attraverso un confronto degli spetti ^1H NMR, la conversione degli intermedi triazenici **23** in derivati triazinici di tipo **19** risulta evidente (Fig. 14).

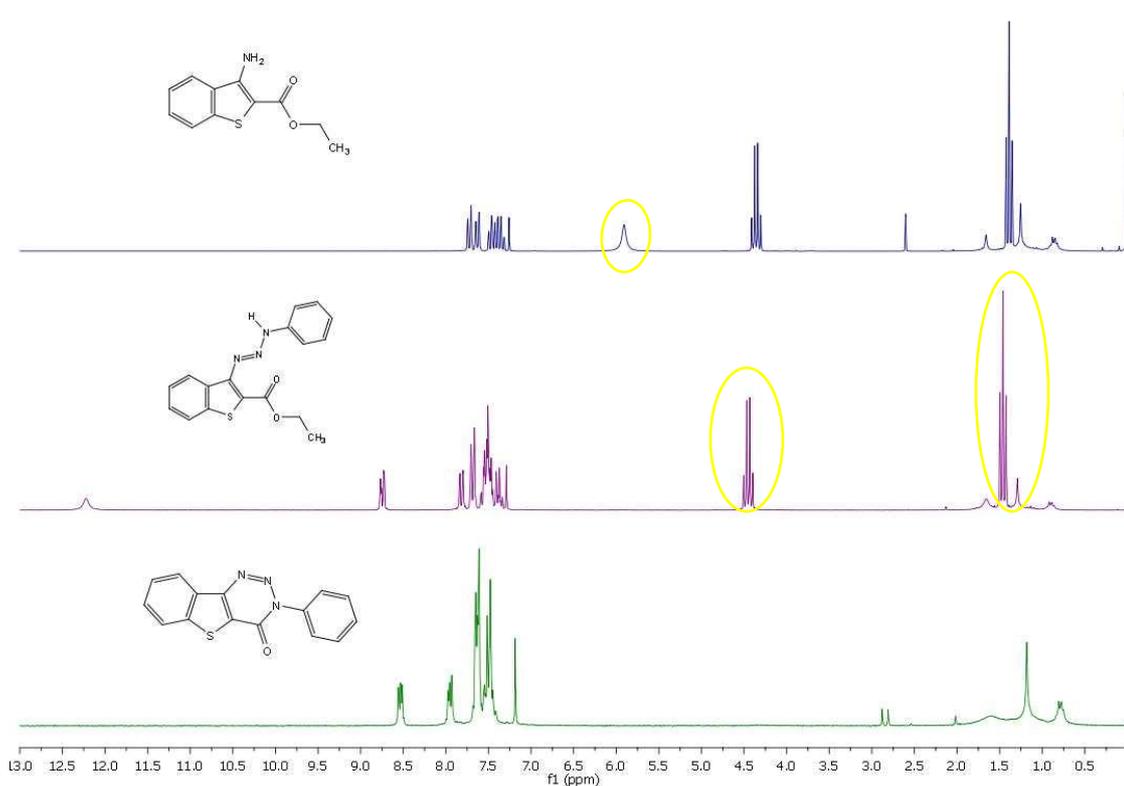


Figura 14. Spettri protonici a confronto

Passando, ad esempio, dallo spettro del derivato **20** a quello del composto **23a** si nota la scomparsa dei picchi dovuti a NH_2 del 3-aminobenzotiofene e la comparsa dei picchi attribuibili a NH triazenico, nonché di quelli del sostituente fenilico. Nello spettro del prodotto successivo di ciclizzazione **19a** si nota la scomparsa del picco di NH triazenico

e dei segnali dovuti al gruppo etilico, a conferma dell'avvenuta ciclizzazione. Inoltre tutti i derivati triazinici **19a-e** sono stati caratterizzati tramite analisi GC-MS che ha fornito un profilo molecolare dettagliato, permettendo di individuare lo ione molecolare di ciascun composto nonché il pattern di frammentazione (Fig. 15).

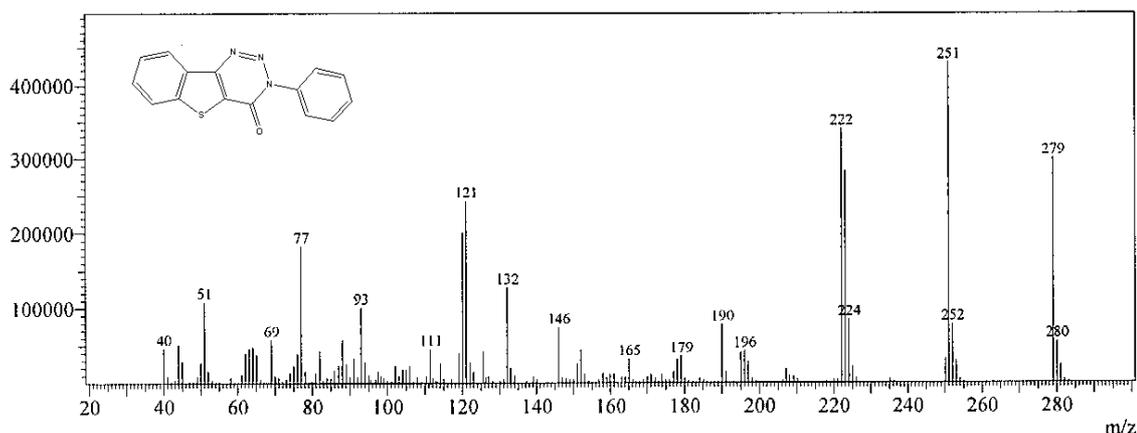
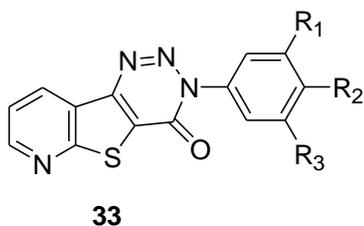


Figura 15

Dallo spettro riportato in Fig. 15 è possibile individuare lo ione molecolare (M^+ : $m/z=279$) relativo al derivato benzotriazinonico **19a**, il quale in seguito ad apertura della porzione triazinica subisce l'iniziale perdita del gruppo $N=N$, dando origine al picco base (M^+-28 : $m/z=251$). Questa caratteristica frammentazione delle triazine potrebbe trovare anche riscontro nel comportamento del nucleo che, in condizioni fisiologiche o in seguito a metabolismo, può essere capace di originare intermedi reattivi in grado di dare luogo ad alchilazione/arilazione dei siti nucleofili del DNA.

ii. Pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazine

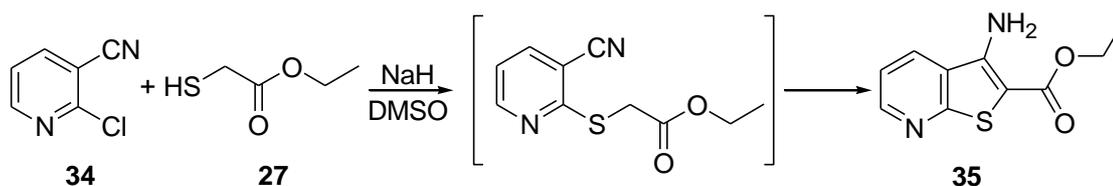
Modifiche isosteriche al nucleo benzotriazinonico hanno previsto l'introduzione di un eteroatomo nell'anello benzenico. È stato in questo modo possibile identificare una nuova serie di triazine: pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-oni di tipo **33**.



R₁: H, CH₃, OCH₃, Cl
R₂: H, CH₃, OCH₃, F
R₃: H, CH₃, OCH₃, Cl

Si è deciso per la preparazione dei derivati pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-oni di tipo **33**, di utilizzare un approccio analogo a quello dei derivati benzotiofenici, al fine di isolare anche gli intermedi triazenici.

In questo caso il prodotto di partenza è il derivato etil 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (**35**), ottenuto con procedura analoga a quella impiegata nel caso del derivato **20**, a partire dai composti commerciali 2-cloro-3-cianopiridina (**34**) ed etil tioglicolato, utilizzando le metodiche riportate in letteratura (resa 90%) [37] (Schema 11).



Schema 11

Il 3-aminopiridotiofene **35** viene diazotato in ambiente acido, ed il corrispondente sale di 3-diazonio-2-etossicarbonilpiridotiofene **36** è poi posto a reagire con un eccesso di anilina per formare il corrispondente triazene (Schema 12).

Al fine di individuare le condizioni di reazioni più idonee, anche in questo caso sono state effettuate delle reazioni pilota variando la forza dell'acido e la base utilizzata per la neutralizzazione (Tabella 2).

Tabella 2

METODO	RAPPORTO AMINA/NaNO₂	CONDIZIONI	BASE	RESA
A	1:10	CH₃COOH	AcONH₄ eccesso	0%
B	1:2	HCl	K₂CO₃ eccesso	10%
C	1:2	HCl	AcONa eccesso	30%
D	1:10	HCl	AcONH₄ eccesso	40%

In questo caso, un primo tentativo (metodo A) è stato effettuato in acido acetico glaciale, ma non è stato possibile evidenziare la formazione dell'intermedio sale di diazonio.

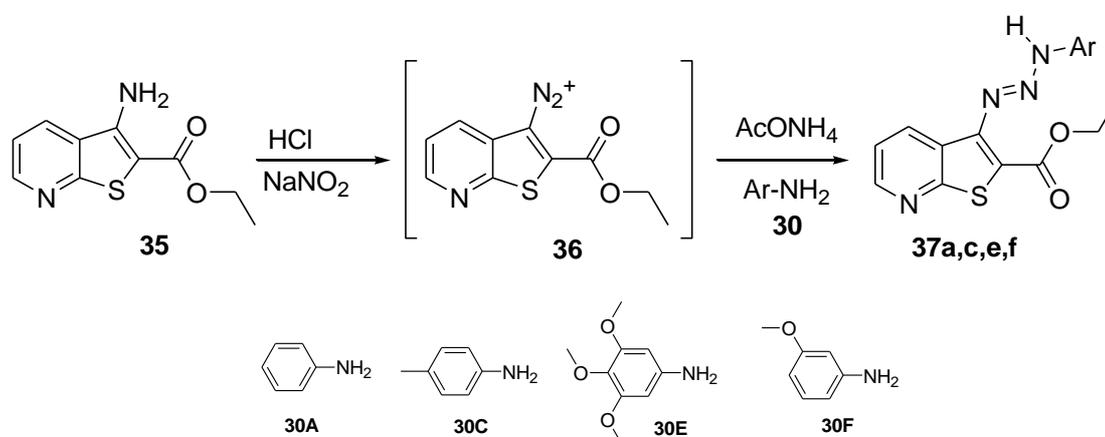
Si è deciso quindi di condurre la reazione in acido cloridrico 6N (metodo B). Il sale di diazonio formatosi è stato fatto copulare con l'anilina dopo aver neutralizzato

l'ambiente di reazione con carbonato di potassio. Il prodotto è stato isolato, tuttavia la resa è risultata piuttosto bassa.

Mantenendo le stesse condizioni di reazione (acido cloridrico 6N, temperatura a -10°C e al riparo dalla luce) è stato utilizzato per la neutralizzazione un eccesso di sodio acetato (metodo C). Ciò ha condotto ad un miglioramento della resa, ma solo quando si è utilizzato per la neutralizzazione acetato d'ammonio (metodo D) si riusciva ad incrementare la resa del composto **36** fino al 40%.

La diazotazione quindi dell'ammina **35** ha comunque presentato non pochi problemi. In acido acetico, pur variando la base e i rapporti molari dei reagenti, non si è mai riusciti ad evidenziare la formazione del derivato triazenico. Il sale di diazonio formatosi si decompone originando una serie di sottoprodotti. La miscela di reazione assume tra l'altro un aspetto gommoso di difficile lavorazione.

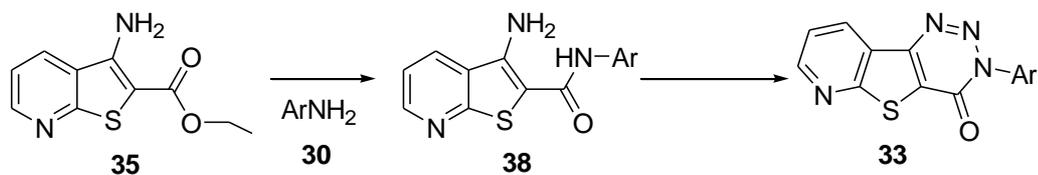
I vari triazeni sono quindi stati sintetizzati seguendo il metodo D. Il composto **35**, sospeso in acido cloridrico 6N è stato diazotato con nitrito di sodio (1:2) a -10°C . la miscela di reazione viene lasciata alla stessa temperatura per circa 30 minuti, verificando mediante TLC la formazione del sale di diazonio (Schema 12).



Schema 12

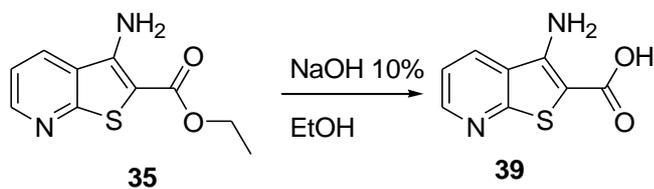
Il sale di diazonio così ottenuto viene fatto percolare in una miscela di acetato d'ammonio ed anilina, mantenendo la temperatura costantemente a -10°C . L'avvenuta reazione di copulazione è evidenziata dalla formazione di un precipitato che viene filtrato ed essiccato. Nonostante i derivati triazenici di tipo **37** vengano isolati, le rese (20-40%) non sono molto elevate ed inoltre il prodotto nella maggior parte dei casi si presenta come un solido gommoso difficile da trattare. Per cui, per la preparazione delle triazine, si è deciso di esplorare una metodologia alternativa di sintesi che prevede la

formazione di un intermedio amidico, ciclizzabile successivamente a triazina (Schema 13).



Schema 13

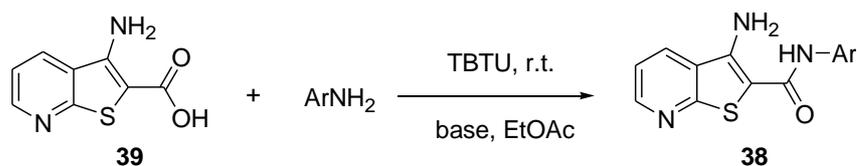
Ovviamente l'amide può essere preparata per reazione tra un acido carbossilico attivato e un'amina, per cui inizialmente si è effettuata l'idrolisi del derivato **35** ottenendo il corrispondente acido **39** (resa 100%) (Schema 14).



Schema 14

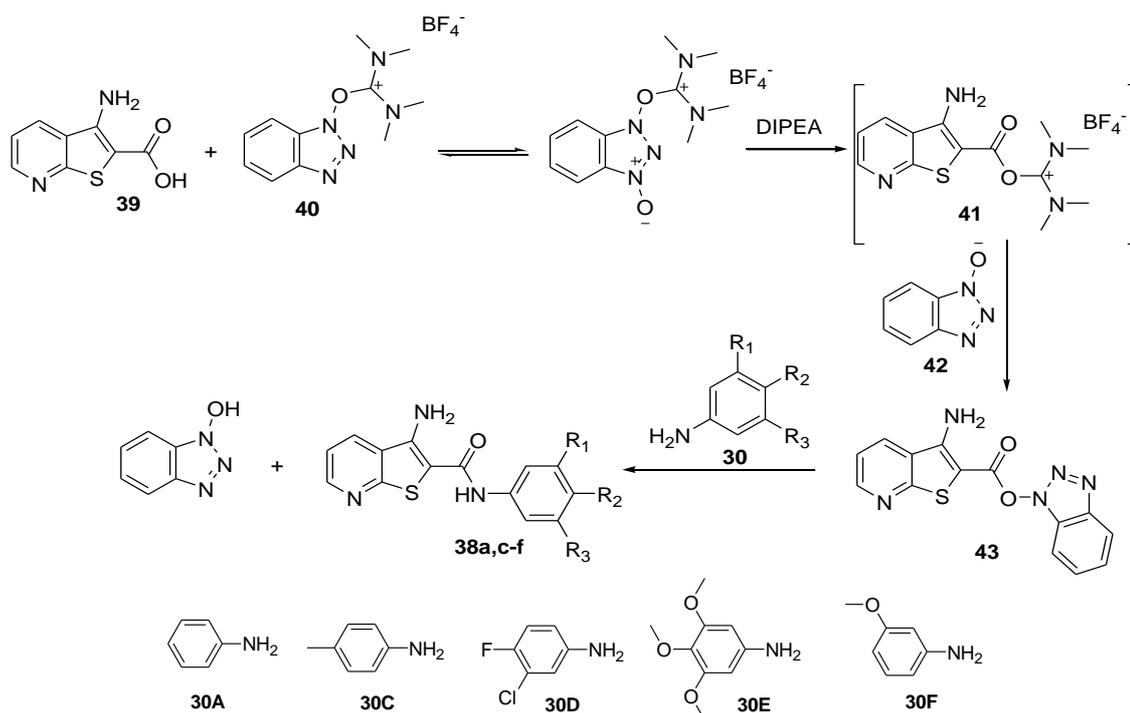
La copolazione di acidi carbossilici con una grande varietà di nucleofili è tra le più comuni trasformazioni nella chimica organica [39]. La sintesi dei composti amidici prevede l'attivazione del gruppo carbossilico ad un intermedio più reattivo come alogenuro acilico o anidride [40]. Vari sono gli agenti copulanti utilizzabili per l'attivazione del gruppo carbossilico: N,N-dicicloesilcarbodiimide (DCC) [41], TiCl_4 [42], fosfato attivato [43], $\text{Sn}[\text{N}(\text{TMS})_2]_2$ [44], N-alosuccinimide/ Ph_3P [45], $\text{Cl}_3\text{CCN}/\text{Ph}_3\text{P}$ [46], $\text{ArB}(\text{OH})_2$ [47], reagente di Lawesson [48], Boc-ODHBT (tert-butil-3-[3,4-diidrobenzotriazin-4-one]il carbonato) [49], $\text{Me}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$ e N,N-dimetilamina [50], SO_2ClF [31], cloro-sulfonilisocianato [33], tosil cloruro [51], and 2-mercaptopiridina-1-ossido [52]. Recentemente sono stati usati per la sintesi di peptidi sali di uranio e fosfonio come agenti copulanti (HOBt [53], HATU [54]).

In particolare il derivato TBTU 2-[(1H-Benzotriazolo-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium tetrafluoroborato] è stato ampiamente utilizzato in reazioni per la formazione di legame C-N [55]. Questo reagente presenta ottime caratteristiche: alta efficienza, possibilità di operare in quantità stechiometriche, solubilità nel solvente di reazione. Ciò permette di ottenere amidi in buone rese utilizzando blande condizioni di reazione. Così le reazioni tra acidi carbossilici aromatici e amine possono essere effettuate a temperatura ambiente.



Schema 15

Studi di cristallografia ai raggi X mostrano che TBTU esiste, allo stato solido, come uno zwitterione **40** tra una porzione triazol-N-ossido e una porzione guanidinica [56]. Nella procedura sperimentale è necessaria la presenza di una base, quale DIPEA (N,N'-diisopropiletilammina) o trietilammina, al fine di rimuovere l'idrogeno acido dell'acido carbossilico generando l'anione che reagisce con TBTU (Schema 16). L'intermedio acilossi-aminium/uronium **41**, non isolabile, reagisce immediatamente con il benzotriazolo **42** formando il composto **43**. Quest'ultimo a sua volta reagisce con l'ammina aromatica dando la corrispondente amide e rilasciando HOBt (1-idrossibenzotriazolo), prodotto solubile in acqua. Utilizzando questa metodologia è stato possibile isolare i derivati amidici **38a,c-f** (resa 50-70%).

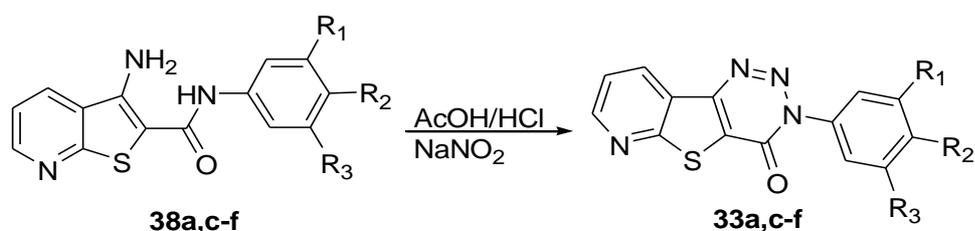


Schema 16

I composti di tipo **38** sono stati diazotati secondo le metodiche riportate in letteratura [30]. I derivati amidici, sospesi in una miscela di acido cloridrico concentrato ed acido acetico glaciale, vengono diazotati con nitrito di sodio (1:1). La miscela di reazione è

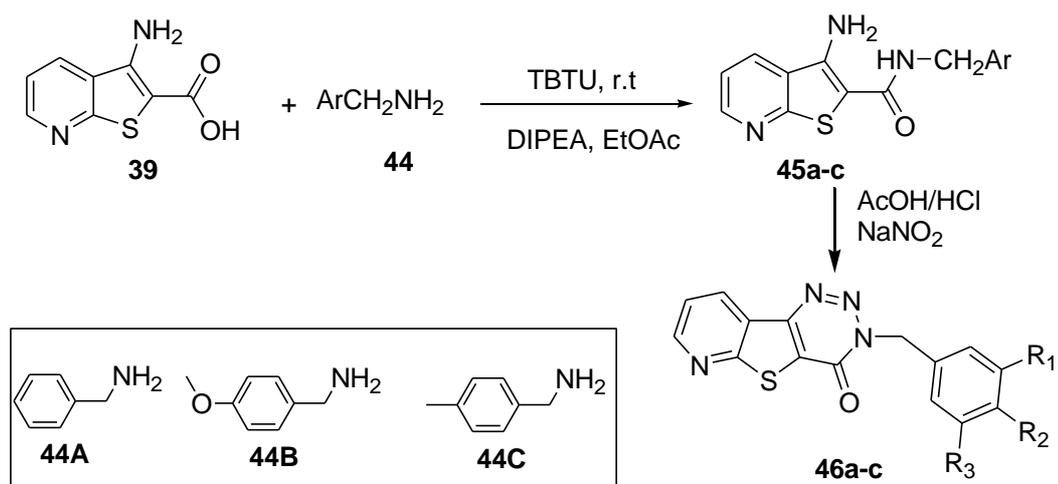
lasciata ad agitare per trenta minuti a -10°C , monitorando mediante TLC la scomparsa del prodotto di partenza (Schema 17). Il work-up della reazione prevede l'aggiunta di acqua e ghiaccio e filtrazione del solido ottenuto, che viene poi essiccato.

Tutti le strutture dei nuovi composti sono state confermate tramite analisi ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, e GC-MS.



Schema 17

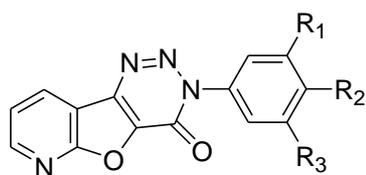
Utilizzando le sequenze di reazioni mostrate negli Schemi 16 e 17, si sono anche condotte reazioni di formazione delle amidi di tipo **45** per reazione con le benzilamine **44**. Si sono così preparate le triazine **46a-c** (Schema 18).



Schema 18

iii. *Pirido[3',2':4,5]furo[3,2-d]-1,2,3-triazine*

Altra modifica isosterica presa in considerazione ha comportato la sostituzione dell'anello tiofenico con quello furanico: sono stati selezionati così per la sintesi i derivati pirido-furo-triazinici di tipo **47**.



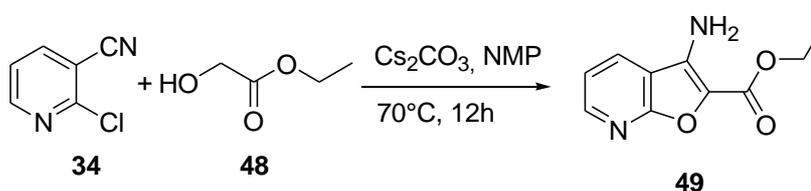
47

R₁: H, CH₃, OCH₃, Cl

R₂: H, CH₃, OCH₃, F

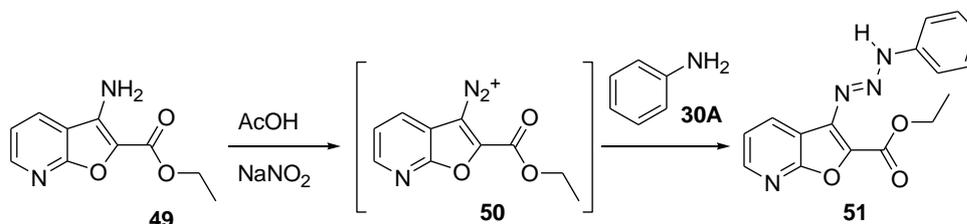
R₃: H, CH₃, OCH₃, Cl

Il precursore scelto per la sintesi è il derivato **49** (etil 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-carbossilato), ottenuto, secondo la metodica descritta in letteratura, per reazione di 2-cloro-3-cianopiridina (**34**) ed etil glicolato (**48**) in ambiente basico utilizzando come solvente NMP (N-metil-2-pirrolidone). La reazione è condotta in condizioni rigorosamente anidre a 70°C per 12 ore (Schema 19) [57].



Schema 19

Si è deciso di diazotare l'ammina furanica nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate per gli altri substrati isosterici (Schema 20). La reazione di diazotazione procede regolarmente e la banda tipica dei diazo-composti è perfettamente monitorabile tramite spettrofotometria IR.

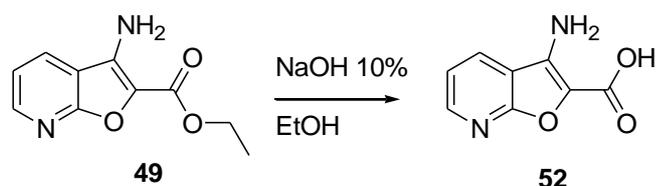


Schema 20

Tuttavia dopo la successiva aggiunta di anilina alla miscela di reazione non è stato possibile isolare il triazene, ma si sono ottenuti soltanto di prodotti di decomposizione di difficile identificazione. Anche in questo caso si sono variate le condizioni sperimentali, effettuando la reazione in HCl per verificare l'influenza del pH sull'andamento della reazione ed utilizzando anche per la neutralizzazione diverse basi (AcONH₄, K₂CO₃, Na₂CO₃). In nessun caso è stato possibile isolare il triazene **51**. I risultati ottenuti in questo caso evidenziano ancora una volta la netta differenza di reattività tra furani e tiofeni dovuta essenzialmente alla minore disponibilità del doppietto elettronico del gruppo amino-furanico, anche se in una reazione pilota,

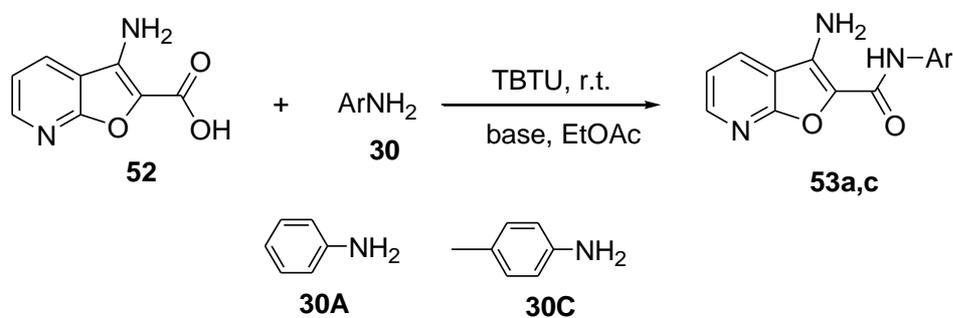
aggiungendo sodio azide durante la reazione di diazotazione è stato possibile evidenziare la formazione della corrispondente 3-azidofuro-piridina con la tipica banda IR a 2193 cm^{-1} .

Si è allora deciso, analogamente a quanto già fatto in serie pirido-tiofenica, di sintetizzare i derivati triazinici attraverso la formazione dell'intermedio amidico. Si è effettuata l'idrolisi del derivato **49** al fine di ottenere l'acido corrispondente (Schema 21). Il composto **49** è stato posto a refluxo con etanolo ed NaOH al 10% per 3 ore. È stato così possibile isolare il derivato **52** in rese quantitative.



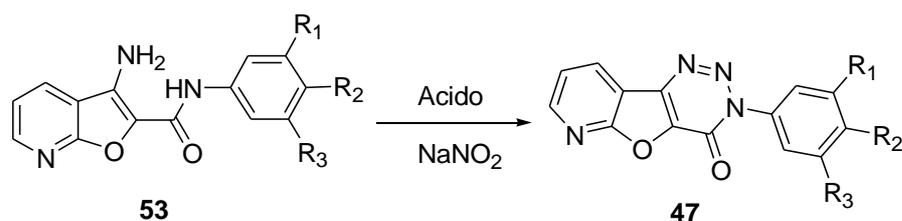
Schema 21

Si è quindi effettuato lo step successivo di amidazione del gruppo carbossilico. (Schema 22). Analogamente a quanto fatto nel caso dei derivati piridotiofenici, il composto è stato posto a reagire con le varie amine primarie in presenza di TBTU e DIPEA, utilizzando etile acetato come solvente. Sono stati così isolati i derivati amidici **53a,c** in buone rese.



Schema 22

I derivati amidici **53a,c** quindi sono stati sottoposti alla reazione di diazotazione a cui doveva seguire la chiusura del ciclo con formazione dei derivati triazinici (Schema 23).



Schema 23

Anche in questo caso sono state utilizzate le varie le condizioni sperimentali già impiegate nel caso degli altri substrati. Si è variata la forza dell'acido (HCl, AcOH) ed i rapporti stechiometrici substrato/nitrito di sodio (da 1:2 a 1:10). Tuttavia non è stato mai possibile isolare le triazine, ma si sono ottenuti sempre prodotti di decomposizione. In nessun caso quindi è stato possibile isolare i derivati pirido[3',2':4,5]furo[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-oni di tipo **47**. Comunque tutti questi risultati sperimentali sono in accordo con i dati riportati in letteratura sulla reattività di questo tipo di derivati furanici, evidenziati anche dall'andamento dei valori relativi alla costante decomposizione termica di eterocicli pentatomici α -azido [58].

b.Studi di Attività Biologica

i.Screenings Antiproliferativi del DTP

Tutti i derivati benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazinici di tipo **19** sono stati selezionati dal National Cancer Institute (NCI), nell'ambito del Developmental Therapeutic Program (DTP), per essere testati su un pannello di 60 linee cellulari umane derivanti da nove tipi di tumore: leucemia, tumore polmonare, tumore al colon, tumore al SNC, melanoma, tumore ovarico, tumore renale, tumore alla prostata e tumore mammario.

L'attività antitumorale di ogni composto testato è data da tre parametri relativi a ciascuna linea cellulare: il valore di pGI50 (GI50 è la concentrazione molare del composto che inibisce il 50% della crescita cellulare), il valore di pTG50 (TGI è la concentrazione molare del composto che porta alla totale inibizione della crescita cellulare), e il valore pLC50 (LC50 è la concentrazione molare del composto che induce la morte del 50% delle cellule trattate). L'insieme di tutti i dati relativi a ciascuno di questi parametri è sintetizzato, per ogni singolo composto, dal mean graph (MG) il quale fornisce il valore medio di attività su tutte le linee cellulari considerate.

Per ciascuno dei parametri di inibizione viene anche calcolato il "mean graph midpoint" (MG_MID) che rispecchia il valore medio di attività nei confronti di tutte le linee cellulari testate. Per il calcolo del MG_MID, le linee cellulari sensibili sono incluse con concentrazione più elevata.

La selettività di un composto nei confronti di una certa linea cellulare è caratterizzata da una elevata deviazione del parametro della particolare linea cellulare rispetto al valore MG_MID. Un mean graph è un modello creato tracciando i valori positivi e negativi

derivanti da un insieme di GI50, TGI50, o LC50. I valori positivi e negativi sono tracciati lungo una linea verticale che rappresenta la risposta media di tutte le linee cellulari del pannello verso il composto saggiato. Valori positivi, posti alla destra della linea verticale, rappresentano sensibilità cellulare per il composto saggiato superiore alla media. Valori negativi, posti a sinistra, rappresentano sensibilità di linee cellulari per il composto saggiato inferiore al valore medio.

Uno degli scopi di questa rappresentazione grafica è quello di rendere prioritaria per l'ulteriore valutazione l'attività dei composti, di sintesi o naturali, che mostrano attività antiproliferativa selettiva nei confronti di particolari linee cellulari tumorali. Questa metodologia di screening ha specifiche peculiarità in quanto la complessità della risposta rispetto alle 60 linee cellulari prodotta dal composto in esame produce un pattern di risposta biologica che lo caratterizza in modo specifico e che può essere utilizzato dagli algoritmi di "pattern recognition" (quali ad esempio il programma COMPARE). Inoltre poiché è possibile caratterizzare i bersagli molecolari cellulari delle 60 linee che costituiscono il pannello di cellule saggiate è possibile suggerire un probabile meccanismo d'azione per il composto in esame.

Attualmente lo screening è un processo in due fasi che inizia con la valutazione di tutti i composti contro le 60 linee cellulari alla singola dose di 10 µM.

I composti vengono inoculati ad un'unica concentrazione e le colture cellulari sono incubate per 48 ore. I dati vengono riportati come percentuale della crescita cellulare rispetto al controllo. I derivati che presentano una significativa inibizione della crescita (inferiore al 32%) vengono valutati contro il pannello di 60 linee cellulari a cinque concentrazioni, comprese tra 10⁻⁴ e 10⁻⁸M.

Nella prima fase di screening alcuni dei derivati hanno mostrato una lieve attività anti-proliferativa, senza tuttavia scendere al di sotto del 32 % discriminante per il successivo screening. I derivati **19b-d**, viceversa, hanno evidenziato mostrato una notevole attività inibitoria della crescita cellulare tale da permettere lo screening a 5 dosi.

Tabella 3

Derivato	# di linee cellulari saggiate	# di linee cellulari con risposta positiva	pGI₅₀ Range	MG_MID
19b	34	8	5.76÷4.00	-4.39
19c	58	47	5.81÷4.00	-4.88
19d	58	26	5.90÷4.00	-5.02

Analizzando i dati dello screening antiproliferativo è stato possibile evidenziare il numero di linee cellulari sensibili: 47/58 nel caso del derivato **19c**, 26/58 per il derivato **19b**, ma solamente 8/34 nel caso della triazina **19b** (Tabella 3).

Tutti questi tre derivati risultano attivi a concentrazioni micromolari, con valori di MG_MID nel range $-4.39 \div -5.02$. In particolare nel caso del derivato **19b**, sono risultate suscettibili solo le linee cellulari appartenenti ai pannelli del cancro ovarico e renale, con valori di pGI50 nel range 5.62-5.74 e 5.44-5.68, rispettivamente (Fig. 16). Una modesta attività è stata anche evidenziata nei confronti della linea cellulare SNB-75 del cancro a cervello, CAKI-1 del cancro a rene e HCT-116 del cancro al colon (con valori di pGI50 compresi tra 5.55-5.76). Sorprende invece la totale assenza di attività nei confronti delle linee cellulari leucemiche, normalmente responsive alla quasi totalità dei composti selezionati nell'ambito del DTP.

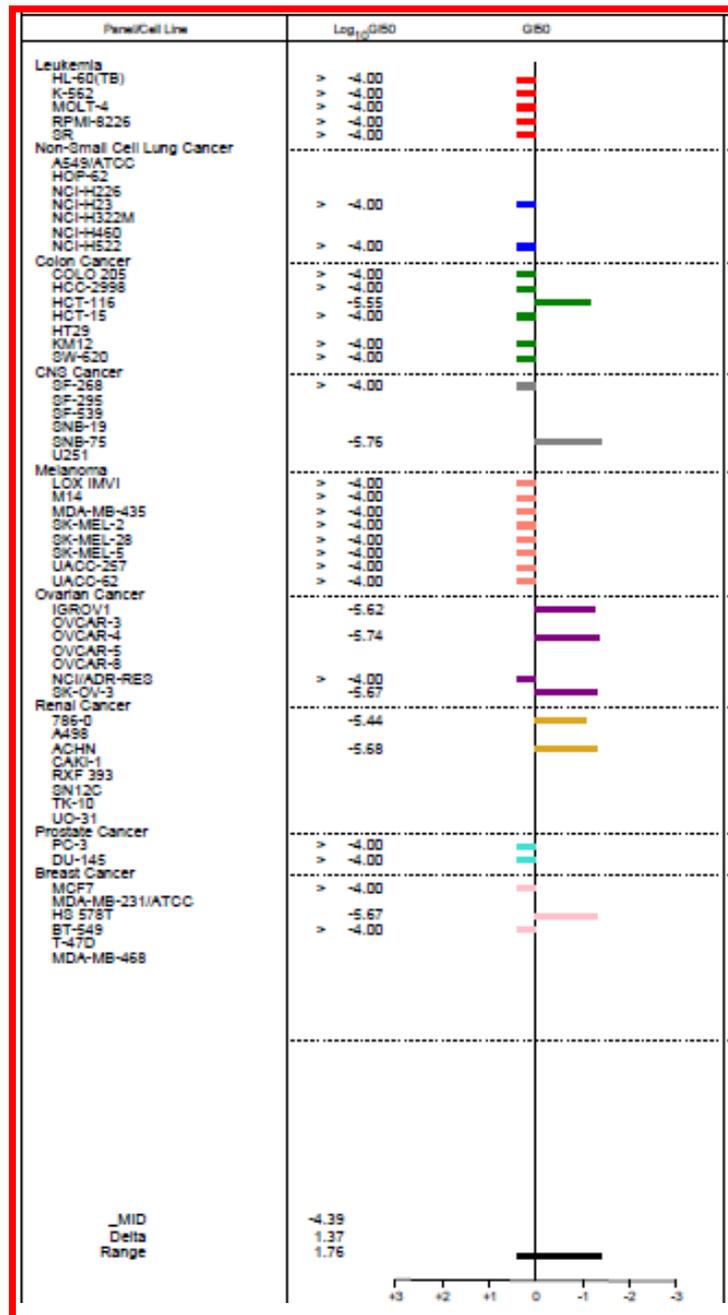


Figura 16. Mean Graph del derivato 19b

Più interessanti si sono invece rivelati i derivati 19c e 19d i quali presentano elevata sensibilità su un buon numero di linee cellulari (Fig. 16 e 17). Particolarmente attivi si sono dimostrati nei confronti delle non small cell lung cancer, con valori di MG_MID sul pannello, ben più elevati del valore medio totale (MG_MID = -4.88 e -5.02, rispettivamente) (Tabella 4).

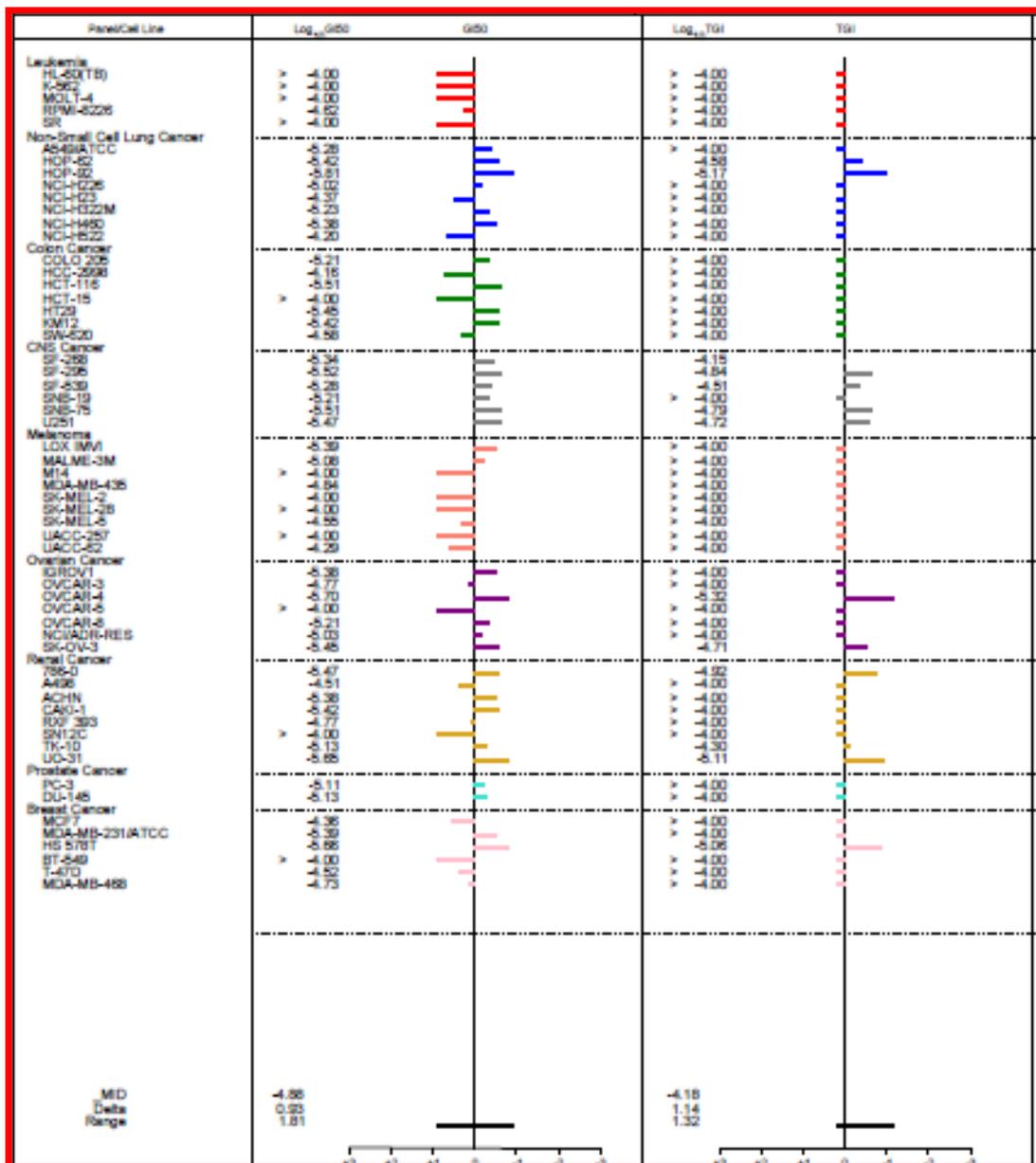


Figura 17. Mean Graph del derivato 19c

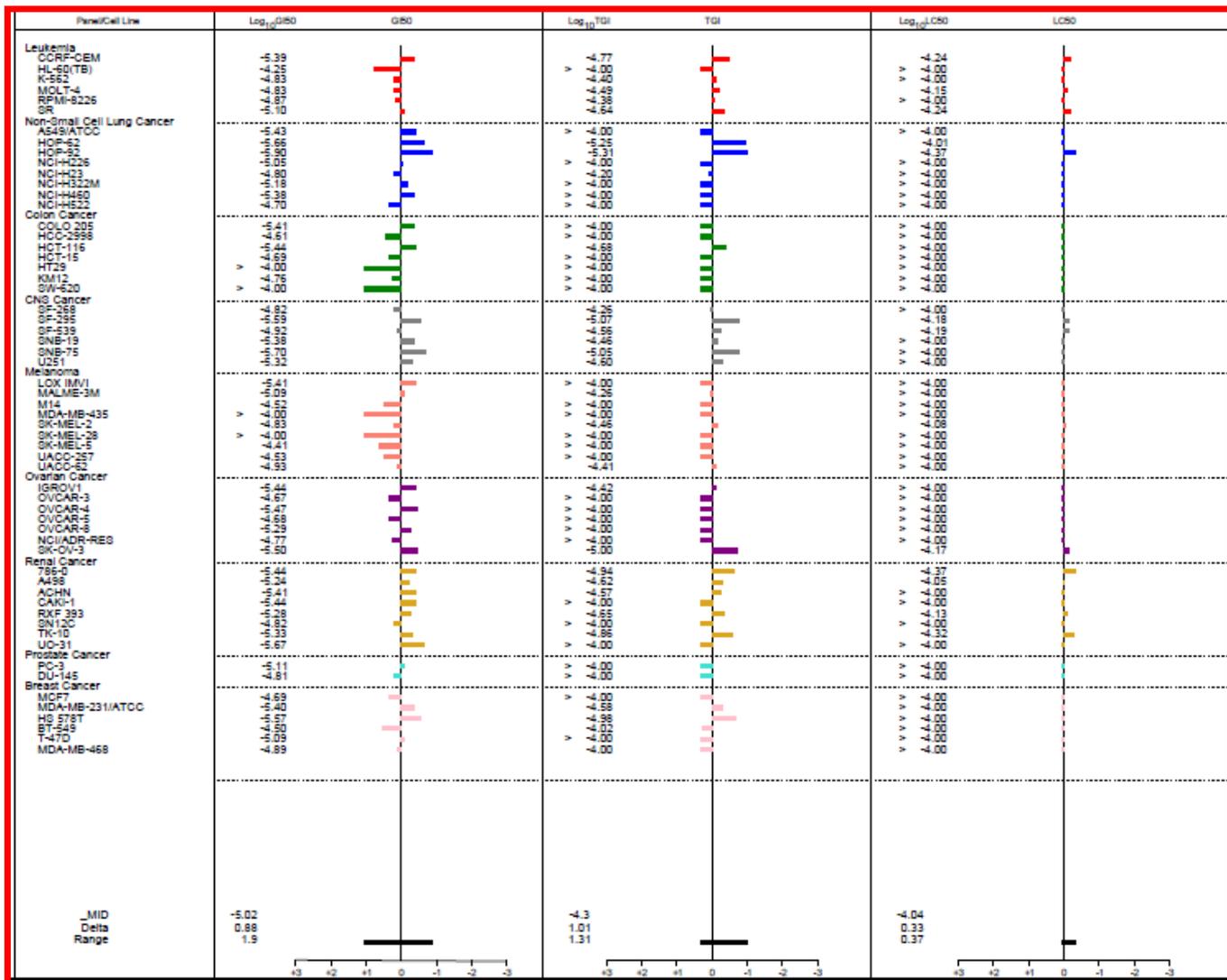


Figura 18. Mean Graph del derivato 19d

Tabella 4

Non small cell lung cancer	pGI50	
	19c	19d
A549/ATCC	5.28	5.43
HOP-62	5.42	5.66
HOP-92	5.81	5.90
NCI-H226	5.02	5.05
NCI-H23	4.37	4.80
NCI-H322M	5.23	5.18
NCI-H460	5.38	5.38
NCI-H522	4.20	4.70
MG_MID (pannello)	-5.09	-5.26

Nonostante il derivato **19d** abbia un valore MG_MID più elevato rispetto al derivato **19c**, da un confronto dei mean graph dei due composti è evidente che il derivato **19c** esibisce un'attività migliore nei confronti di un maggior numero cellulare. La sua completa insensibilità nei confronti della linea leucemica e del melanoma fa sì che il valore medio di attività risulti non molto elevato, anche se il composto è capace di inibire le linee cellulari sensibili a concentrazioni micromolari.

Dai grafici dose/risposta del derivato più attivo **19c**, si può notare l'eccellente risposta di tutto il pannello polmonare, del cancro al colon, al sistema nervoso, e del cancro renale (Fig. 19).

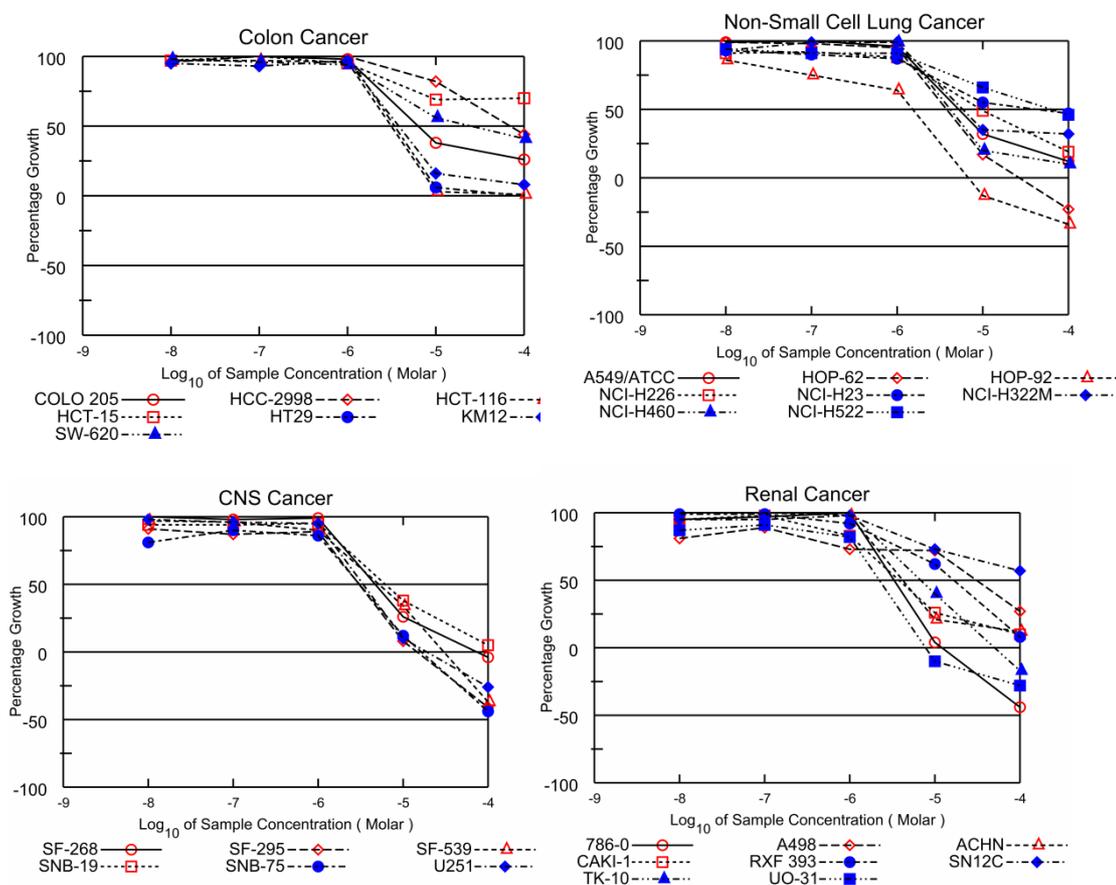


Figura 19

Interessante risulta anche l'inibizione di tutte le linee cellulari del tumore al rene da parte del composto **19d** con valori di MG_MID = -5.33 sul pannello, ben più elevati del valore medio totale (MG_MID = -5.02) (Fig. 20).

È particolarmente interessante notare che in tutti i casi studiati il valore di LC50 è sempre $>10^{-4}$ M, parecchi ordini di grandezza superiore al valore di GI50. Questi dati

permettono di ritenere dunque i derivati benzotriazinici agenti antiproliferativi dotati di ridotta tossicità.

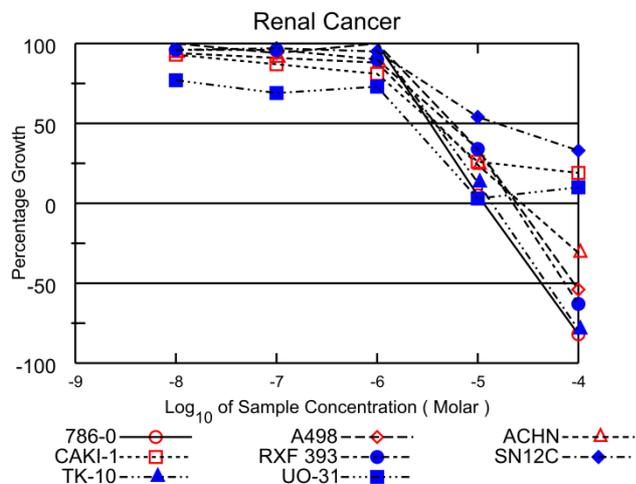


Figura 20

ii. Attività Antiproliferativa (saggio MTT)

I vari composti sintetizzati sono stati sottoposti a valutazione dell'attività antiproliferativa nei confronti di MCF-7 (linea cellulare del tumore mammario ormone-sensibile) ed anche sulla linea cellulare tumorale HeLa (human epithelial cervical cancer), non inclusa nel pannello dello screening del DTP-NCI, utilizzando il saggio MTT a 24/48 ore.

Questo saggio è un test colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura e quindi di valutare l'effetto del trattamento con il composto da saggiare sulla vitalità della popolazione cellulare. Il test si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione della concentrazione di MTT porta alla formazione di cristalli di un prodotto, il formazano, insolubile in acqua (Fig. 21). Le cellule vitali, a differenza di quelle non vitali riducono MTT e l'aumentare del formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule presenti. I cristalli formati vengono solubilizzati e i valori di assorbanza rilevati mediante lettura al multiwell reader Ascent a 540 nm.

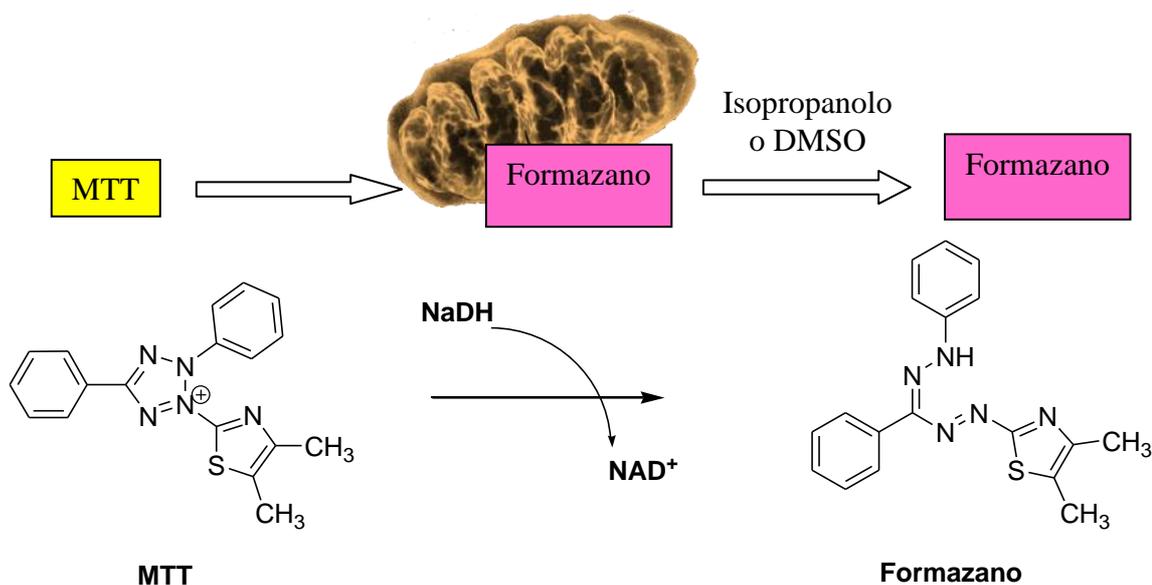


Figura 21. Metabolismo di MTT nel mitocondrio

Tutti i composti testati hanno mostrato citotossicità concentrazione-dipendente, ma l'effetto antiproliferativo è stato raggiunto con differente efficacia. I valori GI50 di determinati per i derivati benzotriazinici **19a-e** sono riportati nella Tabella 5. Le triazine **19b-d** sono risultate le più attive, mostrando un forte effetto citotossico con valori di GI50 a 24 h nel basso range micromolare (6.35 ± 0.74 , 5.32 ± 0.47 , e 4.37 ± 0.83 , rispettivamente).

Tabella 5. Citotossicità nei confronti delle cellule HeLa a 24 ore

Derivato	GI50 ± SE (µM)	Derivato	GI50 ± SE (µM)
19a	18.57 ± 1.52	23a	49.34 ± 3.42
19b	4.37 ± 0.83	23b	49.09 ± 3.91
19c	5.32 ± 0.47	23c	42.08 ± 4.13
19d	6.35 ± 0.74	23d	31.36 ± 2.81
19e	20.69 ± 1.31	23e	22.76 ± 1.97

Considerata anche l'interessante attività antiproliferativa mostrata dai triazeni studiati in precedenza dal gruppo di ricerca [14,16,59,60], si è deciso di sottoporre ai saggi di vitalità cellulare nei confronti della linea cellulare tumorale HeLa anche gli intermedi triazeni **23a-e**. Come è possibile notare dai dati riportati nella Tabella 5, tutti i composti

testati hanno mostrato citotossicità concentrazione-dipendente, ma l'effetto antiproliferativo è inferiore rispetto ai derivati triazinici.

In generale, i triazeni hanno mostrato scarsi effetti antiproliferativi con valori di GI50 > 20 μM a 24 h, mentre le corrispondenti triazine sono risultate più attive con valori di GI50 compresi tra 4.37 e 20.69 μM. Solo nel caso dei derivati trimetossi sostituiti (composti di tipo **e**) non è stata osservata alcuna differenza significativa tra triazene e l'analogo triazinico (22.76 ± 1.97 e 20.69 ± 1.31 μM, rispettivamente).

Per quanto riguarda l'attività antiproliferativa dei triazeni è possibile evidenziare come in questo caso la presenza dell'anello di tiofenenico, a differenza di quanto si osserva per i pirrolo derivati [16], rende la porzione triazenica più stabile e di conseguenza meno reattiva in ambiente biologico.

Infine, come determinato dal saggio LDH (lattato deidrogenasi), tutti i composti esaminati nell'intervallo di concentrazione 1-50 μM non hanno influenzato l'integrità della membrana plasmatica della linea cellulare HeLa (dati non mostrati).

Anche i benzotieno-triazeni di sostituiti **32a-d** sono stati saggiati per evidenziarne l'eventuale attività antiproliferativa nei confronti delle cellule tumorali MCF-7. Tutti i composti testati hanno mostrato citotossicità concentrazione-dipendente, ma l'effetto antiproliferativo è stato raggiunto con differente efficacia. I valori GI50 di determinati per i derivati benzotienotriazeni di tipo **32** sono riportati nella Tabella 6.

In generale, i triazeni hanno mostrato interessanti effetti antiproliferativi con valori $27.89 \mu\text{M} < \text{GI50} < 8.13 \mu\text{M}$ a 48 h. Il comportamento del derivato **32c**, il più attivo della serie, è stato anche studiato mediante esperimenti di perturbazione del ciclo cellulare (vedi oltre).

Tabella 6. Citotossicità nei confronti delle cellule MCF-7 a 48 ore

Derivato	GI50 ± SE (μM)
32a	17.07 ± 0.82
32b	16.60 ± 1.04
32c	8.13 ± 0.79
32d	27.89 ± 1.23

Anche per i derivati della serie piridotienotriazinica **33a,c-e**, isosteri dei composti benzotienotriazinici di tipo **19**, è stata analizzata l'attività antiproliferativa nelle stesse

condizioni sperimentali, ed i risultati sono riportati in Tabella 7. In questo caso le triazine non hanno evidenziato particolare attività citotossica e i valori di GI50 risultano nel range 20-46 μM .

Tabella 7. Citotossicità nei confronti delle cellule MCF-7 a 48 ore

Derivato	GI50 \pm SE (μM)
33a	27.17 \pm 2.07
33c	46.43 \pm 3.47
33d	28.74 \pm 1.86
33e	> 20

iii. Studi Computazionali

I. Analisi VLAK: Di recente approcci *in silico* nella progettazione di composti eterociclici con attività biologica [61,62] hanno permesso di studiare specifici target coinvolti nei processi carcinogenici [63-65], nonché di migliorare l'attività antiproliferativa di diverse classi di composti eterociclici [61,66,67].

Allo scopo di ottenere informazioni sul meccanismo d'azione, i derivati benzotieno [3,2-d]-1,2,3-triazinici **19**, sono stati sottoposti al protocollo VLAK (Virtual Lock-and-Key), recentemente sviluppato nell'ambito degli studi di modellistica molecolare condotti dal gruppo di ricerca con cui ho collaborato durante il dottorato [68].

Il primo passo del protocollo VLAK è la conversione del meccanismo di azione o del target biologico in un "modello lock", in cui le chiavi (le strutture) potrebbero essere "fittate" [68]. Come fonte per la realizzazione del modello lock è stata scelta il Database ACAM (AntiCancer Agent Mechanism) del NCI, che consiste in una raccolta di strutture con attività antitumorale ed un meccanismo d'azione noto. Per ogni struttura sono disponibili dati di screening sulla capacità di inibizione della crescita cellulare sul pannello di circa 60 linee cellulari tumorali umane, e tutte le molecole saggiate sono state esplicitamente progettate per essere utilizzabili nella rete neurale e per l'analisi multivariata [69,70].

In particolare, questo database è costituito da 121 farmaci antitumorali classificati per il loro meccanismo di azione, che può essere considerato come il target biologico nel protocollo. E' stato scelto il Database ACAM perché è stato dimostrato che i descrittori

molecolari, mediante analisi multivariata, sono in grado di discriminare i meccanismi di azione dei farmaci [71].

Tramite il protocollo VLAK è stato assegnato ai derivati benztieno[3,2-d]-1,2,3-triazinici la percentuale di affinità (A%) rispetto a sei meccanismi di azione: agenti alchilanti, agenti antimetaboliti, inibitori della topoisomerasi I, inibitori della topoisomerasi II inibitori, RNA/DNA antimetaboliti e DNA antimetaboliti. La Tabella 8 riporta i risultati ottenuti per le benztieno[3,2-d]-1,2,3-triazine.

Tabella 8

Derivato	MA (A%)*					
	A	B	C	D	E	F
19a	55	44	39	48	53	53
19b	59	48	43	51	56	56
19c	57	46	41	49	54	54
19d	58	43	38	48	53	53
19e	59	49	47	54	57	55

*MA, meccanismo d'azione; A%, percentuale di affinità; A, Agenti alchilanti; B, Agenti antimetaboliti; C, Inibitori Topoisomerasi I; D, Inibitori Topoisomerasi II; E, Antimetaboliti RNA/DNA; F, Antimetaboliti DNA.

Analizzando i risultati, è possibile evidenziare come i derivati benztieno[3,2-d]-1,2,3-triazinici di tipo **19** siano classificati prevalentemente come agenti alchilanti (A). Questa tendenza, anche se non forte, suggerisce che l'attività antiproliferativa dei derivati benztienotriazinici potrebbe essere correlata anche ad interazioni o a danni del DNA con conseguente interferenza con la sua sintesi.

2. Analisi COMPARE: L'innomerevole quantità di dati raccolti da NCI riguardanti lo screening *in vitro* di migliaia di derivati saggiati sul pannello delle 60 linee cellulari tumorali è stata immagazzinata in numerosi databases e resa disponibile per studi computazionali. Di particolare importanza è lo standard agents database (SAD) che include 175 composti di cui sono disponibili i dati di attività antitumorale in termini di GI50, TGI, e LC50, e per i quali è in genere noto il meccanismo d'azione.

Questi database possono essere utilizzati dal COMPARE, una metodologia disponibile online, mediante la quale è possibile verificare la similarità e pertanto il meccanismo di azione di un composto nei confronti di un altro preso come riferimento, a condizione che si abbiano a disposizione per il derivato da testare i dati di attività antiproliferativa

relativamente al set di 60 linee cellulari standard. Il responso viene fornito in termini di un coefficiente (PCC = Pearson Correlation Coefficient) che fornisce una misura della sua similarità. Il coefficiente di correlazione varia da 0.00 a 1.00, più il valore si avvicina a 1, migliore risulta la correlazione.

I derivati benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazinici **19c** e **19d** sono stati utilizzati quindi come seeds per l'analisi COMPARE. I valori di PCC ottenuti non sono risultati particolarmente elevati: 0.432-0.316 nel caso di **19c** e leggermente più alto (0.492-0.445) per il composto **19d**. E' stato comunque possibile individuare analogie nel profilo di attività tra i composti da noi sintetizzati ed alcuni degli agenti inclusi nel database (Fig. 22). In particolare per entrambe le benzotienotriazine si evince particolare analogia con la rapamicina, un potente agente antiproliferativo che arresta il ciclo cellulare in fase G1 attraverso svariati meccanismi che coinvolgono, nei mammiferi, l'inibizione del pathway della proteina chinasi mTOR [72].

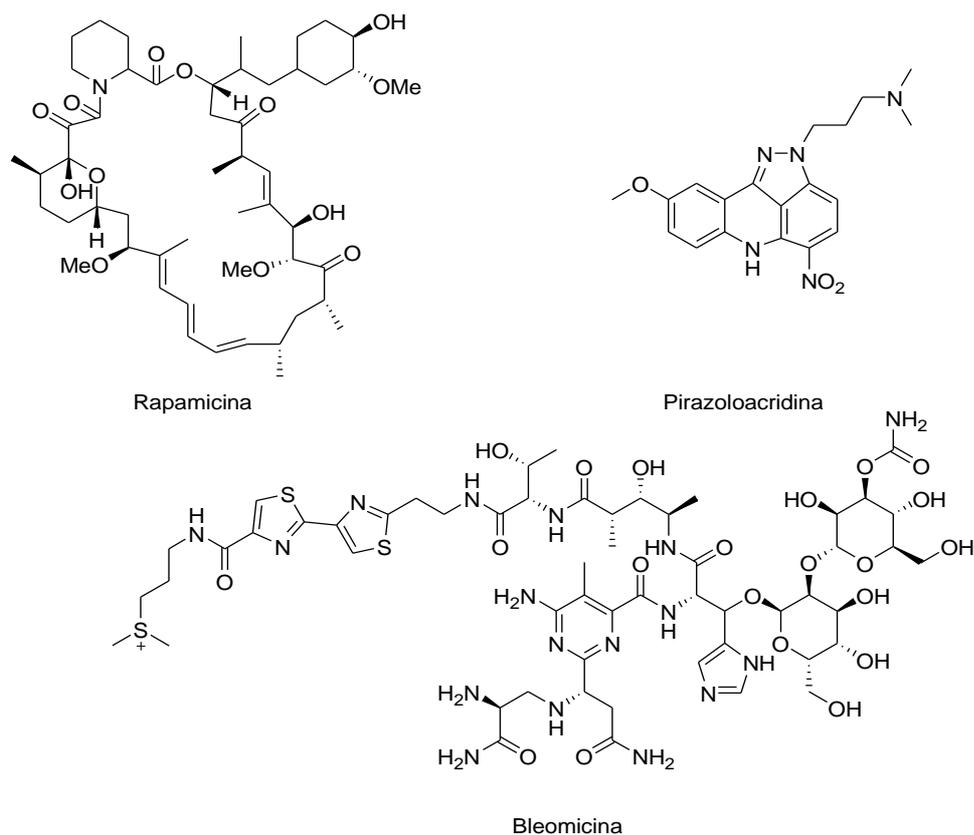


Figura 22

Il derivato **19c** inoltre presenta particolare similarità con la pirazoloacridina, derivato sintetico dell'acridina, primo di una nuova classe di composti sottoposti a test clinici

che ha mostrato attività selettiva contro le cellule di tumori solidi e citotossicità in cellule ipossiche, e che agisce da agente intercalante avendo come bersaglio le Topoisomerasi I e II [73].

La triazina **19d** mostra inoltre analogia con la bleomicina, un glicopeptide naturale con attività anticancro, che induce danno sia al singolo che al doppio filamento del DNA in presenza di cofattori. Più recentemente è stato dimostrato che la rottura può avvenire mediante intercalazione della porzione tiazolica all'estremità 3' del DNA causando una iniziale rottura che facilita la sua riattivazione e riorganizzazione [74].

Sulla base degli interessanti risultati ottenuti dalle analisi dei dati (screenings biologici ed *in silico*) per delucidare il meccanismo dell'attività antiproliferativa, si è deciso di analizzare l'eventuale capacità di interazione dei derivati di tipo **19** con il DNA.

iv. Studi di interazione con il DNA

Per tutti i derivati che hanno mostrato attività antiproliferativa sono stati effettuati studi di interazione con DNA nativo di timo di vitello (ct-DNA), utilizzando tecniche spettrofotometriche (UV-Vis, dicroismo circolare), anche a temperatura variabile.

La spettroscopia UV-Vis ed il CD (dicroismo circolare) consentono di determinare la conformazione globale di acidi nucleici, se paragonati a spettri di campioni a struttura nota. Attraverso l'analisi accurata dei cambiamenti negli spettri si possono studiare transizioni conformazionali da B verso altre forme, come pure la denaturazione del DNA, con il vantaggio di poter applicare tali tecniche a soluzioni di DNA nativo. Le due tecniche spettroscopiche sono per alcuni versi complementari: la spettroscopia di assorbimento UV-Vis è molto utile per seguire la denaturazione di DNA; infatti l'aumento della distanza tra basi azotate sovrapposte, in seguito allo svolgimento della doppia elica, ha un effetto ipercromico sullo spettro UV di DNA in soluzione, come previsto dalla teoria dell'ipocromismo [75–77]. Inoltre, tramite spettroscopia CD si riesce meglio a distinguere le differenti famiglie di strutture secondarie di DNA, poichè il contributo predominante alla chiralità della macromolecola è dato dalla elicITÀ dell'acido nucleico. A tal proposito è opportuno ricordare, ad esempio, che proprio tramite la tecnica CD è stata scoperta la conformazione Z-DNA, una struttura che, a differenza del B-DNA, presenta elicITÀ levogira, ottenuta aumentando la forza ionica di soluzioni di alcuni oligonucleotidi sintetici, come poli[d(G-C)] (Fig.23) [78].

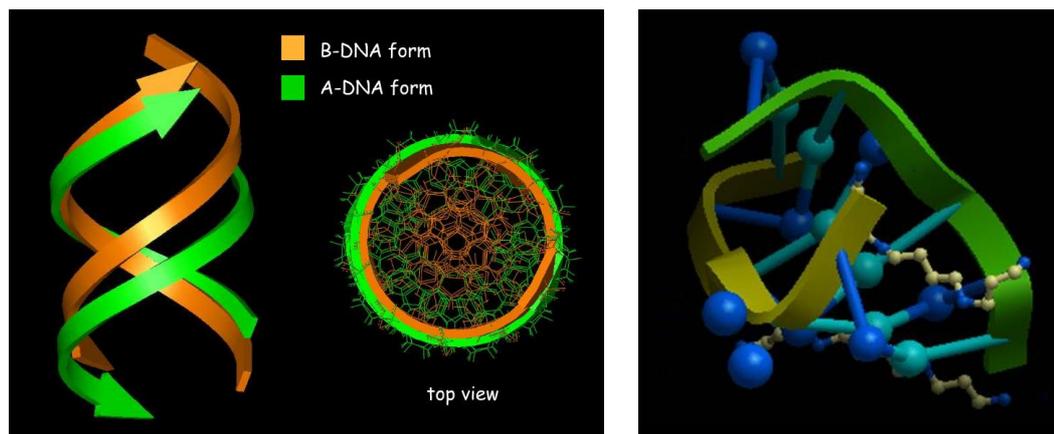


Figura 23. Differenti forme di DNA (B, A, Z)

La spettrofotometria UV a temperatura variabile è una delle tecniche più adoperate per ricavare la temperatura di denaturazione termica (“melting temperature”, T_m) di soluzioni di DNA [76,77]. Riportando il massimo dell’assorbimento di uno spettro UV, intorno a 260 nm, in funzione della temperatura, si ottiene una curva con andamento sigmoidale, che segue la transizione “doppia elica-singola elica”; la temperatura del punto di flesso di tale curva è definita T_m . L’analisi delle variazioni di T_m di soluzioni acquose di acidi nucleici può aiutare a comprendere l’effetto della composizione della soluzione sulla struttura e sulla dinamica degli acidi nucleici. La temperatura di melting è funzione della composizione della soluzione, ad esempio la forza ionica o la concentrazione del polinucleotide [76,77].

Sono stati perciò condotti studi in soluzione acquosa dell’interazione tra i derivati triazinici **19** e ct-DNA effettuando:

- i) misure di assorbimento UV-vis su soluzioni dei derivati triazinici **19** in presenza di quantità crescenti di DNA a rapporti $r=0.0-5.25$;
- ii) misure di CD e denaturazione termica (melting) su soluzioni di DNA in presenza del derivato da studiare a rapporti $r1=0.0-0.70$.

dove r il rapporto $[DNA_{fosfato}]/[ligando]$ ossia le mmoli di DNA monomero per mmoli di ligando, $r1$ indica il rapporto molare $[ligando]/[DNA_{fosfato}]$, ossia le mmoli di ligando per mmoli di DNA monomero.

I. Spettroscopia UV-visibile: Gli spettri UV-Vis delle soluzioni di ligando in presenza di quantità crescenti di DNA sono stati registrati a temperatura ambiente, utilizzando soluzioni di Tris-HCl 1mM come bianco.

Tutti i composti mostrano una banda di assorbimento tra 250 e 280 nm, zona in cui il DNA non assorbe. Inoltre, è possibile individuare una banda caratteristica, relativa ad una transizione elettronica infra-ligando, per ogni derivato studiato: **19b** (342 nm), **19c** (364 e 339 nm), **19d** (348 nm), e **19e** (333 nm). L'andamento lineare dell'intensità della banda (A_{\max}) con la concentrazione molare dei composti mostra che la legge di Lambert-Beer è valida per tutti gli intervalli di concentrazione utilizzati per gli studi di interazione. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici in Fig. 24.

In ogni titolazione, eccetto che nel caso del derivato **19d** (Fig. 24a), lo spettro caratteristico di ogni composto viene modificato con l'aggiunta di quantità crescenti di DNA evidenziando un chiaro effetto ipocromico, per quel che riguarda la banda a centrata a circa 350 nm.

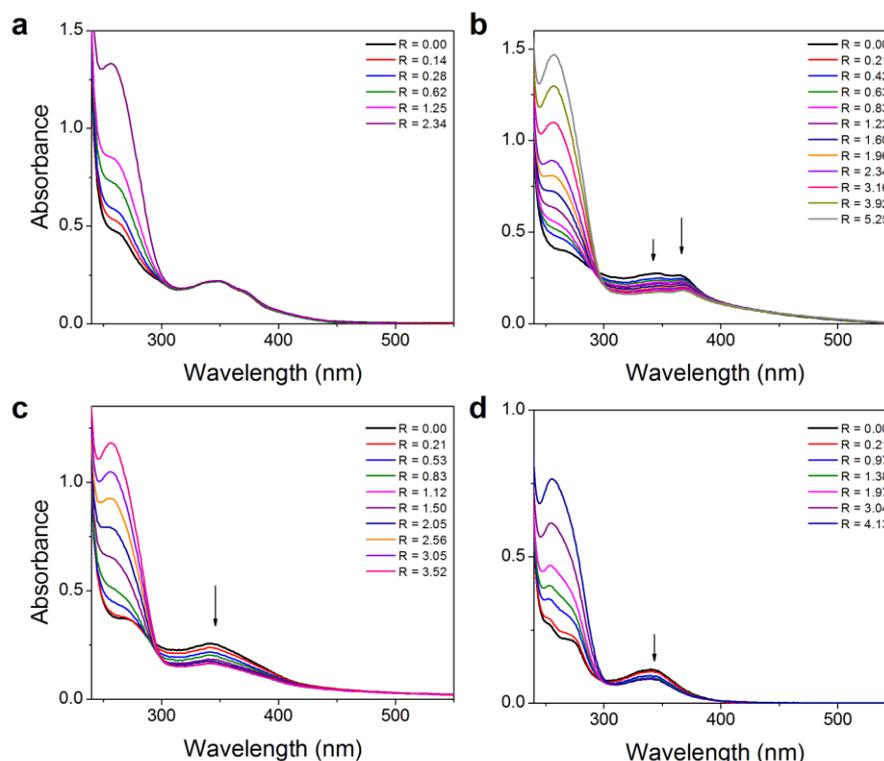


Figura 24. Spettro di assorbimento dei derivati **19b-e** in presenza di quantità crescenti di DNA. (a) [**19d**]=60 μM , [DNA]=0.0-285.45 μM . (b) [**19c**]=51.4 μM , [DNA]=0.0-210 μM . (c) [**19b**]=54 μM , [DNA]=0.0-141 μM . (d) [**19e**]=29.1 μM , [DNA]=0.0-82.8 μM

In particolare, la banda di assorbimento del derivato **19c** a 339 nm mostra un effetto ipocromico del 25%; la banda di assorbimento del derivato **19b** a 342 nm subisce un abbassamento del 28%, mentre del 29% è l'abbassamento relativo alla banda a 333 nm nel caso del derivato **19e**. L'assenza di shifts batocromici lascia propendere per

l'esclusione di un meccanismo d'azione intercalante come riportato in letteratura [79-81].

Al fine di valutare la costante di legame DNA-ligando (K_b) i dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando la seguente equazione [82-84]:

$$[\text{DNA}_{\text{fosfato}}]/2(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{DNA}_{\text{fosfato}}]/2(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$$

dove ε_a è il rapporto tra il valore di assorbanza e la concentrazione molare del ligando, ε_f è il coefficiente di estinzione molare per il composto non complessato, ε_b è il coefficiente di estinzione molare per il complesso ligando-DNA.

I valori delle costanti di legame K_b (M^{-1}) dei vari complessi DNA-ligando [79,85], in ordine di forza di legame decrescente sono risultate: 7.56×10^4 (nel caso di **19e**) $> 2.60 \times 10^4$ (nel caso di **19b**) $> 1.49 \times 10^4$ (nel caso di **19c**). Il comportamento del derivato **19d**, per il quale non è stato possibile determinare la K_b , è risultato completamente diverso dagli altri. Anche in presenza di quantità elevate di ct-DNA le sue caratteristiche bande di assorbimento non mostrano né effetto ipocromico né effetto batocromico (Fig. 24b), suggerendo così la totale assenza di qualsiasi perturbazione dei suoi livelli elettronici e quindi nessuna capacità di interazione con il DNA. Per gli altri derivati invece i valori delle costanti valori sono simili a quelli di alcuni noti agenti DNA-interattivi che agiscono da groove binders, e sembrano indicare che i derivati benzotriazinici **19** interagiscano con il polinucleotide mediante un legame esterno, quale appunto l'interazione con il groove o l'alchilazione in prossimità dei solchi.

2. Denaturazione Termica del DNA: Spettri UV-Vis a temperatura variabile dei sistemi ligando-DNA sono stati registrati su uno spettrofotometro Varian Cary 1E, equipaggiato con un sistema di termostatazione Peltier a doppia cella, utilizzando cuvette con cammino ottico da 1 cm. I profili di melting di soluzioni ct-DNA, in presenza di quantità crescenti di ligando, sono stati ottenuti riportando il massimo di assorbimento UV del DNA a 258 nm in funzione della temperatura.

La temperatura di denaturazione termica del DNA (T_m) è definita come la temperatura alla quale metà delle coppie di basi totali è spaiato, con la doppia elica di DNA gradualmente dissociata in singolo filamento [86]. La T_m è quindi strettamente correlata alla stabilità dell'elica e qualsiasi interazione di sostanze chimiche con il DNA può modificarla stabilizzando o destabilizzando il complesso finale. L'intercalazione causa una maggiore stabilizzazione della doppia elica aumentando quindi la T_m del DNA [87], mentre un groove binder non influenza o influenza poco la variazione di T_m [88-92].

I valori di T_m sono stati calcolati dal punto di flesso delle curve di melting, ossia dal punto di massimo della derivata prima. I valori di ΔT_m mostrano che l'aumento della temperatura di melting in presenza di un rapporto molare $[\text{ligando}]/[\text{DNA}_{\text{fosfato}}] = 0.10$ risulta compreso tra 1.7 e 5.0 (± 0.1) °C. Gli incrementi di T_m ottenuti nel corso degli esperimenti, inferiore a quello solitamente ottenuto al medesimo rapporto, quando vengono studiato agenti intercalanti [93], dimostrano una stabilizzazione debole della doppia elica in presenza dei composti saggiati. In particolare, per quanto riguarda **19d**, l'assenza di stabilizzazione, analogamente a quanto già ottenuto negli altri esperimenti, suggerisce ancora una volta l'assenza di qualsiasi interazione con il polinucleotide.

3. Dicroismo Circolare: Il CD è una tecnica utile per monitorare i cambiamenti nella struttura del DNA in seguito alla formazione del complesso ligando-DNA. I segnali tipici CD del DNA, caratterizzati da una banda positiva a 275 nm ed un banda negativa a 240 nm (linee continue nere in Fig. 25) [94], sono sensibili a piccole variazioni nella sua conformazione chirale [95]. Quando una molecola intercala il polinucleotide ne va a perturbare marcatamente la sua struttura secondaria, causando grandi cambiamenti nel suo spettro CD. Quando il DNA interagisce con i groove binder, invece, mantiene la sua conformazione, senza marcate variazioni nello spettro.

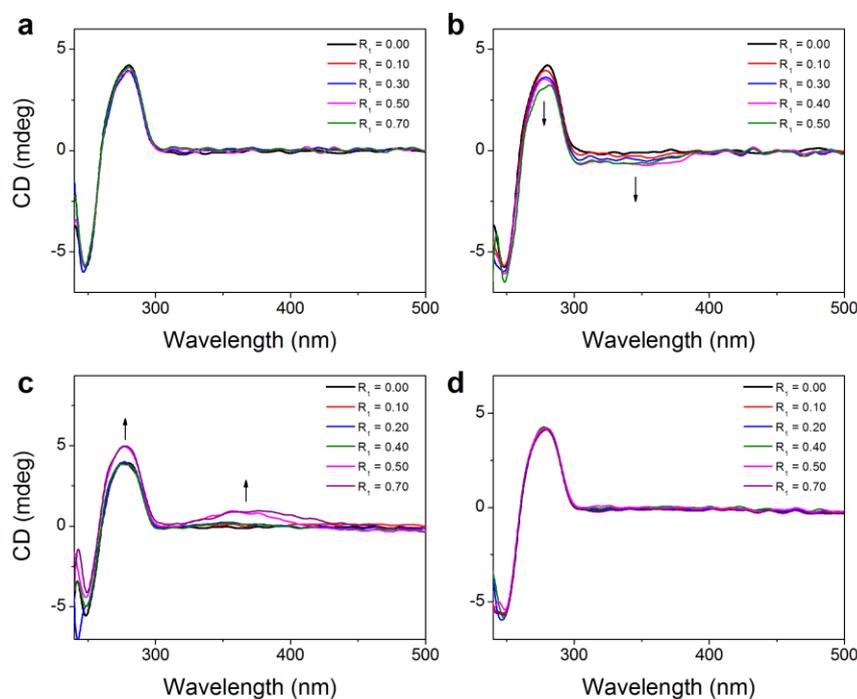


Figura 25. Spettri CD di ct-DNA (linea nera) in presenza di quantità crescenti dei derivati **19b-e**. (a) $[\text{DNA}] = 50 \mu\text{M}$, $[\mathbf{19d}] = 0.0\text{-}35.05 \mu\text{M}$. (b) $[\text{DNA}] = 50 \mu\text{M}$, $[\mathbf{19c}] = 0.0\text{-}24.96 \mu\text{M}$. (c) $[\text{DNA}] = 50 \mu\text{M}$, $[\mathbf{19b}] = 0.0\text{-}35.04 \mu\text{M}$. (d) $[\text{DNA}] = 50 \mu\text{M}$, $[\mathbf{19e}] = 0.0\text{-}35.04 \mu\text{M}$.

Sono stati registrati spettri CD di titolazioni delle soluzioni di DNA con quantità crescenti di ligandi. Come riportato in Fig. 25, i risultati evidenziano che gli spettri CD non mostrano drastiche variazioni, e quindi i composti in esame non si comportano da intercalanti [96,97].

In particolare gli spettri dei composti **19d,e** non mostrano cambiamento (Fig. 25a,d) mentre lievi variazioni si notano per i composti **19b,c** (Fig. 25b,c): la banda dicroica del DNA a 275 nm diminuisce in presenza del composto **19c** mentre all'aumentare del rapporto $[19b]/[DNA_{fosfato}]$ aumenta. Quindi il CD localizza la banda nel range 300-400 nm. Questi risultati permettono di ipotizzare che in assenza di profondi cambiamenti conformazionali nella struttura elicoidale del DNA, i composti analizzati possono essere definiti dei groove binder, in accordo con quanto riportato in letteratura [98].

4. Viscosità: È noto che molecole capaci di intercalare il DNA inducono uno srotolamento della doppia elica ed un conseguente allungamento del DNA, dando luogo a modifiche delle sue proprietà idrodinamiche quali un aumento della viscosità di sue soluzioni [99,100]. In assenza di più dettagliati dati strutturali (cristallografia a raggi X o NMR), misure di viscosità possono fornire un test critico per legami intercalativi [101-103]. Sono quindi state effettuate misure di viscosità per escludere definitivamente il meccanismo di intercalazione per i composti in esame (Fig. 26).

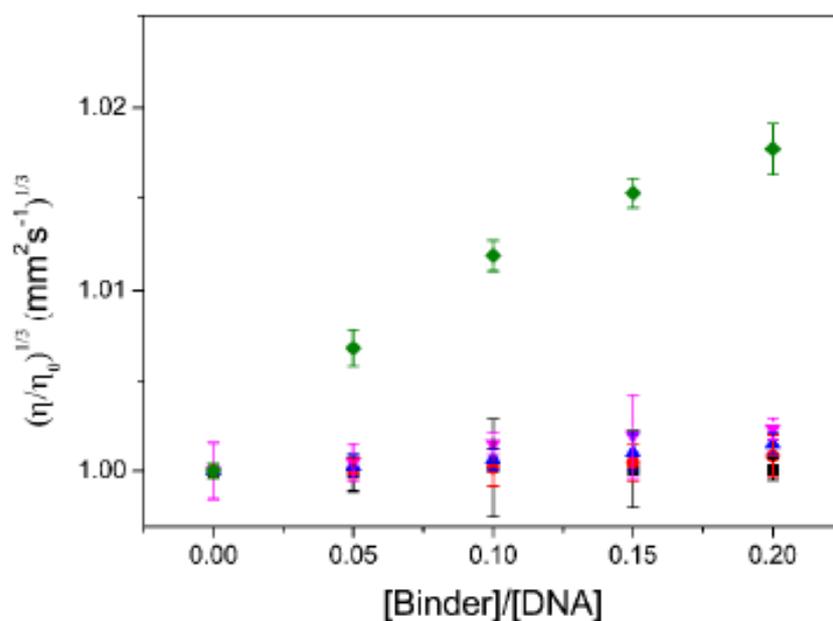


Figura 26. Viscosità di soluzioni di DNA a rapporto costante $[ligando]/[DNA_{fosfato}]$

La viscosità della soluzione di DNA a 50 μM non viene significativamente influenzata dalla presenza dei composti **19b-e** né si verifica un brusco aumento come nel caso di un complesso metallico che intercala il DNA ($[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{gly})]^+$), utilizzato per confronto [104].

Pertanto, come mostrato in Fig. 26, questi risultati confermano ulteriormente l'assenza di intercalazione e riconfermano che i composti **19b-e** agiscono come groove binder, mentre non è stato possibile evidenziare nessun tipo di interazione nel caso di **19d**.

v. Analisi del Ciclo Cellulare

I derivati che hanno mostrato il più elevato effetto citotossico, la benzotienotriazina **19b** ed il benzotienotriazene **32c**, sono stati testati anche in esperimenti di perturbazione del ciclo cellulare.

Si è utilizzata l'analisi citofluorimetrica per chiarire l'influenza dei composti in studio sulla distribuzione del ciclo cellulare. Il ciclo cellulare è stato seguito dopo 12 h e 24 h, nel caso delle cellule HeLa, e dopo 24 h e 48 h, nel caso delle cellule MCF-7, di incubazione al fine di rilevare spostamenti nella distribuzione ciclo cellulare prima che una quantità significativa di cellule vada incontro ad apoptosi. Per i saggi sono state scelte concentrazioni dei composti **19b** e **32c** pari a 1x e 2x il valore GI50 ottenuto negli screening antiproliferativi.

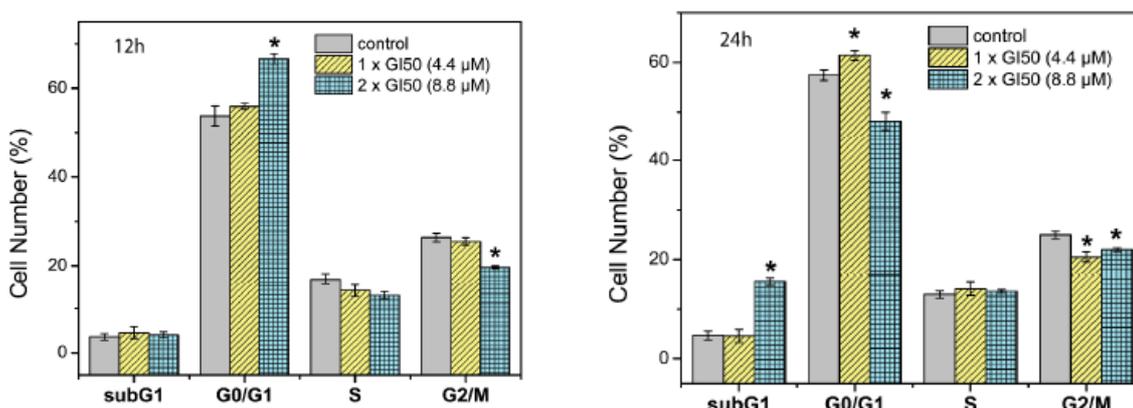


Figura 27. Effetti del derivato **19b** alle concentrazioni 1x e 2xGI50 sulla distribuzione del ciclo delle cellule HeLa dopo 12 e 24 ore di trattamento

Gli istogrammi, riportati in Fig. 27, riportano le percentuali di cellule nella rispettiva fase del ciclo cellulare (G1, S e G2/M), insieme alla percentuale di cellule in fase sub-G1 (cellule morte) ottenute dall'analisi citofluorimetrica. Le cellule HeLa non

trattate mostravano la normale distribuzione diploide presentando caratteristiche di proliferazione veloce, con il 35% del totale cellule in fase S+G2/M. Dopo l'esposizione al composto **19b**, si notava una forte soppressione della fase G2/M con maggiore accumulo di cellule nella fase G0/G1. L'effetto è dipendente dalla concentrazione e si nota un arresto del ciclo cellulare dopo 12 ore di trattamento alla concentrazione 2x GI50 (8.8 μ M). L'esposizione alla concentrazione 1x GI50 (4.4 μ M) provoca invece un arresto del ciclo cellulare dopo 24 ore di trattamento.

Inoltre, dopo 24 ore di trattamento con il composto **19b** alla concentrazione 2xGI50 si è evidenziato un significativo aumento della popolazione di cellule in fase sub-G1 indicativo della presenza di cellule apoptotiche.

L'arresto del ciclo in fase G1 è in genere considerato un importante meccanismo di difesa cellulare che impedisce la replicazione del DNA danneggiato [105]. Lo specifico arresto in questa fase suggerisce che l'esposizione delle cellule al composto **19b** può avere conseguenze drammatiche quali il danno al DNA con perturbazione della sua sintesi.

Inoltre, il protocollo VLAK aveva assegnato ai derivati benzotienotriazine prevalentemente proprietà alchilanti. Gli studi spettroscopici hanno suggerito che le stesse triazine possono comportarsi da groove binders e, in accordo ai dati di letteratura, il danno al DNA può essere provocato anche da interazioni non-covalenti dopo esposizione delle cellule a questi composti [106,107].

L'arresto nella fase G1 può anche essere compatibile con l'inibizione della DNA-Topoisomerasi I e può anche causare alterare la replicazione o danneggiare il DNA [108]. D'altra parte come previsto dal protocollo VLAK ed anche dall'analisi COMPARE, il meccanismo di azione proposto per l'attività antiproliferativa dei composti benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazine può includere l'inibizione della topoisomerasi I. L'inibizione della DNA Topoisomerasi da parte di groove binder è ben nota [109] e la capacità dei ligandi del DNA di inibire l'enzima è stato attribuito ad interazioni dirette con il DNA nel solco minore [110].

Nel caso del derivato triazenico **32c** gli studi sul ciclo cellulare sono stati condotti sulla linea MCF-7 e l'effetto è stato valutato a 24 e 48 ore utilizzando sempre concentrazioni pari a 1x e 2x il valore GI50 ottenuto negli screening antiproliferativi.

Gli istogrammi riportati in Fig. 28 rappresentano le percentuali di cellule nella rispettiva fase del ciclo cellulare (G1, S, e G2/M), insieme alla percentuale di cellule nel sub-G1

(cellule morte) ottenute per citometria a flusso. I risultati danno la media di due esperimenti indipendenti, eseguiti in duplicato \pm SE.

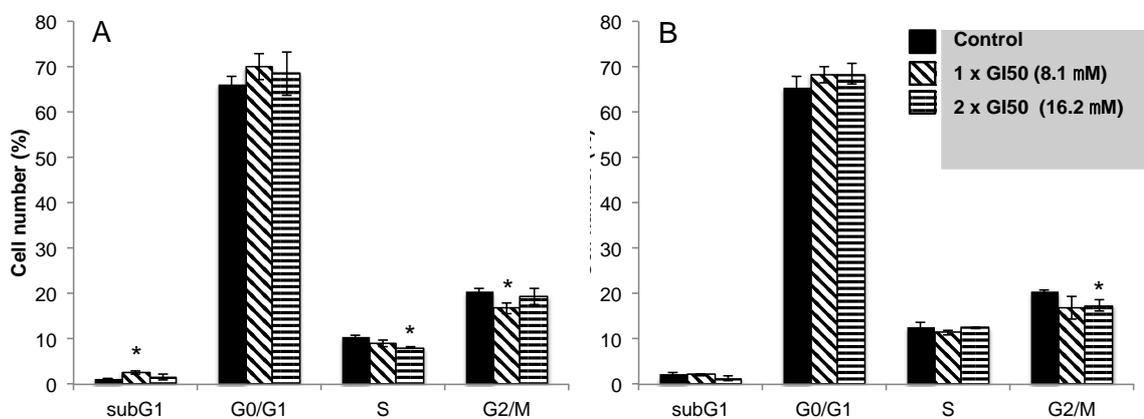


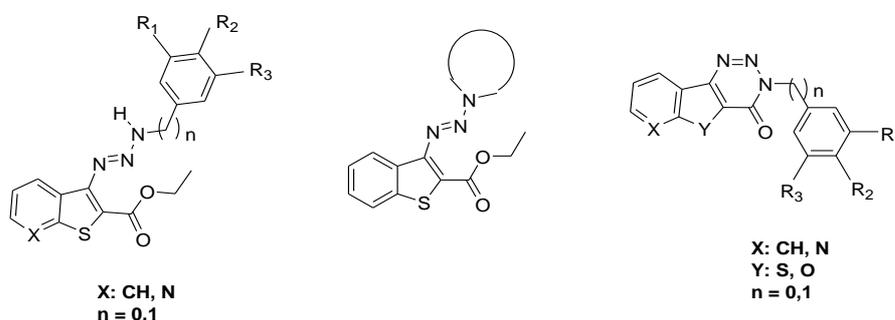
Figura 28. Effetti del derivato **32c** alle concentrazioni 1x e 2xGI50 sulla distribuzione del ciclo delle cellule MCF-7 dopo 24 e 48 ore di trattamento

Anche per il derivato triazenico **32c** è stato possibile evidenziare un'alterazione della normale distribuzione diploide ed una modifica del ciclo cellulare con un maggiore accumulo di cellule nella fase G0/G1. L'effetto comunque è risultato meno marcato di quello osservato nel caso del derivato benzotienotriazinico.

6.CONCLUSIONI

Le ricerche condotte durante il periodo di dottorato si sono incentrate sulla progettazione di nuove serie di derivati di interesse farmaceutico ad attività antitumorale.

Nel corso degli studi è stato possibile identificare e sintetizzare derivati triazenici e triazinici in cui sono state introdotte porzioni benzotiofeniche. Si è anche studiata l'influenza di sostituzioni isosteriche sia nella porzione eterociclica (sostituendo il tiofene con il furano) sia nella porzione benzenica (aza sostituzione).



I derivati sintetizzati sono stati valutati preliminarmente nello screening del DTP – NCI e per i derivati che hanno mostrato buona attività antiproliferativa si sono effettuati saggi biologici mirati per evidenziarne l'eventuale meccanismo d'azione molecolare, basandosi anche sulle risultanze di analisi computazionali, che hanno previsto l'utilizzo delle metodologie VLAK e COMPARE.

Lo studio dell'attività biologica è stato principalmente rivolto all'analisi delle interazioni con ct-DNA e all'investigazione dell'influenza dei composti in esame sulla distribuzione del ciclo cellulare.

I derivati triazenici hanno mostrato in generale debole attività antiproliferativa con arresto del ciclo cellulare principalmente nella fase G1.

Sono risultati comunque più interessanti i derivati benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazinici di tipo **19**, per i quali è stato possibile proporre come meccanismo d'azione un'interazione con il DNA, probabilmente sul solco minore, che tuttavia non esclude un'eventuale interferenza sull'attività del complesso DNA-Topoisomerasi I, evento compatibile con l'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare.

7.PARTE SPERIMENTALE

a.CHIMICA

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Buchi-Tottoli. Gli spettri IR sono stati determinati in bromoformio con uno spettrofotometro Jasco FT/IR 5300. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati a 200 e 50.3 MHz, rispettivamente, in DMSO- d_6 , se non altrimenti specificato, con uno spettrometro Bruker Avance II serie 200 MHz (TMS come standard interno). Gli spettri GC-MS sono stati acquisiti con uno spettrometro Shimadzu QP5050 (EI 75eV) usando per la GC una colonna Zb5 (30m, diametro interno 0.25 μm), con temperatura di iniezione 280°C, rampa 80°-300°C, flusso 57.7ml/min, pressione 101.8KPa. Spettri UV-Vis a temperatura variabile sono stati registrati su uno spettrofotometro Varian Cary 1E, equipaggiato con un sistema di termostatazione Peltier a doppia cella, utilizzando cuvette con cammino ottico da 1 cm. Le separazioni cromatografiche sono state eseguite su colonna usando gel di silice MERK 230-400 mesh ASTM.

Preparazione di etil 3-aminobenzo[b]tiofene-2-carbossilato (20) [37].

Ad una sospensione di sodio idruro (15 mmol) in DMSO anidro (10 ml) viene aggiunto etil 2-mercaptoacetato (11 mmol). Dopo circa 15 minuti, si aggiunge goccia a goccia 2-fluorobenzonitrile (10 mmoli). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare a temperatura ambiente per una notte. Si versa quindi in acqua e ghiaccio, ed il solido formatosi viene filtrato, essiccato, e ricristallizzato da etanolo. Ottenuti 1.90 g di solido giallo, resa 86%. P.f. 86-87°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.39 (t, J= 7.1 Hz, 3H, CH_3), 4.36 (q, J= 7.1 Hz, 2H, CH_2), 5.91 (br s, 2H, NH_2), 7.35 (dt, J= 2.0, 8.0 Hz, 1H, H-6), 7.46 (dt, J= 2.0, 8.0 Hz, 1H, H-5), 7.63 (dd, J= 2.0, 8.0 Hz, 1H, H-4), 7.72 (dd, J= 2.0, 8.0 Hz, 1H, H-7). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.5 (q), 60.4 (t), 99.4 (s), 121.2 (d), 123.4 (d), 123.8 (d), 128.1 (d), 131.4 (s), 139.9 (s), 148.3 (s), 165.5 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1689 (CO), 3395 (NH_2) cm^{-1} . Anal Calc per $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$: C, 59.71; H, 5.01; N 6.33; trov.: C, 59.87; H, 5.16; N, 6.32.

Procedura generale per la sintesi di etil (3-triazen-1-il)benzo[b]tiofene-2-carbossilati 23a-e e 32a-d.

Ad una soluzione di etil 3-aminobenzo[b]tiofene-2-carbossilato (**20**) (0.9 mmol) in acido acetico glaciale (5 ml) viene aggiunto a -10°C sodio nitrito (1.8 mmol) sciolto nella minima quantità di acqua. Si lascia ad agitare la miscela per 2h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). Si aggiunge quindi, sempre a -10°C, ammonio acetato (32.4 mmoli) fino a pH=6, e l'opportuna amina **30A-E** o **31A-D** (9 mmoli). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare per ulteriori 3-4h a -10°C. Il solido formatosi viene filtrato, essiccato, e ricristallizzato da etanolo.

Etil 3-(3-fenil-1-triazenil)benzo[b]tiofene-2-carbossilato (23a): ottenuti 0.23 g di solido giallo, resa 80%. P.f. 102-105°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.46 (t, J= 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.45 (q, J= 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.39 (dt, J= 2.0, 8.0 Hz, 1H, H-6), 7.45-7.59 (m, 4H, H-5, H-2', H-4', H-6'), 7.69 (dd, J= 2.0, 8.0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.82 (dd, J=2.0, 6.0 Hz, 1H, H-4), 8.74 (dd, J=4.0, 8.0 Hz, 1H, H-7), 12.22 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 14.4 (q), 61.5 (t), 104.6 (s), 121.8 (dx2), 123.0 (d), 125.1 (d), 127.6 (d), 128.2 (d), 129.2 (d), 130.8 (s), 140.2 (s), 142.0 (s), 149.2 (s), 164.5 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1542 (N=N), 1673 (CO), 3250 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₇H₁₅N₃O₂S: C, 62.75; H, 4.65; N, 12.9; trov.: C, 62.99; H, 4.36; N, 12.14.

Etil 3-[(4-metossifenil)-1-triazenil]benzo[b]tiofene-2-carbossilato (23b): ottenuti 0.09 g di solido giallo, resa 28%. P.f. 133-134°C. ¹H NMR δ: 1.32 (t, J= 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.34 (q, J= 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.07 (d, J= 8.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.51-7.65 (m, 4H, H-3', H-5, H-5', H-6), 8.01 (d, J= 7.1 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, J= 7.1 Hz, 1H, H-7), 11.85 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 14.4 (q), 55.5 (q), 61.3 (t), 100.0 (s), 114.4 (d), 123.0 (d), 123.1 (d), 124.9 (d), 127.6 (d), 128.1 (d), 130.9 (s), 140.2 (s), 142.3 (s), 142.9 (s), 159.7 (s), 164.6 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1541 (N=N), 1673 (CO), 3350, (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₈H₁₇N₃O₃S, C, 60.83; H, 4.82; N, 11.82; trov.: C, 60.04; H, 4.57; N, 11.12.

Etil 3-[(4-metil-fenil)-1-triazenil]benzo[b]tiofene-2-carbossilato (23c): ottenuti 0.10 g di solido giallo, resa 32%. P.f. 135-136°C. ¹H NMR δ: 1.32 (t, J= 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 4.34 (q, J= 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.30 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.49 (d, J= 7.9, 2H, H-3', H-5'), 7.54-7.65 (m, 2H, H-5, H-6), 8.03 (d, J= 8.2 Hz, 1H, H-4), 8.50 (d, J= 6.4 Hz, 1H, H-7), 12.19 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR δ: 14.4 (q), 21.3 (q), 61.4 (t), 100.0 (s), 121.6 (d), 123.0 (d), 125.0 (d), 127.6 (d), 128.1 (d), 129.8 (d), 130.8

(s), 138.3 (s), 140.2 (s), 142.1 (s), 147.0 (s), 164.5 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1541 (N=N), 1669 (CO), 3460 (NH) cm^{-1} . Anal Calc per $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 63.70; H, 5.05; N, 12.38; trov.: C, 63.84; H, 5.49; N, 12.21.

Etil 3-[(3-cloro-4-fluorofenil)-1-triazenil]benzo[b]tiofene-2-carbossilato (23d): ottenuti 0.17 g di solido giallo, resa 49%. P.f. 148-151°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.46 (t, $J=7.1$, 3H, CH_3), 4.45 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH_2), 7.27 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.47-7.60 (m, 3H, H-5, H-6, H-6'), 7.70 (dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, 1H, H-2'), 7.82 (dd, $J=2.0, 6.0$ Hz, 1H, H-4), 8.63 (dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, 1H, H-7), 12.28 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.4 (q), 61.6 (t), 100.0 (d), 105.5 (s), 116.8 (d), 117.2 (d, $J_{\text{C-F}}=233$ Hz), 121.6 (d), 123.3 (d), 125.3 (d), 127.1 (s), 128.3 (d), 130.6 (s), 140.2 (s), 141.4 (s), 146.0 (s), 155.1 (s), 164.5 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1542 (N=N), 1673 (CO), 3605 (NH) cm^{-1} . Anal Calc per $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 54.04; H, 3.47; N, 11.12; trov.: C, 55.15; H, 3.12; N, 11.58.

Etil 3-[(3,4,5-trimetossifenil)-1-triazenil]benzo[b]tiofene-2-carbossilato (23e): ottenuti 0.09 g di solido arancio, resa 23%. P.f. 131-132°C. ^1H NMR δ : 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 6H, $2\times\text{OCH}_3$), 4.34 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH_2), 6.89 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.49-7.64 (m, 2H, H-5, H-6), 8.02 (dd, $J=1.6, 7.0$ Hz, 1H, H-4), 8.50 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-7), 12.18 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.4 (q), 56.1 (q), 60.1 (q), 61.5 (t), 99.1 (d), 104.7 (s), 123.1 (d), 124.9 (d), 127.3 (d), 128.1 (d), 130.8 (s), 138.2 (s), 140.3 (s), 141.9 (s), 145.2 (s), 153.6 (s), 164.5 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1541 (N=N), 1672 (CO), 3389 (NH) cm^{-1} . Anal Calc per $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C, 57.82; H, 5.09; N, 10.11; trov.: C, 57.60; H, 5.70; N, 10.01.

Etil 3-(pirrolidin-1-triazenil)benzo[b]tiofene-2-carbossilato (32a): ottenuti 0.15 g di solido bianco, resa 63%. P.f. 153-156°C. ^1H NMR δ : 1.38 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.09 (s, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.92 (d, $J=33.8$ Hz, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 4.36 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2), 7.35-7.47 (m, 2H, H-5, H-6), 7.76 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H-4), 8.17 (d, $J=7.7$ Hz, H-7). ^{13}C NMR δ : 14.37 (q), 46.66 (t), 51.23 (t), 60.96 (t), 99.97 (s), 122.60 (d), 124.59 (d), 125.73 (d), 127.10 (d), 133.99 (s), 139.51 (s), 149.78 (s), 163.00 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1512 (N=N) 1704.18 (CO) cm^{-1} . Anal Calc per $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 59.38; H, 5.65, N, 13.85; trov.: C, 59.04; H, 5.47; N, 13.90.

Etil 3-(4-metilpiperazin-1-triazenil)benzo[b]tiofene-2-carbossilato (32b): ottenuti 0.18 g di solido giallo, resa 59%. P.f. 82-84°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH_3), 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.58 (t, $J=6.4$ Hz, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.93 (s, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 4.29 (q, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2), 7.39 (m, 2H, H-5, H-6), 7.77 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-4), 8.18 (d,

$J = 6.0$ Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.4 (q), 29.7 (t), 45.9 (q), 54.19 (t), 61.1 (t), 100.0 (s), 122.7 (d), 124.9 (d), 125.7 (d), 127.2 (d), 133.6 (s), 139.48 (s), 148.3 (s), 162.8 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1513 (N=N), 1705 (C=O) cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: C, 57.81, H, 6.06, N, 16.85; trov.: C, 57.86, H, 6.01, N, 9.68.

Etil 3-(morfolin-1-triazenil)benzo[b]tiofene-2-carbossilato (32c): ottenuti 0.20g di solido arancio, resa 60%. P.f. 76°C . ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.73-4.10 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 4.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 7.31-7.50 (m, 2H, H-5, H-6), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 8.17 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.4 (q), 61.1 (t), 66.4 (t), 100.0 (s), 122.7 (d), 124.9 (d), 125.6 (d), 127.2 (d), 133.4 (s), 139.4 (s), 148.0 (s), 162.6 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1606 (C=O) cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 56.41; H, 5.37; N, 13.16; trov.: C, 57.36; H, 5.42; N, 13.20.

Etil 3-(dibutil-1-triazenil)benzo[b]tiofene-2-carbossilato (32d): ottenuti 0.22g di olio, resa 42%. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.97 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.25-1.50 (m, 7H, CH_3 , $2\times\text{CH}_2$), 1.68-1.88 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.67-3.91 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 4.36 (q, $J = 15.3$, 8.2 Hz, 2H, CH_2), 7.39 (dd, $J = 14.8$, 8.9 Hz, 2H, H-5, H-6), 7.74 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-4), 8.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.8 (q), 14.4 (q), 20.6 (t), 31.1 (t), 54.7 (t), 60.9 (t), 118.5 (s), 122.6 (d), 124.5 (d), 125.6 (d), 127.00 (d), 134.4 (s), 139.5 (s), 149.4 (s), 163.1 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1510 (N=N), 1700 (C=O), cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 63.13; H, 7.53; N, 11.62; trov.: C, 63.30; H, 7.48; N, 11.55.

Procedura generale per la sintesi di derivati 3-arilbenzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)oni 19a-e.

Ad un soluzione di triazene **23a-e** (1 mmoli) in DMF anidro (2 ml) viene aggiunto carbonato di potassio (2 mmoli). La miscela di reazione viene riscaldata a 80°C per 4h, fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). Si raffredda a temperatura ambiente e si versa in acqua e ghiaccio. Il precipitato ottenuto viene filtrato, essiccato, e ricristallizzato da etanolo.

3-Fenilbenzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (19a): ottenuti 0.10g di solido bianco, resa 51%. P.f. $102-104^\circ\text{C}$. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.44-7.56 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.58-7.68 (m, 4H, H-8, H-7, H-2', H-6'), 7.95 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-9), 8.59 (dd, $J = 1.1$, 4.7 Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 107.1 (s), 123.4 (d), 124.2 (d), 126.2 (d), 126.6 (d), 128.8 (s), 129.1 (d), 129.4 (d), 129.4 (s), 129.9 (d), 132.8 (s), 138.3 (s), 141.6

(s), 148.6 (s), 153.7 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1684 (CO) cm^{-1} . m/z: 279.05 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$: C, 64.50; H, 3.25; N, 15.04; trov.: C, 64.04; H, 3.47; N, 11.12.

3-(4-Metossifenil)-benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (19b): ottenuti 0.19g di solido bianco, resa 60%. P.f. 247-248°C. ^1H NMR δ : 3.87 (s, 3H, OCH_3), 7.17 (d, $J=9.3$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.64 (d, $J=9.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.75-7.88 (m, 2H, H-7, H-8), 8.37 (dd, $J=2.0, 6.7$ Hz, 1H, H-9), 8.56 (dd, $J=2.0, 6.3$ Hz, 1H, H-6). IR (KBr) ν_{\max} : 1680 (CO) cm^{-1} . m/z: 309 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 62.12; H, 3.58; N, 13.58; trov.: C, 62.01; H, 3.47; N, 13.12.

3-(4-Metil-fenil)-benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (19c): ottenuti 0.21g di solido bianco, resa 70%. P.f. 219-220°C. ^1H NMR δ : 2.44 (s, 3H, CH_3), 7.43 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.59 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.70-7.94 (m, 2H, H-7, H-8), 8.35 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, H-9), 8.54 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR δ : 20.8 (q), 123.4 (d), 124.3 (d), 126.5 (d), 126.9 (d), 128.4 (s), 129.4 (d), 130.0 (d), 132.2 (s), 135.9 (s), 139.1 (s), 140.6 (s), 147.9 (s), 153.2 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1691 (CO) cm^{-1} . m/z: 293.06 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: C, 65.51; H, 3.78; N, 14.32; trov.: C, 65.89; H, 3.80; N, 14.62.

3-(3-Cloro-4-fluorofenil)-benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (19d): ottenuti 0.30g di prodotto giallo, resa 89%. P.f. 220-221°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.37 (t, $J=9.3$ Hz, 1H, H-5'), 7.35-7.88 (m, 4H, H-7, H-8, H-2', H-6'), 8.06 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-9), 8.64 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 116.7 (s), 117.2 (d, $J_{\text{C-F}}=221$ Hz), 121.6 (s), 123.5 (d), 124.2 (d), 126.0 (d), 126.2 (d), 126.8 (d), 128.7 (d), 130.1 (d), 131.6 (s), 132.7 (s), 134.6 (s), 141.6 (s), 153.5 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1685 (CO) cm^{-1} . m/z: 331 (100.0%), 333 (30%). Anal Calc per $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{ClFN}_3\text{OS}$: C, 54.31; H, 2.13; N, 12.67; trov.: C, 54.04; H, 2.47; N, 12.02.

3-(3,4,5-Trimetossifenil)-benzotieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (19e): ottenuti 0.29g di solido bianco, resa 79%. P.f. 190-192°C. ^1H NMR δ : 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 6H, 2x OCH_3), 7.07 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.69-7.93 (m, 2H, H-8, H-7), 8.36 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, H-9), 8.55 (d, $J=6.7$ Hz, 1H, H-8). ^{13}C NMR δ : 56.2 (q), 60.1 (q), 105.1 (d), 123.4 (d), 124.4 (d), 127.0 (d), 128.4 (s), 130.1 (d), 132.2 (s), 134.0 (s), 138.0 (s), 140.6 (s), 147.8 (s), 152.9 (s), 153.2 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1683 (CO) cm^{-1} . m/z: 341 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 58.53; H, 4.09; N, 11.38; trov.: C, 58.04; H, 4.47; N, 11.12.

Preparazione di etil 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (35) [37].

Ad una sospensione di sodio idruro (15 mmol) in DMSO anidro (10 ml) viene aggiunto etil 2-mercaptoacetato (11 mmol). Dopo 15 minuti si aggiunge goccia a goccia una soluzione di 2-cloro-3-cianopiridina (10 mmoli) in DMSO (10 ml). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare a temperatura ambiente per una notte, quindi versata in acqua e ghiaccio. Il solido precipitato viene filtrato, essiccato e ricristallizzato da etanolo. Ottenuti 2.25 g di polvere gialla, resa 100%. P.f. 183°C. ^1H NMR δ : 1.29 (t, J= 7.1 Hz, 3H, CH₃ 8.68), 4.30 (q, J= 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.31 (br s, 2H, NH₂), 7.46 (dd, J= 8.2, 4.6 Hz, 1H, H-5), 8.54 (dd, J= 8.2, 1.6 Hz, 1H, H-4), 8.68 (dd, J= 4.6, 1.6 Hz, 1H, H-6), ^{13}C NMR ppm: 14.4 (q), 59.9 (t), 93.3 (s), 119.3 (d), 125.5 (s), 131.4 (d), 147.7 (s), 150.7 (d), 159.6 (s), 164.3 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1689 (CO), 3395 (NH₂) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₀H₁₀N₂O₂S: C, 54.04; H, 4.53; N, 12.60; trov.: C, 54.14; H, 4.37; N, 12.52.

Procedura generale per la sintesi di etil (3-triazen-1-il)tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilati 37 a,c,e,f.

Ad una soluzione di etil 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (35) (0.9 mmol) in acido cloridrico 6N (5 ml) viene aggiunto a -10°C sodio nitrito (1.8 mmol) sciolto nella minima quantità di acqua. Si lascia ad agitare la miscela per 2h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). Si aggiunge quindi, sempre a -10°C, ammonio acetato (99 mmoli) fino a pH=6, e l'opportuna amina **30A,C,E,F** (9 mmoli). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare per ulteriori 3-4h a -10°C. Il solido formatosi viene filtrato, essiccato, e ricristallizzato da etanolo.

Etil 3-(3-feniltriazen-1-il)tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (37a): ottenuti 0.10g di prodotto bianco, resa 40%. P.f. 184-185°C. ^1H NMR δ : 0.87 (t, J= 6.9 Hz, 3H, CH₃), 4.09 (q, J= 6.8 Hz, 2H, CH₂), 7.41 (m, t, J= 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.56-7.76 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.94 (d, J= 7.3 Hz, 1H, H-4), 8.50 (d, J= 3.7 Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR δ : 13.05 (q), 61.79 (t), 121.31 (d), 124.99 (d), 125.88 (d), 127.41 (d), 129.13 (d), 130.24 (d), 136.36 (s), 138.82 (s), 145.56 (s), 150.11 (s), 155.24 (s), 157.07 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1543 (N=N), 1680 (CO), 3350 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₆H₁₄N₄O₂S: C, 58.88; H, 4.32; N, 17.17; S, 9.82 trov.: C, 58.50; H 4.83; N, 17.14; S, 9.44.

Etil 3-[3(4-Metil-fenil)triazen-1-il]tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (37c): ottenuti 0.13g di prodotto bianco, resa 30%. P.f. 204-205°C. ^1H NMR (CDCl₃) δ : 0.97 (t, J= 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 4.13 (q, J= 7.0 Hz, 2H, CH₂), 7.19 (m, 1H, H-5), 7.35

(d, J= 8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.45 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.74 (d, J= 6.5 Hz, 1H, H-4), 8.46 (d, J= 2.8 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 13.4 (q), 21.4 (q), 62.1 (t), 98.70 (s), 120.8 (d), 125.7 (d), 126.1 (s), 127.6 (s), 129.6 (d), 134.2 (s), 138.2 (d), 140.4 (s), 146.4 (s), 150.2 (d), 157.8 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1550 (N=N), 1678 (CO), 3343 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₇H₁₆N₄O₂S: C, 59.98; H, 4.74; N, 16.46; trov.: C, 59.49; H 4.83; N, 16.55.

Etil 3-[3-(3,4,5-trimetossifenil)triazen-1-il]tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (37e): ottenuti 0.23g di prodotto giallo, resa 39%. P.f. 183-185°C. ¹H NMR δ: 0.98 (t, J= 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.76 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 6H, 2xCH₃), 4.10 (q, J= 7.0 Hz, 2H, CH₂), 7.03 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.43-7.38 (m, 1H, H-5), 7.91 (d, J= 6.4 Hz, 1H, H-4), 8.50 (d, J= 2.7 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR δ: 13.1 (q), 55.3 (q), 60.2 (q) 61.7 (t), 99.49 (s), 104.11 (d), 121.2 (d), 124.91 (s), 127.58 (s), 132.03 (s), 138.5 (d), 145.27 (s), 150.0 (d), 152.8 (s), 155.1 (s), 156.9 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1540 (N=N), 1679 (CO), 3346 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₉H₂₀N₄O₅S: C, 54.80; H, 4.84; N, 13.45; trov.: C, 54.85; H 4.87; N, 13.55.

Etil 3-[3-(3-metossifenil)triazen-1-il]tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (37f): ottenuti 0.15g di prodotto giallo, resa 36%. P.f. 165-166°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.98 (t, J= 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.88 (s, 3H, CH₃), 4.15 (dd, J= 14.0, 7.0 Hz, 2H), 7.23-7.17 (m, 4H, H-2', H-4', H-5', H-6'), 7.45 (dd, J= 8.2, 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.76 (d, J= 6.4 Hz, 1H, H-4), 8.47 (d, J= 2.7 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 13.4 (q), 55.7 (q), 62.2 (t), 100.0 (s), 111.5 (d), 116.3 (d), 118.1 (d), 120.9 (d), 125.9 (s), 129.7 (d), 137.5 (s), 138.2 (s), 146.4 (s), 150.2 (d), 156.7 (s), 157.7 (s), 159.9 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1538 (N=N), 1683 (CO), 3343 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₇H₁₆N₄O₃S: C, 57.29; H, 4.52; N, 15.72; trov.: C, 57.49; H 4.87; N, 15.45.

Preparazione di 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-acido carbossilico (39).

Ad una soluzione di etil 3-amino-tieno[2,3-b]piridina-2-carbossilato (**35**) (0.9 mmol) in etanolo (15 ml) viene aggiunta una soluzione di idrossido di sodio al 10%. La reazione è posta a refluxo per 3h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). La miscela di reazione viene acidificata con acido cloridrico 6N, il solido formatosi viene filtrato ed essiccato. Ottenuti 2.50 g di polvere gialla. Resa 100%. ¹H NMR δ: 6.57 (br s, 2H, NH₂), 7.31 (dd, J= 8.0, 4.6 Hz, 1H, H-5), 8.21 (dd, J= 8.0, 1.4 Hz, 1H, H-4), 8.49 (dd, J= 4.6, 1.4 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR δ: 109.9 (s), 118.3 (s), 127.75 (d), 129.69 (d), 140.2 (d), 147.5 (s), 158.7 (s), 164.0 (s), 169.0 (s). IR (KBr)

ν_{\max} : 1576 (CO), 3339 (OH), 3442 (NH₂), cm⁻¹. Anal Calc per C₈H₆N₂O₂S: C, 49.47; H, 3.11; N, 14.42; trov: C, 49.15; H, 3.26; N, 14.34.

Procedura generale per la sintesi di N-aril 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide 38 a,c-f e 45a-c.

Ad una soluzione di acido carbossilico **39** (1.0 mmol) in etile acetato (15 ml) viene aggiunto TBTU (1.1 mmol) e trietilammina (1.5 mmol). La miscela viene lasciata ad agitare a 25°C per 30 minuti. Si aggiungono quindi le opportune amine di tipo **30** o **44** (1.0 mmol) e la miscela viene lasciata ad agitare per una notte. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il prodotto grezzo purificato mediante cromatografia su colonna.

N-Fenil 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (38a): ottenuti 0.26g di prodotto giallo, resa 40%. P.f. 247-248°C. ¹H NMR δ : 7.08 (t, J= 6.8 Hz, 1H, H-4'), 7.55-7.24 (m, 5H), 7.71 (d, J= 7.7 Hz, 2H, H-2',H-6'), 8.52 (d, J= 7.5 Hz, 1H, H-4), 8.69 (d, J= 2.4 Hz, 1H, H-6), 9.48 (s, 1H, NH). ¹³C NMR δ : 96.5 (s), 119.4 (d), 121.1 (d), 123.4 (d), 126.0 (s), 128.4 (d), 130.9 (d), 138.9 (s), 146.8 (s), 150.2 (d), 158.7 (s), 163.8 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1643(C=O), 3321-3429(NH₂), 3565 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₄H₁₁N₃OS: C, 62.43; H, 4.12; N, 15.60; trov.: C, 62.13; H 4.57; N, 15.45.

N-4-Metilfenil 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (38c): ottenuti 0.38g di prodotto giallo, resa 46%. P.f. 235-237°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.25 (s, 3H, CH₃), 7.17 (d, J= 7.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.34 (dd, J= 8.0, 4.9 Hz, 1H, H-5), 7.46 (d, J= 8.1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.96 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H-4), 8.68 (d, J= 3.4 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 20.9 (q), . 77.5 (s), 100.0 (s), 119.4 (d), 120.8 (d), 129.23, (d) , 129.58 (d), 132.2 (s), 133.3 (s), 136.9 (s), 146.1 (s), 150.3, (d), 163.49 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1638(C=O), 3318 e 3425(NH₂), 3553 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₅H₁₃N₃OS: C, 63.58; H, 4.62; N, 14.83; trov.: C, 63.43; H 4.57; N, 14.38.

N-(3-Cloro-4-fluorofenil) 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (38d): ottenuti 0.32g di prodotto giallo, resa 53%. P.f. 254°C. ¹H NMR δ : 7.30-7.60 (m, 3H), 7.62-7.76 (m, 2H), 8.04 (dd, J= 6.5, 1.5 Hz, 1H), 8.53 (d, J= 7.7 Hz, 1H), 8.69 (d, J= 2.9 Hz, 1H), 9.66 (s, 1H). IR (KBr) ν_{\max} : 1640 (C=O), 3320 e 3423 (NH₂), 3551 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₄H₉ClFN₃OS: C, 52.26; H, 2.82; N, 13.06; trov.: C, 52.16; H, 2.73; N, 13.40.

N-(3,4,5-Trimetossifenil) 3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (38e): ottenuti 0.25g di prodotto bianco, resa 30%. P.f. 204°C. ¹H NMR δ: 3.64 (s, 6H, CH₃), 3.77 (s, 6H, 2xCH₃), 7.20 (s, 2H, NH₂), 7.37-7.54 (m, 3H, H-5, H-2', H-6'), 8.52 (d, J= 7.6 Hz, 1H, H-4), 8.68 (d, J= 3.1 Hz, 1H, H-6), 9.35 (s, 1H, NH). ¹³C NMR δ: 55.7 (q), 60.1 (q), 96.3 (s), 98.4 (d), 119.4 (d), 126.1 (s), 130.9 (d), 133.4 (s), 146.8 (s), 150.2 (d), 152.4 (s), 158.6 (s), 163.7 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1600 (C=O), 3340 (NH₂), 3440 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₇H₁₇N₃O₄S: C, 56.81; H, 4.77; N, 17.81; trov.: C, 56.49; H 4.67; N, 11.75.

N-(3-Metossifenil)-3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (38f): ottenuti 0.15g di prodotto bianco, resa 23%. P.f. 203°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.23 (s, 2H, NH₂), 6.68 (t, J= 9.0 Hz, 1H), 7.17-7.31 (m, 5H), 7.97 (d, J= 10.1 Hz, 1H), 8.69 (d, J= 3.3 Hz, 1H), IR (KBr) ν_{max}: IR (KBr) ν_{max}: 1603 (C=O), 3332 (NH₂), 3434 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₅H₁₃N₃O₂S: C, 60.18; H, 4.38; N, 14.04; trov.: C, 59.80; H 4.35; N, 14.25.

N-Benzil-3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (45a): ottenuti 0.33g di prodotto bianco, resa 65%. P.f. 183-184°C. ¹H NMR δ: 4.43 (d, J= 5.8 Hz, 2H, CH₂), 7.10 (s, 2H, NH₂), 7.56-7.17 (m, 5H, H-5, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.85 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H-4), 8.05 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H-6), 8.20 (t, J= 5.5 Hz, 1H, H-4'). ¹³C NMR δ: 42.8 (t), 100.0 (s), 111.1 (d), 118.1 (d), 122.6 (d), 122.8 (d), 127.2 (s), 127.5 (d), , 127.9 (s), 128.4 (d), 136.0 (s), 142.9 (s), 158.7 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1613 (C=O), 3334 (NH₂), 3458 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₅H₁₃N₃OS: C, 63.58; H, 4.62; N, 14.83; trov.: C, 63.49; H 4.67; N, 14.75.

N-(4-Metossibenzil)-3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (45b): ottenuti 0.28g di prodotto giallo, resa 65%. P.f. 201-201°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.55 (d, J= 5.2 Hz, 2H, CH₂), 5.80 (s, 1H, NH), 6.09 (s, 2H, NH₂), 6.87 (d, J= 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.28 (d, J= 8.6 Hz, 2H, H-3', H-5'). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 43.0 (t), 55.3 (q), 100.5 (s), 114.1 (d), 123.2 (d), 124.2 (d), 127.8 (d), 129.1 (d), 130.4 (s), 132.4 (s), 137.2 (s), 146.9 (s), 158.9 (s), 165.4 (s). IR (KBr) ν_{max}: 1605 (C=O), 3340 (NH₂), 3445 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₆H₁₅N₃O₂S: C, 61.32; H, 4.82; N, 13.41; trov.: C, 61.18; H 4.67; N, 13.12.

N-(4-Metilbenzil)-3-aminotieno[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (45c): ottenuti 0.27g di prodotto bianco, resa 66%. P.f. 196-197°C. ¹H NMR δ: 3.36 (s, 3H, CH₃), 4.38 (d, J= 5.6 Hz, 2H, CH₂), 7.16-7.05 (m, 4 H, H-2', H-6', NH₂), 7.19 (t, J= 6.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.19 (t, J= 6.9 Hz, 1H, H-4), 7.84 (d, J= 7.6 Hz, 1H, H-6), 8.16 (t, J= 5.7 Hz, 1H, H-

5). ^{13}C NMR δ : 20.6 (q), 41.9 (t), 99.0 (s), 99.5 (s), 112.4 (d), 123.0 (d), 123.8 (d), 127.1 (d), 128.7 (d), 132.2 (s), 135.5 (s), 136.9 (s), 147.55 (s), 165.0 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1603 (C=O), 3341 (NH₂), 3443 (NH) cm⁻¹; Anal Calc per C₁₆H₁₅N₃OS: C, 64.62; H, 5.08; N, 10.78; trov.: C, 64.73; H 5.13; N, 10.82.

Procedura generale per la sintesi di 3-arilpirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-oni 33a,c-f e 46a-c.

Ad una soluzione di carbossiamide **38 a,c-f** (1.0 mmol) in una miscela acido acetico glaciale/HCl 6N (1:1, 10 ml) viene aggiunto a -10°C sodio nitrito (1.8 mmol) sciolto nella minima quantità di acqua. Si lascia ad agitare la miscela per 2h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). Il solido formatosi viene filtrato, essiccato, e ricristallizzato da etanolo.

3-Fenil-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (33a): ottenuti 0.30g di solido bianco, resa 85%. P.f. 198°C. ^1H NMR δ : 7.62-7.70 (m, 5H), 7.84 (d, J= 3.0 Hz, 1H), 8.94 (d, J= 8.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR δ : 122.4 (d), 126.4 (s), 126.7 (d), 127.9 (s), 129.0 (d), 129.5 (d), 132.4 (d), 138.3 (s), 146.0 (s), 152.2 (d), 152.7 (s), 161.32 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1657 (CO) cm⁻¹. m/z: 280 (100.0%). Anal Calc per C₁₄H₈N₄OS: C, 59.99; H, 2.88; N, 19.99; trov.: C, 59.04; H, 2.67; N, 20.00.

3-(4-Metilfenil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (33c): ottenuti 0.15g di solido bianco, resa 55%. P.f. 196-178°C. ^1H NMR (CDCl₃) δ : 7.42 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 7.49 (dd, J= 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 8.51 (dd, J= 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.59 (dd, J= 4.8, 1.7 Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ : 21.2 (q), 77.7 (s), 100.0 (s), 119.6 (d), 121.8 (d), 129.1 (d), , 130.6 (d), 133.2 (s), 134.3 (s), 138.9 (s), 146.1 (s), 147.3 (d), 163.49 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1695 (CO) cm⁻¹. m/z: 294 (100.0%). Anal Calc per C₁₅H₁₀N₄OS C, 61.21; H, 3.42; N, 19.04; trov.: C, 61.13; H, 3.51; N, 18.96.

3-(3-Cloro-4-fluorofenil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (33d): ottenuti 0.14g di solido marrone, resa 40%. P.f. 253-254°C. ^1H NMR δ : 7.62-7.94 (m, 3H), 8.06 (d, J= 3.7 Hz, 1H), 8.89-9.14 (m, 2H). IR (KBr) ν_{max} : 1684 (CO) cm⁻¹. m/z: 332 (100.0%), 334 (30%). Anal Calc per C₁₄H₆ClFN₄OS: C, 50.53; H, 1.82; N, 16.84; trov.: C, 50.04; H, 1.12; N, 16.77.

3-(3,4,5-Trimetossifenil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (33e): ottenuti 0.18g di solido bianco, resa 75%. P.f. 226-228°C. ^1H NMR (CDCl₃) δ : 1.25 (s, 3, CH₃), 3.92 (s, 6H, 2xCH₃), 6.92 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.21-7.32 (m, 1H, H-5), 7.66 (d,

J= 8.1 Hz, 1H, H-4), 8.91 (d, J= 4.5 Hz, 1H, H-6). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 56.3 (q), 61.01 (q), 100.0 (s), 103.9 (d), 121.7 (d), 126.8 (s), 132.3 (d), 133.7 (s), 138.9 (s), 143.7 (s), 146.2 (s), 152.0 (d), 153.1 (s), 153.4 (s), 156.9 (s), 177.1 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1688 (CO) cm^{-1} . m/z: 370 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 55.13; H, 3.81; N, 15.13; trov.: C, 55.00; H, 3.44; N, 15.12.

3-(3-Metossifenil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (33f): ottenuti 0.23g di solido bianco, resa 65%. P.f. 202-203°C. ^1H NMR δ : 3.83 (s, 3H), 7.14-7.35 (m, 3H), 7.55 (t, J= 7.6 Hz, 1H), 7.81 (d, J= 13.2 Hz, 1H), 8.95 (d, J= 8.6 Hz, 2H). ^{13}C NMR δ : 55.5 (q), 99.5 (s), 112.6 (d), 115.2 (d), 118.9 (d), 122.4 (d), 125.5 (s), 126.4 (s), 129.9 (d), 132.4 (d), 139.3 (s), 146.0 (s), 152.7 (d), 159.48 (s), 161.32 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1686 (CO) cm^{-1} . m/z: 310 (100.0%). Anal Calc per $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ C, 58.05; H, 3.25; N, 18.05; trov.: C, 58.13; H, 3.51; N, 18.67.

3-Benzilpirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (46a): ottenuti 0.11g di prodotto giallo, resa 20%. P.f. 196°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.73 (s, 2H), 7.26-7.45 (m, 4H), 7.60 (dd, J= 13.6, 5.3 Hz, 3H), 8.57-9.11 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 53.9 (t), 99.9 (s), 121.5 (d), 126.8 (s), 128.6 (d), 128.8 (d), 129.1 (d), 132.1 (d), 134.9 (s), 147.1 (s), 151.8 (d), 153.2 (s), 193.1 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1680 (C=O) cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_4\text{OS}$: C, 59.99; H, 2.88; N, 19.99; trov.: C, 59.80; H 2.75; N, 19.80.

3-(4-Metossibenzil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (46b): ottenuti 0.12g di prodotto giallo, resa 30%. P.f. 182-183°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 3.78 (s, 3H), 5.67 (s, 2H), 6.87 (d, J= 8.5 Hz, 2H), 7.52 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.57-7.66 (m, 1H), 8.77 (d, J= 7.0 Hz, 1H), 8.85 (d, J= 4.0 Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 53.5 (t), 55.3 (q), 114.1 (d), 121.5 (d), 126.8 (s), 127.1 (s), 127.7 (s), 130.7 (d), 132.1 (d), 147.01 (s), 151.8 (d), 153.1 (s), 159.7 (s), 162.6 (s), 176.8 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1682(C=O) cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: C, 59.25; H, 3.73; N, 17.27; trov.: C, 59.23; H 3.76; N, 17.33.

3-(4-Metilbenzil)-pirido[3',2':4,5]tieno[3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-one (46c): ottenuti 0.10g di prodotto bianco, resa 25%. P.f. 168-169°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.32 (s, 3H), 5.69 (s, 2H), 7.16 (d, J= 7.4 Hz, 2H), 7.46 (d, J= 7.7 Hz, 2H), 7.53-7.68 (m, 1H), 8.77 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 8.70-8.91 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 21.2 (q), 53.8 (t), 100.0 (s), 121.5 (d), 126.8 (s), 129.1 (d), 129.5 (d), 131.98 (s), 132.1 (d), 138.4 (s), 151.8 (d), 153.14 (s), 162.61 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1683(C=O) cm^{-1} ; Anal Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$: C, 62.32; H, 3.92; N, 18.17; trov.: C, 62.16; H 3.87; N, 18.24.

Preparazione di etil 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-carbossilato (49) [57].

Ad una sospensione di Cs_2CO_3 (2.1 mmole) ed etil glicolato (0.8 mmol) in NMP (5ml) viene aggiunta 2-cloro-3-cianopiridina (0.7 mmol) in condizioni rigorosamente anidre. La miscela di reazione viene quindi riscaldata a 70°C per 12 h. Si raffredda la soluzione, si versa in H_2O (50 ml) e si estrae con etere di etilico (3x50 ml). La fase organica viene quindi lavata con acqua (3x10ml), disidratata con MgSO_4 e purificata mediante cromatografia su colonna (eluente etere di petrolio:etile acetato 7:3). Ottenuti 1.4 g di prodotto bianco, resa 70%. P.f. 106°C . ^1H NMR δ : 1.43 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 4.44 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 5.03 (br s, 2H), 7.25 (dd, $J=7.8, 4.7$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J=7.8, 1.7$ Hz, 1H), 8.50 (dd, $J=4.7, 1.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR δ : 14.5 (q), 60.7 (t), 114.2 (s), 118.7 (d), 124.4 (s), 129.7 (d), 137.1 (s), 148.8 (d), 159.9 (s), 161.6 (s). IR (KBr) ν_{max} : 1678 (C=O), 3402 e 3351 (NH_2) cm^{-1} .

Preparazione di 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-acido carbossilico (52).

Ad una soluzione di **49** (0.9 mmol) in etanolo (15 ml) viene aggiunta una soluzione di idrossido di sodio al 10%. La reazione è posta a reflusso per 3h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio tramite TLC). La miscela di reazione viene acidificata con acido cloridrico 6N, il solido formatosi viene filtrato ed essiccato. Ottenuti 0.70g di prodotto giallo paglierino, resa 100%. P.f. $280\text{-}281^\circ\text{C}$ ^1H NMR δ : 5.67 (s, 2H, NH_2), 7.23 (dd, $J=7.6, 4.9$ Hz, 1H), 8.15 (dd, $J=7.7, 1.6$ Hz, 1H), 8.26 (dd, $J=4.8, 1.5$ Hz, 1H). Anal Calc per $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$: C, 53.94; H, 3.39; N, 15.73; trov.: C, 53.80; H 3.45; N, 15.45.

Procedura generale per la sintesi di N-aril 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-carbossiamide 53a,c.

Ad una soluzione di acido carbossilico **52** (1.0 mmol) in etile acetato (15 ml) viene aggiunto TBTU (1.1 mmol) e trietilammina (1.5 mmol). La miscela viene lasciata ad agitare a 25°C per 30 minuti. Si aggiungono quindi le opportune aniline **30a,c** (1.0 mmol) e la miscela viene lasciata ad agitare per una notte. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il prodotto grezzo purificato mediante cromatografia su colonna.

N-Fenil 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (53a): ottenuti 0.30g di prodotto giallo, resa 87%. P.f. $187\text{-}188^\circ\text{C}$ ^1H NMR δ : 6.46 (s, 2H, NH_2), 7.06 (t, $J=7.3$

Hz, 1H, H-4'), 7.32 (d, J= 8.0 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.44-7.38 (m, 1H, H-5), 7.85 (d, J= 7.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 8.40 (dd, J= 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-4), 8.48 (dd, J= 4.8, 1.7 Hz, 1H, H-6), 10.0 (s, 1H, NH). ¹³C NMR δ: 114.7 (s), 119.0 (d), 120.2 (d), 123.2 (d), 124.1 (s), 128.4 (d), 131.2 (d), 136.3 (s), 138.9 (s), 147.9 (d), 158.8 (s), 159.5 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1675(C=O), 3326-3334 (NH₂), 3586(NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₄H₁₁N₃O₂: C, 66.40; H, 4.38; N, 16.59; trov.: C, 66.33; H 4.42; N, 16.35.

N-p-Tolil 3-aminofuro[2,3-b]piridina-2-carbossiamide (53c): ottenuti 0.13g di prodotto giallo, resa 68%. P.f. 178-179°C ¹H NMR δ: 2.27 (s, 3H, CH₃), 6.43 (s, 2H, NH₂), 7.12 (d, J= 4.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.43-7.31 (m, 1H, H-5), 7.73 (d, J= 5.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 8.45-5-37 (m, 2H, H-4, H-6), 9.94 (s, 1H, NH). ¹³C NMR δ: 20.4 (q), 114.8 (s), 118.9 (d), 120.2 (d), 124.19 (s), 128.8 (d), 131.1 (d), 132.0 (s), 136.0 (s), 136.3 (s), 147.8 (d), 158.8 (s), 159.35 (s). IR (KBr) ν_{\max} : 1682(C=O), 3324 e 3335 (NH₂), 3590 (NH) cm⁻¹. Anal Calc per C₁₅H₁₃N₃O₂: C, 67.40; H, 4.90; N, 15.72; trov.: C, 67.39; H 4.57; N, 15.65.

b.STUDI COMPUTAZIONALI

i.Protocollo VLAK (Virtual Lock-and-Key)

Le strutture dei composti contenuti nel NCI AntiCancer Agenti Mechanism (NCI ACAM) [84,56,87] e la benzo[3,2-d]-1,2,3-triazine, sono state elaborate sotto vuoto ed ottimizzate con il software ligprep [93]. Sono stati esclusi i derivati contenenti cationi o costituiti da una miscela di due strutture. Così il database di partenza era costituito da 114 composti classificati in sei meccanismo d'azione: 30 agenti alchilanti, 13 agenti antimetaboliti, 24 Inibitori della topoisomerasi I; 15 Inibitori della topoisomerasi II, 16 antimetaboliti RNA/DNA; 16 antimetaboliti DNA. Per il calcolo descrittore molecolare è stato utilizzato il software CODESSA PRO [94].

Per ogni classe di farmaci (agenti alchilanti, agenti antimetaboliti, inibitori della topoisomerasi I, inibitori della topoisomerasi II, antimetaboliti RNA/DNA e antimetaboliti DNA), si è generato il modello del "lock" (serratura) a partire da farmaci noti. Il protocollo dettagliato VLAK è stato riportato in letteratura [111].

c.SAGGI BIOLOGICI

i.Metodologia DTP - NCI per lo screening *in vitro*

Le linee cellulari tumorali sono fatte crescere nel terreno di coltura RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 contenente il 5% di siero bovino fetale e L-glutammina (2 mM). Per un tipico esperimento di screening, le cellule sono inoculate in piastre a 96 pozzetti a 100 µL e sono piastrate alla densità di 5000 - 40000 cellule/pozzetto a seconda della velocità di crescita della singola linea cellulare. Dopo la semina, le piastre vengono incubate a 37°C, in aria contenente 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa per 24 h prima di aggiungere i composti in esame.

Dopo un giorno, due piastre per ogni linea cellulare vengono fissate *in situ* con TCA, per ottenere la popolazione cellulare per ogni linea di cellule tumorali, prima dell'aggiunta della sostanza (Tz).

I composti da testare vengono solubilizzati in DMSO ad una concentrazione 400 volte più alta di quella desiderata e conservati in congelatore prima dell'uso. Al momento dell'aggiunta del composto, un'aliquota del concentrato congelato è stato scongelato e diluito con mezzo di coltura, contenente 50 µg di gentamicina, sino ad una concentrazione pari al doppio della concentrazione massima finale desiderata. Infine vengono preparate altre 4 diluizioni seriali (1:10) per un totale di 5 diverse soluzioni a concentrazione diverse, più una soluzione di controllo.

Screening test a 1-dose 60 linee cellulari: il giorno dell'esecuzione del test o il giorno precedente l'aggiunta, alle piastre con le colture cellulari viene aggiunto anche lo standard adriamicina (NSC 123127) preparato e conservato nelle stesse condizioni del composto da saggiare. Il test viene condotto alla singola dose di 10⁻⁵ M. Se i risultati ottenuti superano i criteri di selezione, il composto viene saggiato nuovamente nello screening a 5-dosi 60 linee cellulari.

Aliquote di 100 µl di queste diverse soluzioni vengono aggiunte agli appropriati pozzetti, già contenenti 100 µl di mezzo di coltura, in modo da ottenere la concentrazione desiderata di composto. Dopo l'aggiunta del campione in esame, le piastre vengono incubate a 37°C, in aria contenente 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa per 48 h.

Per cellule aderenti, il saggio termina con l'aggiunta di TCA freddo: le cellule sono fissate *in situ* con l'aggiunta di 50 µl di TCA freddo al 50%_{p/v} e incubate per 60 minuti a

4°C. Si scarta il supernatante e le piastre vengono lavate cinque volte con acqua ed asciugate all'aria. Quindi, dopo aggiunta di 100 µl di soluzione sulforodamina B (SRB) (0.4%_{p/v} in 1% di acido acetico), le piastre vengono nuovamente incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo il fissaggio, il colorante non legato viene rimosso con cinque lavaggi con acido acetico al 1% e le piastre vengono asciugate all'aria. Infine, il colorante viene solubilizzato con TRIZMA [tris(idrossimetil)amminometano] e si misura l'assorbanza su un lettore di piastre automatico alla lunghezza d'onda di 515 nm. Per cellule in sospensione si utilizza la medesima metodologia ma il test termina con il fissaggio delle cellule alla base dei pozzetti mediante l'aggiunta di 50 ml di TCA al 80%.

Si ottengono così 7 misure di assorbanza: tempo zero (Tz), controllo (c), e crescita cellulare in presenza di una delle 5 concentrazioni di composto in esame (Ti). La percentuale di inibizione della crescita è calcolata per ogni concentrazione cellulare secondo l'equazione (2a) se $T_i \geq T_z$; oppure secondo l'equazione (2b) quando $T_i < T_z$.

$$\frac{(T_i - T_z)}{(C - T_z)} \times 100 \quad (2a)$$

$$\frac{(T_i - T_z)}{T_z} \times 100 \quad (2b)$$

È quindi possibile calcolare, per ogni composto testato, tre parametri dose-risposta. GI₅₀ (percentuale di inibizione è pari a 50) rappresenta la dose in cui la crescita si è dimezzata. TGI rappresenta invece la concentrazione cui la crescita è totalmente inibita (quando $T_i = T_z$). Infine, LC₅₀ rappresenta la dose letale, calcolata quando, secondo l'equazione 2b, il valore è pari a -50. Qualora inoltre l'effetto non venga raggiunto o addirittura venga superato, il valore di tale parametro è espresso con un ">" o un "<" la concentrazione massima o minima testata.

ii. Attività Antiproliferativa

Prodotti chimici e reagenti: Propidio ioduro, ribonucleasi A (RNasi A), MTT, e DMSO sono stati acquistati da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). RPMI, siero fetale bovino (FBS), tampone fosfato salino (PBS), soluzione di L-glutamina (200 mM), tripsina-EDTA soluzione (170.000 UI/L-tripsina e 0,2 g/L-EDTA) e soluzione di

penicillina-streptomicina (10.000 U/ml di penicillina e 10 mg/ml di streptomicina) sono stati acquistati da Lonza (Verviers, Belgio).

Culture cellulari: Le cellule della linea tumorale HeLa (tumore epiteliale cervice umana) sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). Le cellule sono state coltivate in RPMI supplementato con 5% FBS, 2 mM L-glutamina, 50 IU/ml di penicillina, e 50mg/ml streptomicina e mantenute in atmosfera umidificata con 5% CO₂ a 37°C. Le cellule sono state coltivate ordinariamente in fiasche di 75 cm² e sono state tripsinizzate utilizzando tripsina-EDTA. Quando le cellule hanno raggiunto circa il 80% di confluenza sono state utilizzate per gli esperimenti.

Saggio MTT: I triazeni benzotiofenici bisostituiti ed i derivati pirido-tieno-triazinoni sono stati sottoposti al test MTT per valutare l'attività di inibizione della crescita contro cellule MCF-7, ed HeLa, secondo il protocollo descritto da Mossmann [109].

Le cellule sono state seminate in una serie di piastre standard a 96 pozzetti in 100 µl di terreno di coltura completo, a 2.0×10^4 cellule/cm². Sono state quindi incubate per 24 h sotto 5% di CO₂ a 37°C e il medium è stato poi sostituito con 100 µl di medium fresco integrato del 5% (v/v) di FBS. Dalle soluzioni madre (20 mM) sono state preparate sciogliendo i composti selezionati in DMSO. Le soluzioni di lavoro sono state preparate al momento dei test mediante diluizione delle soluzioni madre nel terreno di coltura completo. Per l'esperimento è stato usato un intervallo di concentrazione da 1 a 50 µM. 24 Ore dopo la semina, aliquote di 100 µl di soluzioni a diverse concentrazioni sono state aggiunte ai pozzetti e le cellule sono state incubate per 24 h senza rinnovo del mezzo. In ciascun esperimento, la concentrazione di DMSO non ha mai superato 0.25% ed è stato usato come controllo terreno di coltura con 0.25% di DMSO. Dopo il periodo di incubazione, le cellule sono state lavate e sono stati aggiunti 50 µL di medium privo di FBS contenente 0.5 mg/ml di MTT. Il medium è stato scartato dopo una incubazione di 4 h a 37°C e il formazano blu formatosi nelle cellule è stato dissolto in DMSO. L'assorbanza (OD, densità ottica) a 570 nm di MTT-formazano è stata misurata in un lettore di micropiastre. Poichè l'assorbanza è direttamente proporzionale al numero di living, cellule metabolicamente attive, la percentuale di crescita (PG) rispetto alle cellule di controllo per ciascun farmaco è stata calcolata secondo una delle due seguenti espressioni:

se $(OD_{test} - OD_{tzero}) \geq 0$,

$$\text{allora } PG = 100 \times (OD_{test} - OD_{tzero}) / (OD_{ctr} - OD_{tzero});$$

se $(OD_{test} - OD_{tzero}) < 0$,

$$\text{allora } PG = 100 \times (OD_{test} - OD_{tzero}) / OD_{tzero};$$

dove:

OD_{tzero} è la media delle misurazioni di densità ottica alla prima esposizione delle cellule a del composto di prova,

OD_{test} è la media delle misurazioni di densità ottica dopo il periodo di tempo desiderato,

e OD_{ctr} è la media delle misurazioni di densità ottica dopo il periodo di tempo desiderato senza esposizione delle cellule al composto in esame.

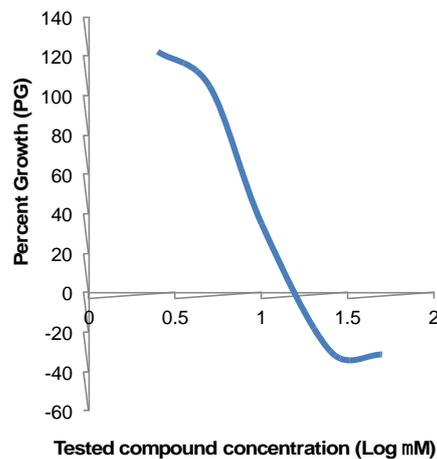


Figura 29

La concentrazione necessaria per il 50% di inibizione della crescita (GI50) per ciascun derivato è stato calcolato dalle curve concentrazione-risposta (Fig. 29) utilizzando l'analisi di regressione lineare inserendo le concentrazioni di prova che fornire valori PG sopra e sotto il valore di riferimento (50%). Ciascun risultato era il valore medio di tre esperimenti diversi eseguiti in quadruplicato.

Analisi del Ciclo Cellulare: Gli studi sugli effetti dell'esposizione di **32c** sul ciclo cellulare sono stati eseguiti mediante colorazione del DNA con ioduro di propidio (PI) e analisi di citometria a flusso. Le cellule MCF-7 sono state seminate su piastre 12 pozzetti ad una densità di $2,5 \cdot 10^4$ cellule/cm² e trattate 24 h dopo la semina con o senza concentrazioni indicate di composto di prova per 12 o 24 h. In seguito al trattamento, le cellule sono state raccolte, lavate in PBS e colorate con soluzione colorante (20 µg/ml di ioduro di propidio, 200 µg/ml RNasi A e 0.1% Triton X-100 in PBS) per 30 min a

37°C. Il contenuto di DNA di più di 10000 cellule sono state sottoposte ad analisi fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Coulter Epics ® ® XLTM, Beckman) ed è stata determinata quindi la percentuale di cellule appartenenti alle varie fasi del ciclo cellulare. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato e riprodotti almeno due volte.

Analisi statistica dei dati: L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il t-test di Student per stabilire le differenze tra i gruppi di dati. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

d.STUDI DI INTERAZIONE CON ct-DNA

Spettroscopia UV-VIS: Le soluzioni di DNA sono state preparate a partire da DNA di timo di vitello liofilizzato (Fluka, BioChemika) risospeso in tris-idrossimetilaminometano (Tris-HCl) 1.0 mM e dializzato secondo letteratura. La concentrazione del DNA, espressa in unità monomeriche ($[DNA_{fosfato}]$), è stata quindi determinata attraverso spettrofotometria UV, usando $7000 M^{-1} cm^{-1}$ come coefficiente d'estinzione molare a 258 nm. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in soluzione acquosa tampone Tris - HCl a pH~7.5.

Tutti i composti, tranne **23a**, sono stati sciolti in DMSO e gli esperimenti sono stati condotti in miscela DMSO/Tris-HCl a pH=7.5 con concentrazione finale di DMSO mai superiore al 5% come riportato in letteratura [112]. Il derivato **23a** è risultato insolubile in DMSO/Tris HCl e pertanto è stata necessaria una miscela etanolo/Tris-HCl per potere effettuare le titolazioni con il DNA.

Gli spettri di assorbimento UV-visibile sono stati registrati a 25°C. Le titolazioni sono state effettuate aggiungendo quantità crescenti di ct-DNA alla soluzione di ligando con concentrazione costante. Per garantire che durante la titolazione la concentrazione del ct-DNA sia rimasta inalterata, per ogni aggiunta della soluzione di ligando, è stato aggiunto lo stesso volume di doppio concentrato per soluzione ct-DNA.

Esperimenti di melting: Esperimenti di fusione del DNA sono stati eseguiti monitorando l'assorbanza di ct-DNA (258 nm) a varie temperature in assenza ed in presenza dei ligandi a vari rapporti. Le curve sono state ottenute utilizzando soluzioni con una concentrazione costante di DNA (50µM) in Tris-HCl e di 1µM quantità crescenti di ciascun ligando.

Studi di dicroismo circolare: Gli spettri sono stati registrati a 25°C con i seguenti parametri: gamma 600-200 nm, r arresto: 0.2 Nm, velocità: 200 nm/min, accumulo: 4, risposta: 0.5 s, larghezza di banda: 1 nm, sensibilità: 20 MDEG. Le titolazioni sono state effettuate aggiungendo quantità crescenti di soluzioni madre di composto a soluzioni di DNA con concentrazione costante. Per garantire che durante la titolazione la concentrazione del ct-DNA rimasse inalterata, per ogni aggiunta della soluzione di farmaco, è stato aggiunto lo stesso volume di doppio concentrato per soluzione ct-DNA.

Studi di viscosità: Le misurazioni della viscosità sono state eseguite sul viscosimetro Ubbelodhe, con un diametro di 0.40 millimetri capillare, mantenuto a $22.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ da un bagno termostatico. Il tempo di scorrimento è stato misurato con un cronometro digitale, i valori medi delle misurazioni replicati sono stati utilizzati per valutare la viscosità dei campioni. La radice cubica della viscosità relativa (η/η_0), è stata diagrammata in funzione del rapporto molare [ligando]/[DNA_{fosfato}] [113], dove η_0 è la viscosità della soluzione di DNA da solo. La viscosità cinematica è stata calcolata dalla seguente equazione

$$\eta = K (t - \theta)$$

dove $K = 00:01 \text{ mm}^2/\text{s}$ e $\theta=00.04 \text{ s}$ sono due costanti caratteristiche del Ubbelodhe micro-viscosimetro, e t (in s) è la costante di efflusso.

8.BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html
- [2] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, *Nat. Med.* 10 (2004) 789–799.
- [3] H.M. Beere, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 2641–2651.
- [4] D.A. Lauffenburger, A.F. Horwitz, *Cell.* 84 (1996) 359–369.
- [5] P. Griess, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 121 (1862) 257–280.
- [6] K. Vaughan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* (1977) 17–20.
- [7] Clarke D.A., Barclay R.K., Randesvedt C.S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90 (1955) 484.
- [8] Burchenal J.H., Dagg M.K., Beyer M., Stock C.C., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91 (1956) 398.
- [9] Colombo T., D’Incalci M., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 13 (1984) 139.
- [10] Giraldi T., Sava G., Perissin L., Zorzet S., *Recent Adv. Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother.*, 14Th, 1985, 533.
- [11] Wilman D.E., *Cancer Treat. Rev.*, 15 (1988) 69.
- [12] N.S. Mizuno, R.W. Decker, *Biochem. Pharmacol.* 25 (1976) 2643–2647.
- [13] H.M. van Delft, A. Luiten-Schuite, V.L. Souliotis, S.A. Kyrtopoulos, J. Ouwkerk, H.J. Keizer, et al., *Biomarkers.* 1 (1996) 94–98.
- [14] G. Cirrincione, A.M. Almerico, E. Aiello, G. Dattolo, S. Grimaudo, P. Diana, *Synth. Commun.* 23 (1993) 1627–1631.
- [15] Dattolo G., Cirrincione G., Almerico A.M., Aiello E., Grimaudo S., Diana P., Rausa L., Dusonchet L., Crosta L., Tolomeo M., Candiloro V., Meli M., *Farmaco*, 1993, 48, 191-194.
- [16] G. Cirrincione, A. Almerico, G. Dattolo, E. Aiello, P. Diana, S. Grimaudo, et al., *Eur. J. Med. Chem.* 29 (1994) 889–891.
- [17] P. Diana, P. Barraja, A. Lauria, A.M. Almerico, G. Cirrincione, A.G. Loi, et al., *Eur. J. Med. Chem.* 34 (1999) 353–360.
- [18] Barraja P., Diana P., Lauria A., Montalbano A., Almerico A.M., Dattolo G., Cirrincione G., *Anticancer Res.*, 2002, 22, 837-840.
- [19] Diana, P., Stagno, A., Barraja, P., Carbone, A., Parrino, B., Dall’Acqua, F., Vedaldi, D., Salvador, A., Brun, P., Castagliuolo, I., Issinger, O.G., Cirrincione, G., *ChemMedChem*, 2011, 6, 1291-1299.
- [20] Stevens MF, Newlands ES. *Eur J Cancer* 1993; 7: 1045–47
- [21] Stevens MF, Hickman JA, Stone R, et al. *J Med Chem* 1984; 27: 196–201.
- [22] Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, et al. *Cancer Res* 1987; 47: 5846–52.
- [23] E.S. Newlands, G.R.P. Blackledge, J.A. Slack, G.J. Rustin, D.B. Smith, N.S. Stuart, et al., *Br. J. Cancer.* 65 (1992) 287–291.
- [24] P.Diana, P.Barraja, A.Lauria, A.Montalbano, A.M.Almerico, G.Dattolo and G.Cirrincione, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11, 2371-2380.
- [25] Gokaraju G.R., Kasina S., et al., U.S.Patent, 2010, US 2010/0068178 A1.
- [26] Perspicace, V. Jouan-Hureauux, R. Ragno, F. Ballante, S. SartiniC. La Motta, F. Da Settimo, B. Chen, G. Kirsch, S. Schneider, *Eur. J. Med. Chem.* (2013), 63, 765-781.
- [27] W. Mederski, T. Fuchss, U. Emde, H.P. Buchstaller, *PCT Int. Appl.* (2013), WO 2013072015 A1 20130523
- [28] Y. S. Babu, P.L. Kotian, V.S. Kumar, VM. Wu, T-H. Lin, Tsu-Hsing *PCT Int. Appl.* (2011), WO 2011031554 A2 20110317

- [29] A.E. Mahmoud, M.M. Ali, A.E. Rashad, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* (2011), 4 (Suppl. 1), 118-122.
- [30] G. Cirrincione, A.M. Almerico, P. Barraja, P. Diana, A. Lauria, A. Passannanti, et al., *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2561–2568.
- [31] P. Diana, P. Barraja, A. Lauria, A. Montalbano, A.M. Almerico, G. Dattolo, et al., *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 267–272.
- [32] A. Lauria, C. Patella, I. Abbate, A. Martorana, A.M. Almerico, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 381–388.
- [33] J.R. Beck, J.A. Yahner, *J. Org. Chem.* 41 (1976) 1733–1734.
- [34] G.L. Viswanatha, B. Janaki Priyadarshini, S. Hanumanthappa, S. Rangappa, S. Janardhanan, *Oman Med. J.* 27 (2012) 388–395.
- [35] J.R. Beck, J.A. Yahner, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 2450–2452.
- [36] S. W. Schneller, F. W. Clough, *Heterocycles*. 3 (1975) 135.
- [37] A.J. Bridges, H. Zhou, *J. Heterocycl. Chem.* 34 (1997) 1163–1172.
- [38] I.N. Nesterova, V.S. Velezheva, L.M. Alekseeva, E.N. Padeiskaya, T.P. Radkevich, O.V. Baklanova, et al., *Pharm. Chem. J.* 24 (1990) 813–817.
- [39] T.C. Bruice, S.J. Benkovic, *Bioorganic Mechanisms*, W. A. Benjamin, 1966.
- [40] R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations: a guide to functional group preparations*, Wiley-VCH, New York, 2011.
- [41] J.C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1067–1068.
- [42] J.D. Wilson, C.F. Hobbs, H. Weingarten, *J. Org. Chem.* 35 (1970) 1542–1545.
- [43] F. Sallas, S.-I. Nishimura, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*. (2000) 2091–2103.
- [44] C. Burnell-Curty, E.J. Roskamp, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 5193–5196.
- [45] P. Fryen, *Synth. Commun.* 25 (1995) 959–968.
- [46] D.O. Jang, D.J. Park, J. Kim, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 5323–5326.
- [47] K. Ishihara, S. Ohara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 4196–4197.
- [48] M. Thorsen, T.P. Andersen, U. Pedersen, B. Yde, S.-O. Lawesson, H.F. Hansen, *Tetrahedron*. 41 (1985) 5633–5636.
- [49] Y. Basel, A. Hassner, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2529–2533.
- [50] K. Wakasugi, A. Nakamura, A. Iida, Y. Nishii, N. Nakatani, S. Fukushima, et al., *Tetrahedron*. 59 (2003) 5337–5345.
- [51] O. Vassilyev, J. Chen, A.P. Panarello, J.G. Khinast, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 6865–6869.
- [52] M.A. Bailén, R. Chinchilla, D.J. Dodsworth, C. Nájera, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 9809–9813.
- [53] L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4397–4398.
- [54] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 1927–1930.
- [55] R.F. Poulain, A.L. Tartar, B.P. Déprez, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 1495–1498.
- [56] N. Sewald, *Peptides: chemistry and biology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [57] T. Cailly, S. Lemaître, F. Fabis, S. Rault, *Synthesis*. 2007 (2007) 3247–3251.
- [58] D. Sengupta, M.T. Nguyen, *Tetrahedron* 53 (1997) 9647–9656.
- [59] P. Diana, P. Barraja, A. Lauria, A. M. Almerico, G. Cirrincione, C. Minnei, S. Longu, D. Congiu, C. Musiu, P. La Colla, *Anticancer Res.*, 1999, 19, 2127-2132.
- [60] P. Barraja, P. Diana, A. Lauria, A. Montalbano, A. M. Almerico, G. Dattolo G. Cirrincione, *Anticancer Res.*, 2002, 22, 837-840.
- [61] A. Lauria, I. Abbate, C. Gentile, F. Angileri, A. Martorana, A.M. Almerico, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 3424–3428.

- [62] A.M. Almerico, M. Tutone, L. Pantano, A. Lauria, *J. Mol. Graph. Model.* 42 (2013) 60–72.
- [63] A. Lauria, M. Ippolito, M. Fazzari, M. Tutone, F. Di Blasi, F. Mingoia, et al., *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2010) 72–81.
- [64] A. Lauria, M. Ippolito, A.M. Almerico, *Comput. Biol. Chem.* 33 (2009) 386–390.
- [65] A. Lauria, M. Ippolito, A.M. Almerico, *J. Mol. Graph. Model.* 27 (2009) 712–722.
- [66] A.M. Almerico, M. Tutone, A. Guarcello, A. Lauria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 1000–1004.
- [67] A. Lauria, C. Patella, I. Abbate, A. Martorana, A.M. Almerico, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 375–383.
- [68] A. Lauria, M. Tutone, A.M. Almerico, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4274–4280.
- [69] J.N. Weinstein, K.W. Kohn, M.R. Grever, V.N. Viswanadhan, L.V. Rubinstein, A.P. Monks, et al., *Science.* 258 (1992) 447–451.
- [70] W.W. van Osdol, T.G. Myers, K.D. Paull, K.W. Kohn, J.N. Weinstein, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 1853–1859.
- [71] A. Lauria, M. Ippolito, A.M. Almerico, *QSAR Comb. Sci.* 28 (2009) 387–395.
- [72] J.A. Sanders, A. Lakhani, C. Phornphutkul, Ke-Y. Wu, P.A. Gruppuso, *Am J Physiol Cell Physiol.* (2008) C406-13.
- [73] A.A. Adjei, M. Charron, E.K. Rowinsky, P.A. Svingen, J. Miller, J.M. Reid, J. Sebolt-Leopold, M.M. Ames, S.H. Kaufmann, *Clin Cancer Res* 4 (1998) 683–691.
- [74] J. Chen, M.K. Ghorai, G. Kenney, J.A. Stubbeaff, *Nucleic Acids Res* 36 (2008) 3781–3790.
- [75] C.J. van Oss, A review of: “Biophysical Chemistry C.R. Cantor and P.R. Schimmel W.H. Freeman 6 Co., San Francisco, 1980. Illustrated, three Volumes: Part I, 341
- [76] L.A. Marky, K.J. Breslauer, *Biopolymers.* 26 (1987) 1601–1620.
- [77] J.G. Duguid, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J. Thomas, *Biophys. J.* 69 (1995) 2623–2641.
- [78] W. Jiskoot, D. Crommelin, *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, Springer, 2005.
- [79] A.K. Patra, S. Roy, A.R. Chakravarty, *Inorganica Chim. Acta.* 362 (2009) 1591–1599.
- [80] A.K. Patra, T. Bhowmick, S. Roy, S. Ramakumar, A.R. Chakravarty, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 2932–2943.
- [81] J.K. Barton, A. Danishefsky, J. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2172–2176.
- [82] D.E.V. Schmechel, D.M. Crothers, *Biopolymers.* 10 (1971) 465–480.
- [85] A. Terenzi, G. Barone, A.P. Piccionello, G. Giorgi, A. Guarcello, P. Portanova, et al., *Dalton Trans.* 39 (2010) 9140–9145.
- [83] A. Wolfe, G.H. Shimer, T. Meehan, *Biochemistry (Mosc.).* 26 (1987) 6392–6396.
- [84] D.E.V. Schmechel, D.M. Crothers, *Biopolymers.* 10 (1971) 465–471.
- [86] M.J. Waring, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 269–274.
- [87] J.M. Kelly, A.B. Tossi, D.J. Mcconnell, C. Ohuigin, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 6017–6034.
- [88] Y.-J. Liu, H. Chao, F.-L. Tau, Y.-X. Yuan, W. Wei, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*

- 99 (2005) 530–537.
- [89] G.A. Neyhart, N. Grover, S.R. Smith, W.A. Kalsbeck, T.A. Fairley, M. Cory, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4423–4428.
- [90] B. Jana, S. Senapati, D. Ghosh, D. Bose, N. Chattopadhyay, Spectroscopic Exploration of Mode of Binding of ctDNA with 3-Hydroxyflavone: A Contrast to the Mode of Binding with Flavonoids Having Additional Hydroxyl Groups, *J. Phys. Chem. B.* 116 (2011) 639–645.
- [91] G.L. Eichhorn, Y.A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 7323–7328.
- [92] A. Rodger, B. Norden, *Circular dichroism and linear dichroism*, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [93] A. Silvestri, G. Barone, G. Ruisi, D. Anselmo, S. Riela, V.T. Liveri, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 841–848.
- [94] G. Barone, N. Gambino, A. Ruggirello, A. Silvestri, A. Terenzi, V.T. Liveri, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 731–737.
- [96] G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers.* 8 (1969) 45–55.
- [97] J. Reynisson, G.B. Schuster, S.B. Howerton, L.D. Williams, R.N. Barnett, C.L. Cleveland, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2072–2083.
- [95] G.A. Neyhart, N. Grover, S.R. Smith, W.A. Kalsbeck, T.A. Fairley, M. Cory, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4423–4428.
- [98] Y.-J. Liu, H. Chao, F.-L. Tau, Y.-X. Yuan, W. Wei, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 530–537.
- [99] L.S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 49 (1963) 94–98.
- [100] G. Dougherty, J.R. Pilbrow, *Int. J. Biochem.* 16 (1984) 1179–1192.
- [101] S. Satyanarayana, J.C. Dabrowiak, J.B. Chaires, *Biochemistry (Mosc.)*. 31 (1992) 9319–9324.
- [102] A. Terenzi, L. Tomasello, A. Spinello, G. Bruno, C. Giordano, G. Barone, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 103–110.
- [103] M.L. Smith, A.J. Fornace Jr., *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 340 (1996) 109–124.
- [104] P. Turner, W. Denny, *Curr. Drug Targets.* 1 (2000) 1–14.
- [105] M. Zihlif, D.R. Catchpole, B.W. Stewart, L.P.G. Wakelin, *Proteomics.* 7 (2010) 323–330.
- [106] S. Antony, K.K. Agama, Z.-H. Miao, M. Hollingshead, S.L. Holbeck, M.H. Wright, et al., *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 1109–1120.
- [107] A.Y. Chen, C. Yu, B. Gatto, L.F. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 8131–8135.
- [108] D.V. Bugreev, E.L. Vasyutina, V.A. Ryabinin, A.N. Sinyakov, V.N. Buneva, G.A. Nevinsky, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11 (2001) 137–147.
- [109] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [110] M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhili, L. Uzelac, I. Jarak, S. Depauw, et al., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5044–5060.
- [111] F. Mingoia, C. Di Sano, F. Di Blasi, M. Fazzari, A. Martorana, A.M. Almerico, et al., *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 345–356.
- [112] F. Bisceglie, S. Pinelli, R. Alinovi, P. Tarasconi, A. Buschini, F. Mussi, et al., *J. Inorg. Biochem.* 116 (2012) 195–203.
- [113] G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers.* 8 (1969) 45–55.