

Università degli Studi di Palermo
Dipartimento di
Chimica e Tecnologie
farmaceutiche

DOTTORATO DI RICERCA
IN
SCIENZE FARMACEUTICHE
(XXII ciclo)

Progettazione, sintesi, caratterizzazione
e attività biologica di nuovi derivati
4-(3*H*)-CHINAZOLINONICI
e METIL-SOLFONICI

DOTTORANDO: Dr. Giovanni Casula

TUTOR: Ch.mo Prof. Demetrio Raffa
COORDINATORE: Ch.mo Prof. Girolamo
Cirrincione

INDICE

INTRODUZIONE Pag. 2

CAPITOLO I:

SINTESI e ATTIVITA' BIOLOGICA DI
NUOVI 4(3H)-chinazolinoni. Pag. 11

CAPITOLO II:

STUDIO DEI PROCESSI DI
FRAMMENTAZIONE INDOTTE
Ionizzazione Elettronica di derivati 3-
isossazolo-2-stririlchinazolin-4(3H)-oni.
Pag. 28

CAPITOLO III

SINTESI e ATTIVITA' BIOLOGICA DI
NUOVI 4-(Ariloil)fenil Metil Solfoni.
Pag 43

INTRODUZIONE:

L'infiammazione può essere considerata come un insieme di reazioni del tessuto vascolare in risposta ad un danno localizzato. Essa è strettamente connessa con il processo di riparazione e ha l'importante funzione di distruggere o circoscrivere l'agente lesivo innescando una complessa serie di eventi che per quanto possibile, permettono la guarigione o "restitutio ad integrum" del tessuto lesso. Il processo infiammatorio ed i meccanismi di riparazione rappresentano due momenti fondamentali nella limitazione delle lesioni. Infatti, senza la risposta, infiammatoria le infezioni procederebbero incontrollate: le ferite ed i traumi stenterebbero a guarire. Tuttavia, gli eventi caratteristici della risposta infiammatoria ed il susseguente processo riparativo possono essere potenzialmente pericolosi. Le reazioni infiammatorie sono, infatti, alla base di importanti patologie quali l'artrite reumatoide ed alcune malattie renali ma anche delle risposte di tipo immunitario del nostro organismo quali le reazioni di ipersensibilità. Inoltre, i tentativi di riparazione possono avere come esito la comparsa di cicatrici o aggregazioni fibrose che, a loro volta, possono provocare ulteriori danni come, ad esempio, una ostruzione intestinale nel caso di una malattia infiammatoria dell'intestino

o limitazioni nella mobilità delle articolazioni nelle patologie infiammatorie dell'apparato muscolo-scheletrico.

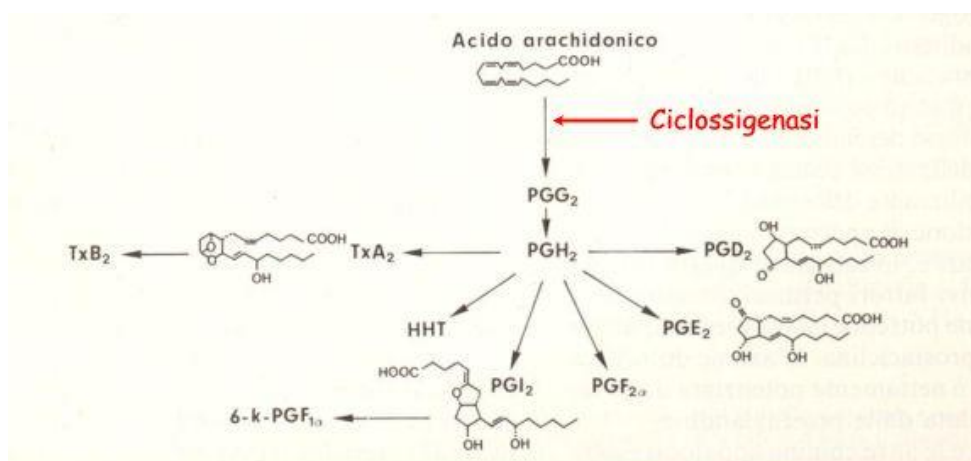
Il danno che innesca la risposta infiammatoria provoca la liberazione di alcune sostanze chimiche che ne rappresentano i mediatori. I principali mediatori dell'infiammazione sono alcune ammine vasoattive come l'istamina e la serotonina, le proteasi plasmatiche, la citochina ed alcuni metaboliti dell'acido arachidonico. Questi ultimi rappresentano forse la classe più importante per l'innescamento ed il mantenimento del processo infiammatorio. Alla famiglia dei metaboliti dell'acido arachidonico o eicosanoidi appartengono le prostaglandine, i leucotrieni e una serie di composti ad essi strettamente correlati. La prima tappa biosintetica degli eicosanoidi consiste nella liberazione dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana attraverso la fosfolipasi A₂.

Una volta rilasciato, l'acido arachidonico viene rapidamente metabolizzato in prodotti ossigenati attraverso la via ciclossigenasica che porta alla formazione di prostaglandine e trombossani e la via lipossigenasica che porta alla sintesi dei leucotrieni. Uno degli enzimi chiave in questo processo di formazione degli eicosanoidi è la prostaglandin-H₂ sintasi-1 (PGHS-1) che svolge due attività principali: un'attività endoperossidosintetasi o ciclossigenasica che ossida e ciclizza l'acido

arachidonico con formazione della prostaglandina G₂ (PGG₂) ed un'attività perossidasi che converte la PGG₂ in prostaglandina H₂ (PGH₂). La PGH₂ è il precursore chiave per l'ottenimento di tutte le altre prostaglandine. E', infatti, un intermedio instabile che viene trasformato enzimaticamente in numerosi eicosanoidi tra cui PGI₂, PGE₂, PGF₂ e PGD₂.

Dal metabolismo dell'endoperossido PGH₂ invece si forma un composto anch'esso instabile e altamente attivo ma strutturalmente differente dalle prostaglandine, il trombossano A₂ (TXA₂) [1].

L'attività ciclossigenasica della PGHS-1 può essere inibita dai farmaci antinfiammatori non steroidei. L'inibizione livello del sito ciclossigenasico (COX) di questo enzima blocca di fatto la trasformazione dell'acido arachidonico in PGG₂ e PGH₂, quindi interrompe la cascata dell'acido arachidonico.



Vane nel 1971 [2] dimostrò che l'effetto antinfiammatorio e analgesico dei FANS è legato

all'inibizione della COX. Fino al 1991 si pensò all'esistenza di un unico enzima responsabile di tutte le reazioni di trasformazione dell'acido arachidonico a PGG₂ e solo vent'anni dopo la scoperta di Vane fu dimostrata l'esistenza di due isoforme delle COX: la COX-1 e la COX-2 [3].

La COX-1 é normalmente presente nei tessuti, dove stimola la sintesi delle prostaglandine che regolano le normali attività cellulari, contribuendo a processi fisiologici quali la citoprotezione gastroenterica, il flusso renale e l'aggregazione piastrinica.

La COX-2 invece, è quasi assente in condizioni fisiologiche e viene espressa nel corso del processo infiammatorio sotto lo stimolo di fattori mitogeni e delle citochine. Questa scoperta ha aperto la porta alla ricerca di molecole ad attività antinfiammatoria che, a differenza dei FANS classici possano agire selettivamente sull'infiammazione senza alterare i meccanismi di protezione della mucosa gastro-duodenale. Poiché le prostaglandine sono importanti mediatori della risposta infiammatoria, appare evidente come i FANS danneggino la mucosa gastroduodenale con un meccanismo identico a quello con cui esercitano la loro azione antinfiammatoria. L'individuazione di due differenti isoenzimi della COX ha suggerito che inibitori selettivi della COX-2 potrebbero bloccare la sintesi delle prostaglandine nei siti d'infiammazione senza interferire con la produzione di prostaglandine nella

mucosa gastroduodenale e quindi essere privi di tossicità in questa sede.

Il recente chiarimento delle differenze biochimiche e dei conseguenti ruoli fisiologici delle due unità isoenzimatiche delle ciclossigenasi ha orientato la ricerca verso la sintesi di composti che presentassero una maggiore attività inibitoria enzimatica nei confronti della ciclossigenasi 2.

I dati di ricerca disponibili dimostrano che gli effetti terapeutici dei FANS sono in gran parte dovuti all'inibizione della COX-2, mentre gli effetti avversi, in particolare gastrotossicità e nefrotossicità, sono legati all'inibizione della COX-1. La selettività per la COX-2 è dunque diventata "sinonimo" di buona tollerabilità gastrica. Ma in realtà la selettività di questi farmaci è spesso solo parziale ed i dati clinici non ne documentano sempre una maggior sicurezza rispetto ai FANS classici.

Per marcare la novità degli inibitori cosiddetti selettivi, l'industria ha deciso di indicarli "erroneamente" come inibitori della COX-2, ma questi nuovi farmaci sono in grado di inibire anche la COX-1, a dosaggi plasmatici nettamente più elevati di quelli necessari ad ottenere in vivo gli effetti terapeutici desiderati; è quindi meglio definirli "COX-2 preferenziali".

E' sulle differenze tra modelli in vitro e modelli in vivo che i suddetti inibitori si caratterizzano per la selettività nei confronti della COX-2. Questi ultimi

sono in grado di produrre il loro effetto antinfiammatorio senza inibire l'aggregazione piastrinica e con una gastrolesività sovrapponibile a quella del placebo sia in modelli animali, sia nella sperimentazione sull'uomo.

Tuttavia l'evoluzione di questi farmaci ha trovato degli ostacoli e a proposito di ciò è molto istruttiva la debacle che le case farmaceutiche hanno dovuto subire con gli antinfiammatori così detti "Innovativi": celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, parecoxib, valdecoxib. La breve cronistoria può ben documentare ciò che è avvenuto:

- Scoperta dei due tipi di cicloossigenasi.
- Tentativo di sfruttare le proprietà dei così detti farmaci antinfiammatori COX-2-inibitori, che presentavano scarsa gastrolesività e, comunque, inferiore ai COX-1 inibitori, già in commercio.
- Operazione capillare e intensa di marketing in molti paesi per promuovere i nuovi COX-2 inibitori.
- Grossi finanziamenti di ricerche che hanno portato all'immissione in commercio di diverse molecole: farmaci me-too, o fotocopia del celecoxib.
- Il 30 settembre 2004 la Merck Sharp & Dohme ritira volontariamente dal mercato mondiale i preparati farmaceutici a base di rofecoxib (in Italia Vioxx, Arofexx, Coxsil, Dolcoxx, Dolostop e Miraxx) a causa di un aumento del rischio di eventi cardiovascolari gravi, osservato nel corso di una sperimentazione clinica condotta per una

indicazione terapeutica (poliposi recidivante in pazienti con storia di adenoma del colon-retto) diversa da quelle approvate a livello internazionale.

- Nel 2005 la Pfizer ritira dal mercato europeo il Bextra (valdecoxib), sempre per gravi effetti collaterali.

- L'Agenzia italiana del Farmaco rinnova l'invito a non usare farmaci antinfiammatori di seconda generazione ancora in commercio (Artilog, Celebrex, Solexa, Algix, Arcoxia, Tauxibin, Dynastat) in chi ha problemi cardiovascolari, è obeso, ha il colesterolo alto, è un forte fumatore, ha problemi alle arterie o alle vene delle gambe.

La speranza di avere farmaci potenti e senza effetti collaterali sembra dunque svanita. I coxib a struttura celecoxib-simile potranno essere impiegati in particolari importanti patologie infiammatorie, ma con raccomandazioni e avvertenze.

Recentemente, in alcune forme tumorali è stata riscontrata una sovra-espressione di COX. Questa scoperta ha aperto nuove possibilità di impiego degli inibitori delle COX che si sono rivelati utili strumenti nel campo della chemio-prevenzione verso vari tipi di cancro. E' riportato che l'ibuprofene, FANS non selettivo per la COX-2, possiede effetti inibitori sulla crescita del tumore e delle metastasi del fegato, potenziando fra l'altro l'attività antineoplastica del 5-fluorouracile [4]. Inoltre in

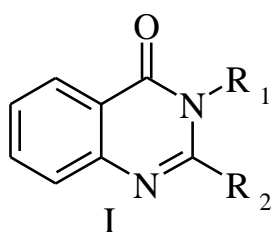
letteratura è stata descritta una attività inibitoria della crescita di adenomi in pazienti con poliposi adenomatosa familiare [5].

Il meccanismo molecolare dell'azione chemiopreventiva dei FANS non è ancora ben chiarito, anche se in letteratura si riporta che tale azione potrebbe essere legata a diversi meccanismi coinvolti nella proliferazione o inibizione della crescita invasiva come l'apoptosi [6], l'angiogenesi [7] e l'attivazione della proteina chinasi G [8]. Durante questi anni di dottorato mi sono occupato della sintesi e della caratterizzazione di nuove molecole che successivamente sono state saggiate per valutarne l'attività antiinfiammatoria e antiproliferativa; in particolare sono stati oggetto del mio studio nuovi derivati **CHINAZOLINONICI** e **METIL-SOLFONICI** i cui risultati, di seguito riportati, sono stati oggetto di pubblicazione. [9-10]

CAPITOLO I:

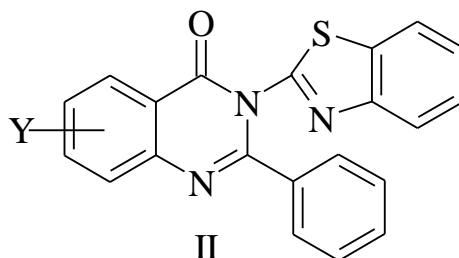
SINTESI e ATTIVITA' BIOLOGICA DI NUOVI 4(3H)-chinazolinoni.

Il nucleo 4-(3H)chinazolinonico **I** rappresenta un sistema estremamente versatile in quanto si trova in diverse molecole dotate di molteplici attività farmacologiche quali l'antinfiammatoria con scarsa o nulla gastrolesività [11-13], la sedativo ipnotica, l'anticonvulsivante e la deprimente il SNC [14], l'antitumorale [15-17], l'antileucemica [18-19] e l'antifungina [20-22].

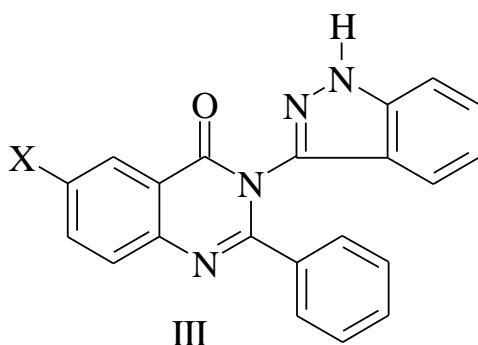


Tenuto conto che queste attività dipendono principalmente dai sostituenti nelle posizioni 2 e 3, è stato intrapreso da tempo lo studio sulla influenza di diversi sostituenti, su derivati 4-(3H)chinazolinonici, N-3 eterociclo sostituiti. Recentemente è stato riportato in letteratura che una serie di derivati benzotiazol-2-il-chinazolinoni

che portano in posizione 2 il fenile **II** mostrano una spiccata attività antinfiammatoria e antimicrobica.[23]



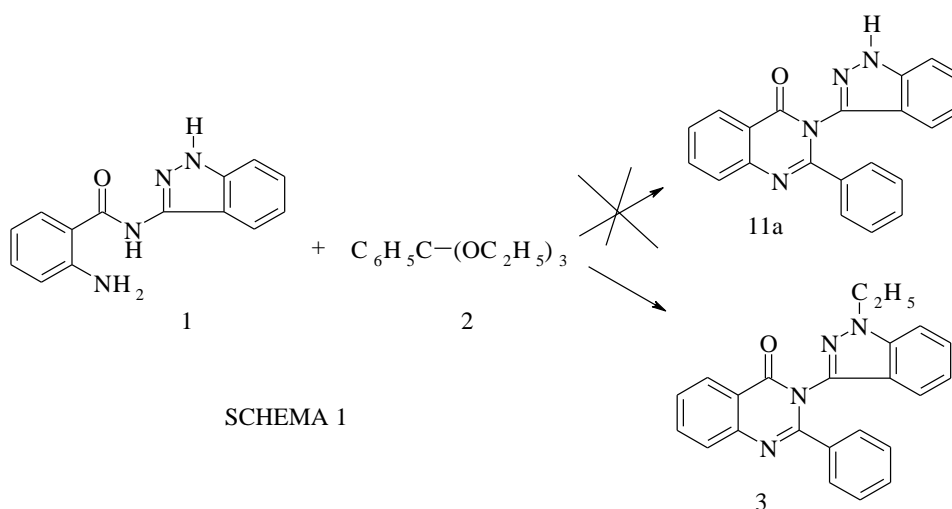
Considerato che nei nostri laboratori è stata sintetizzata una serie di 3-indazol-3-il-chinazolinoni sostituiti in posizione 2 con H, CH₃, C₂H₅ che hanno mostrato attività antiproliferativa [24], si è deciso di preparare nuovi derivati 2-fenil-3-indazol-3-il-chiazolinoni per studiare l'eventuale ruolo del fenile in posizione 2 riguardo le attività biologiche sopra menzionate.



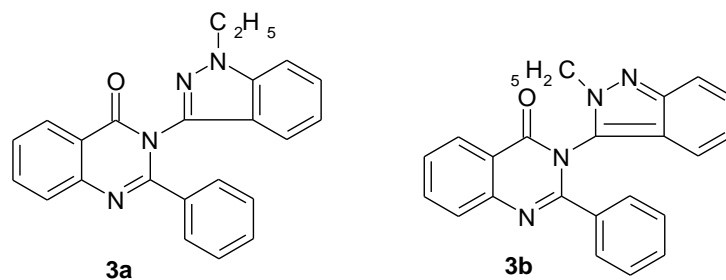
	a	b	c	d
X	H	CH ₃	Cl	Br

SINTESI

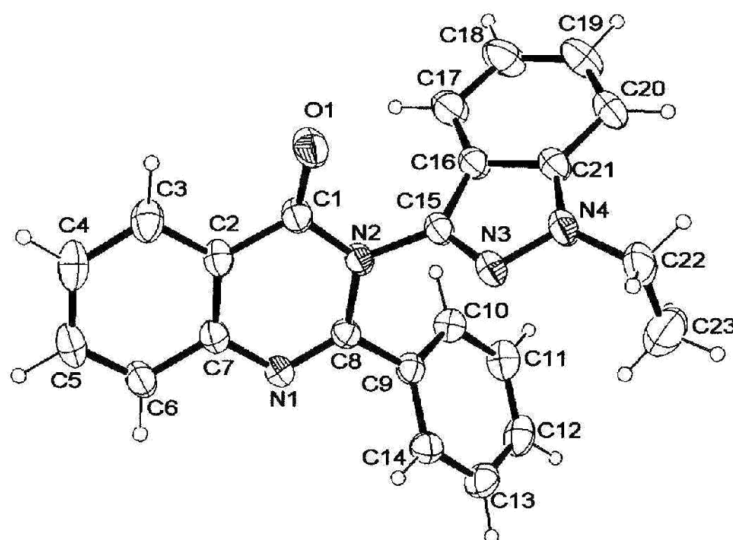
Per la sintesi del 4-(3*H*)-chinazolinone-3-indazolil sostituito **11a** è stata seguita la via di reazione a riflusso il 3-(2-aminobenzamido)indazolo **1** con trietilortobenzoato **2** secondo una procedura precedentemente descritta. (SCHEMA 1).[24]



Invece del previsto 3-(1*H*-indazol-3-il)-2-fenilchinazolinone **11a**, è stato isolato il prodotto **3**, avente una massa $M+28$. Dai dati analitici e spettroscopici di questo prodotto si è chiarito che era avvenuta una etilazione sul nucleo indazolico. E' stata presa in considerazione la formazione di due possibili isomeri 3-(1-etil-1*H*-indazol-3-il)-2-fenilchinazolin-4(3*H*)-one **3a** oppure 3-(2-etil-1*H*-indazol-3-il)-2-fenilchinazolin-4(3*H*)-one **3b**.



Attraverso gli studi cristallografici effettuati è stata dimostrata la presenza del gruppo etilico sull’N(1) del nucleo indazolico. (FIGURA)



FIGURA

Inoltre, si è trovato che utilizzando come ortoestere il trimetilortobenzoato, la suddetta reazione ha portato alla *N*-metilazione del nucleo indazolico.

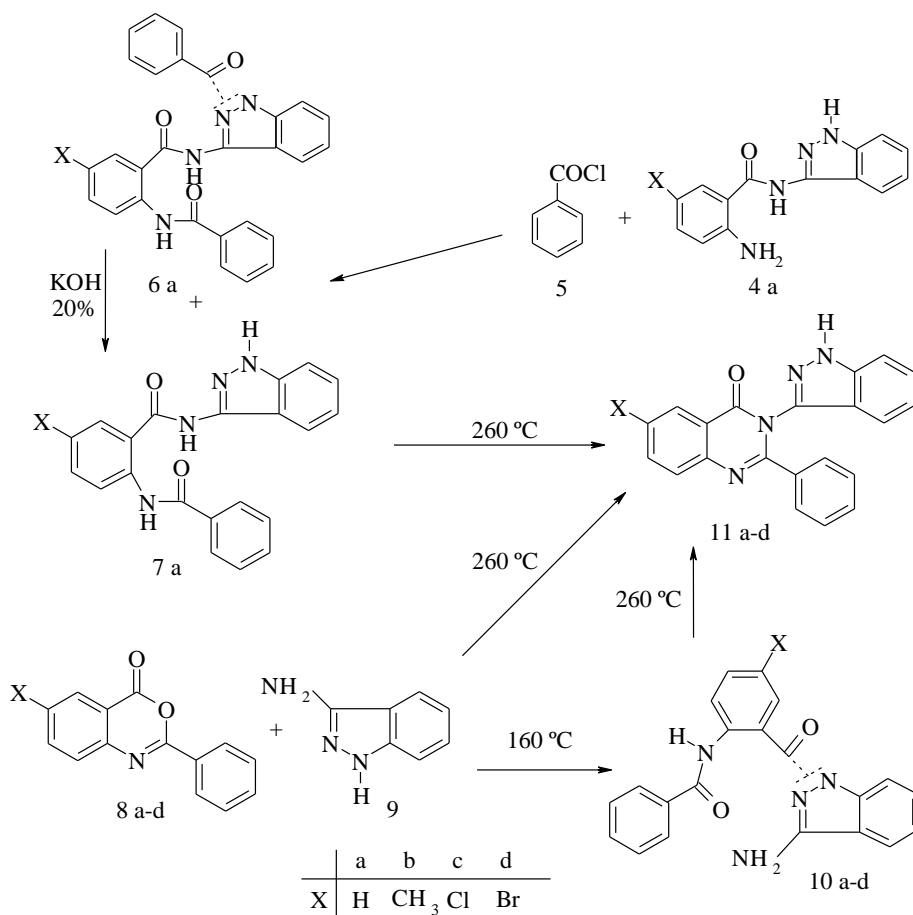
E' riportata in letteratura la capacità alchilante degli orto esteri: e nostri risultati rappresentano il primo esempio di metilazione/etilazione nella serie

indazolica, evidenziando che la metilazione/etilazione del nucleo indazolico è profondamente influenzata dal tipo di ortoestere usato nella reazione. Infatti, questo fenomeno è stato osservato soltanto con i trietil ortobenzoati. La ragione di ciò potrebbe essere attribuita al più elevato punto di ebollizione degli ortobenzoati rispetto agli altri orto-esteri usati (TABELLA).

TABELLA: Punti di ebollizione (°C) di alcuni ortoesteri	
Trietil orto formiato	143°C
Trietil orto acetato	142°C
Trietil ortopropionato	155-160°C
Trieti ortobenzoato	239-241°C
Trimetil ortobenzoato	224°C

Per verificare quanto detto la reazione tra 3-(2-aminobenzamido)indazolo e trietilortobenzoato è stata condotta a 160°C per 5 ore: si è ottenuto, infatti il desiderato 3-(1*H*-indazol-3-il)-2-fenilchinazolinone **11a**, in miscela con il prodotto di partenza, invece del derivato *N*-etilato **3**(schema 1).

I prodotti **11a-d** sono stati ottenuti attraverso le tre vie sintetiche riportate nello schema 2.



SCHEMA 2

Infatti:

- Per azione del cloruro di benzoile **5** sul composto **4a** si ottengono i prodotti **6a** e **7a** in miscela; trattando questa miscela con una soluzione di KOH al 20% si ottiene come unico prodotto il composto **7a** che per fusione a 260°C per 15 minuti si trasforma nel derivato 2-fenil-3-[indazol-3-il]-4(3H)-chinazolinonico **11a**.
- per fusione dei 6-X-2-fenil-benzossazinoni **8a-d** in miscela con il 3-aminoindazolo **9** a 260°C per 15 minuti si ottengono prodotti **11a-d**.

- mantenendo la temperatura di fusione della miscela dei composti **8a-d** e **9** a 160°C si ottengono i prodotti **10a-d** che, fusi successivamente alla temperatura di 260°C si trasformano nei 2-fenil-3-[indazol-3-il]-4(3H)-chinazolinoni **11a-d**. Un riarrangiamento simile era stato già riportato in una serie pirazolica [23].

I nuovi prodotti ottenuti hanno presentato dati analitici e spettroscopici coerenti con le strutture assegnate (vedi parte sperimentale).

BIOLOGIA

I composti **10a-d** e **11a-d** saggiati su *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ed *Entero. fecalis* alla concentrazione 50µg/ml non hanno mostrato attività significativa.

Invece, gli studi farmacologici relativi all'attività antiproliferativa *in vitro* hanno mostrato che il composto **11a** possiede una inibizione del 52.3% della crescita cellulare alla concentrazione di 100µM contro le cellule del cancro al colon (**HT29**) e una tossicità nulla in cellule di colture primarie (**NIH3T3**). (TABELLA 1)

Composti	% inibizione			
	K562 [10µM]	HT29 [100µM]	NCIH460 [100µM]	NIH3T3 [100µM]
10 a	N.S.	25.0	19.5	0.0
10 b	20.0	8.4	13.1	0.7
10 c	13.3	12.9	8.5	0.0
10 d	13.3	34.2	5.1	10.0
11 a	N.S.	52.3	41.7	0.0
11 b	10.0	18.2	7.7	24.0
11 c	12.6	41.6	8.1	8.8
11 d	3.0	18.2	11.1	11.2

TABELLA 1

I test sulla selettività COX1/COX2, riportati in tabella 2, mostrano che i composti **11a-d** e **10a-d** sono dotati di attività inibitoria sugli isoenzimi della ciclossigenasi COX1 e COX2. In particolare i derivati **11a** e **10b-d** sembrano inibire leggermente la COX-1, mentre i derivati **11b-d** e **10a** possiedono una moderata selettività per la COX2.

Tabella 2. Test *In vitro* sull'attività inibitoria della Cicloossigenasi-1 (COX-1) e della Cicloossigenasi-2 (COX-2).

Composti	% di inibizione		Indice di selettività (SI = COX-1/COX-2)
	IC50 [µM]		
	COX-1	COX-2	
11a	89.3	102.0	0.87
11b	127.1	35.4	3.59
11c	88.5	34.7	2.55
11d	69.7	66.4	1.05
10a	80.0	72.7	1.10
10b	Ns	113.0	0.079
10c	43.8	114.3	0.38
10d	132.2	208.0	0.64
NS398 [0.2 µM]	14.1	73.2	0.19

I risultati sono espressi come media (n =3) della % di inibizione della produzione di PGH₂ da parte dei composti testati rispetto ai composti controllo. Indice di selettività *in vitro* COX-2 (IC₅₀Cox-1 /IC₅₀ Cox-2).

PARTE SPERIMENTALE

Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio di Büchi 350 e non sono corretti. Gli spettri I.R. sono stati eseguiti in nujol e in Kbr con uno spettrofotometro Jasco IR-810. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AC-300 MHz (TMS come standard interno). Le analisi elementari C,H,N sono state eseguite dalla REDOX snc e i valori sono in accordo (± 0.4 con quelli teorici).

Sintesi del composto 7a: 8 mmoli di cloruro di benzoile vengono aggiunte lentamente a una soluzione del composto **4a** (10mmoli) sciolto in 10 ml di piridina, mantenendo la temperatura sotto 10°C e lasciata ad agitare per 24 ore. La sospensione ottenuta viene versata in ghiaccio, si filtra e sottoposta ad agitazione in KOH 20% per 24 ore. La sospensione ottenuta si filtra e il solido ottenuto viene cristallizzato da etanolo.

Per fusione di **7a** a 260°C per 15 minuti si ottiene il composto **11a**.

7a: RESA 50%; p.f. 260°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3272 (NH, NH_2 picco allargato), 1647 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 6.57 (2H, s, NH_2 scambiabile con D_2O); 7.18-8.74 (13H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_4); 11.18 (1H, s, NH scambiabile con D_2O) 12.21 (1H, s, NH scambiabile con D_2O) 13.01 (1H, s, NH indazolico scambiabile con D_2O).

11a: RESA 61%; p.f. 226°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3304 (NH), 1676 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 7.12-8.25 (13H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_4); 13.19 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

Sintesi dei composti 10a-d:

Quantità equimolari di 2-fenil-benzossazinoni, opportunamente sostituiti, e di 3-aminoindazolo dopo essere state mescolate in modo da ottenere una polvere omogenea, vengono poste in un provettone e portate alla temperatura di 160°C per 15 minuti. Il solido ottenuto viene cristallizzato da etanolo.

10a: RESA 37%; p.f. 167°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3456-3213 (NH, NH_2), 1672 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 6.57 (2H, s, NH_2 scambiabile con D_2O); 7.30-8.34 (13H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_4); 10.37 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

10b: RESA 10%; p.f. 110°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3453-3289 (NH, NH_2), 1678 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 2.35 (3H, s, CH_3); 6.59 (2H, s, NH_2 scambiabile con D_2O); 7.34-8.30 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 10.25 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

10c: RESA 30%; p.f. 203°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3468-3221 (NH, NH_2), 1670 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 6.61 (2H, s, NH_2 scambiabile con D_2O); 7.36-8.30 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 10.41 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

10d: RESA 25%; p.f. 200 (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3427-3218 (NH, NH_2), 1637 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO-d_6 : 6.64 (2H, s, NH_2 scambiabile con D_2O); 7.39-8.32 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 10.44 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

Sintesi dei composti 11a-d:

1) quantità equimolari di 2-fenil-benzossazinoni, opportunamente sostituiti, e di 3-aminoindazolo dopo essere state mescolate il modo da ottenere una polvere omogenea, vengono poste in un provettone e portate alla temperatura di 260°C per 15 minuti. Il

solido ottenuto viene sciolto e cristallizzato da etanolo.

2) I composti **10 a-d** posti in un provettone vengono portati alla temperatura di 260°C per 15 minuti. Il solido ottenuto viene sciolto e cristallizzato da etanolo.

11b: RESA 26%; p.f. 265°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3366 (NH), 1693 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO- d_6 : 2.50 (3H, s, CH_3); 7.11-8.06 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 13.16 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

11c: RESA 33%; p.f. 260°C (etanolo)

I.R. cm^{-1} : 3303 (NH), 1687 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO- d_6 : 7.12-8.17 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 13.21 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

11d Resa 50%, p.f. 260°C (etanolo).

I.R. cm^{-1} : 3304 (NH), 1688 (CO).

$^1\text{H-NMR}$ (δ) DMSO- d_6 : 7.12-8.30 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 , C_6H_3); 13.20 (1H, s, NH scambiabile con D_2O).

Biologia

Materiali:

la linea cellulare K562 di leucemia umana è stata fornita dall'Ospedale Policlinico di Palermo. Le linee cellulari NCI-H460 (tumore solido al polmone), e HT29 (tumore al colon retto) sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia.

Metodi:

Colture cellulari

- Le cellule K562 sono state cresciute in fiasche da 75cm² con terreno RPM11640 supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomicina - ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.
- Le cellule NCI-H460, HT-29 e NIH₃T₃(coltura primaria di fibroblasti di topo) sono state cresciute su monostrato in fiasche da 75cm² con terreno Minimum Essential Medium-Eagle (MEM) supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomicina-ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.
- Le sostanze sintetizzate da saggiare sono state disciolte in DMSO per avere una concentrazione finale 10mM.

Ceppi microbici

- gram negativi: *E.coli* ATCC25922, *P.aeruginosa* ATCC9027
- gram positivi: *S.aureus* ATCC29213, *Enterofecalis* ATCC29212
- I ceppi sono cresciuti in Muller Hinton medium
- Le sostanze sintetizzate da saggiare sono state disciolte in DMSO per avere una concentrazione finale 5mg/ml.

Saggi di proliferazione cellulare

- Le cellule K562 sono state cresciute in micropiastre da 24 pozzetti aggiungendo 1ml di terreno completo contenente 2×10^5 cellule in assenza e in presenza di inibitori. Gli effetti delle sostanze sulla crescita e vitalità delle cellule sono saggiati su una porzione della sospensione cellulare (100µl). Il numero delle cellule è stato determinato con un emocitometro (camera di Bürker) e la vitalità è stata stimata mediante esclusione del trypan blu.
- I saggi sulla proliferazione delle cellule NCI-H460, HT-29 e e NIH₃T₃ invece, sono stati condotti su piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C ad una concentrazione 2×10^4 cell/pozzetto (in 100µl). Dopo 2 giorni il terreno

viene sostituito da MEM privo di rosso fenolo (che potrebbe alterare la lettura dello spettrofotometro) e vengono aggiunti i presunti inibitori (alla concentrazione $10\mu\text{M}$ o $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dopo 48h di incubazione a 37°C si aggiunge l'MTT ($5\text{mg}/\text{ml}$) a ciascun pozzetto; 4h dopo il formazano prodotto dalle cellule vive viene risospeso in una soluzione di isopropanolo, tritonX-100, HCl 37% ($4,5\text{ml}$ - $0,5\text{ml}$ - $150\mu\text{l}$ rispettivamente); la densità ottica ($\text{OD}_{570-690}$) viene quindi paragonata ai pozzetti controllo per saggiare la vitalità cellulare.

Determinazione della MIC

- dal momento che le sostanze saggiate sono insolubili nel brodo di coltura dei ceppi batterici da analizzare, la MIC (concentrazione minima inibente) è stata calcolata come segue:

1. si incuba per 24h il ceppo batterico in una provetta con agar; si preparano le piastre con 20ml di muller Hinton agar e la sostanza da saggiare alla concentrazione desiderata
2. $125\mu\text{l}$ della sospensione batterica sono inoculati in 25ml di TSB al 2% di glucosio; si calcola la densità ottica a 570nm che deve essere intorno a 0.170. Quindi 0.25ml di sospensione vengono diluiti in 5ml finali di NaCl.
3. $0.1\mu\text{l}$ di tale diluizione sono strisciati sulle piastre già preparate. Dopo aver incubato o.n. si

osservano i risultati: la MIC è la concentrazione minima alla quale si osserva crescita batterica.

CONCLUSIONI:

La reazione del 3-(2-aminobenzamido)indazolo con trimetil/etil ortobenzoato porta alla formazione di 3-(1-metil/etil-1H-indazol-3-il)-2-fenil chinazolin-4(3H)-oni. La *N*-metilazione/etilazione del nucleo indazolico, rappresenta il primo esempio di alchilazione con orto formiato in serie indazolica. Il più alto punto di ebollizione dei trimetil/etilortobenzoati rispetto agli altri orto esteri usati spiega l'alchilazione del nucleo pentatomico azotato. La corretta posizione dell' *N*-alchilazione è stata chiarita attraverso l'analisi ai raggi-X del derivato 3-(2-etil-1H-indazol-3-il)-2-fenilchinazolin-4(3H)-one **3**.

I composti 2-fenil-3(indazol-3-il)-chinazolin-4(3H)-oni **11a-d** e *N*-(2-(3-amino-1H-indazolo-1-carbonil)fenil)benzamidi **10a-d** presentano una scarsa o moderata attività antiproliferativa sulle linee cellulari K-562 (human chronic myelogenous leukemia), HT29 (colon cancer cells), NCI-460 (human large cell lung cancer cells). I test in vitro dimostrano che sono dotati di attività inibitoria sulle COX1 e COX2.

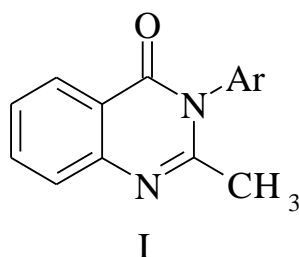
CAPITOLO II

STUDIO DEI PROCESSI DI FRAMMENTAZIONE INDOTTE Ionizzazione Elettronica di derivati 3- isossazolo-2-stirilchinazolin-4(3H)- oni.

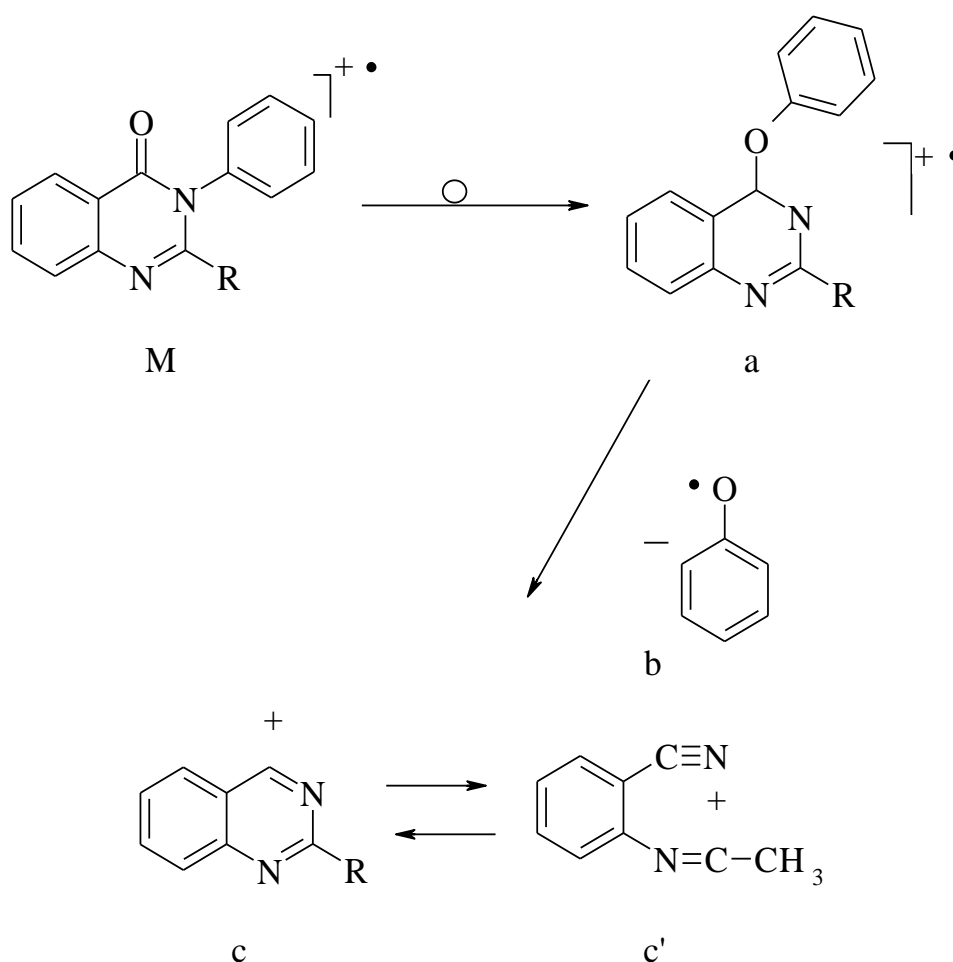
Alcuni isomeri 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]-chinazolin-4(3H)-oni e 3[3'-(5'-Metil)-isossazolil]-chinazolin-4(3H)-oni, ad attività antinfiammatoria, sintetizzati nei nostri laboratori erano facilmente distinguibili attraverso lo studio degli spettri di frammentazione di massa.

Si è potuto verificare che analoghi 3[3'-(5'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3H)-onica e 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3H)-onica presentano un comportamento alla frammentazione di massa con Ionizzazione Elettronica che permette la distinzione tra queste altre due serie isomeriche.

Negli studi di MS effettuati su 3-aril-chinazolin-4(3H)-oni I



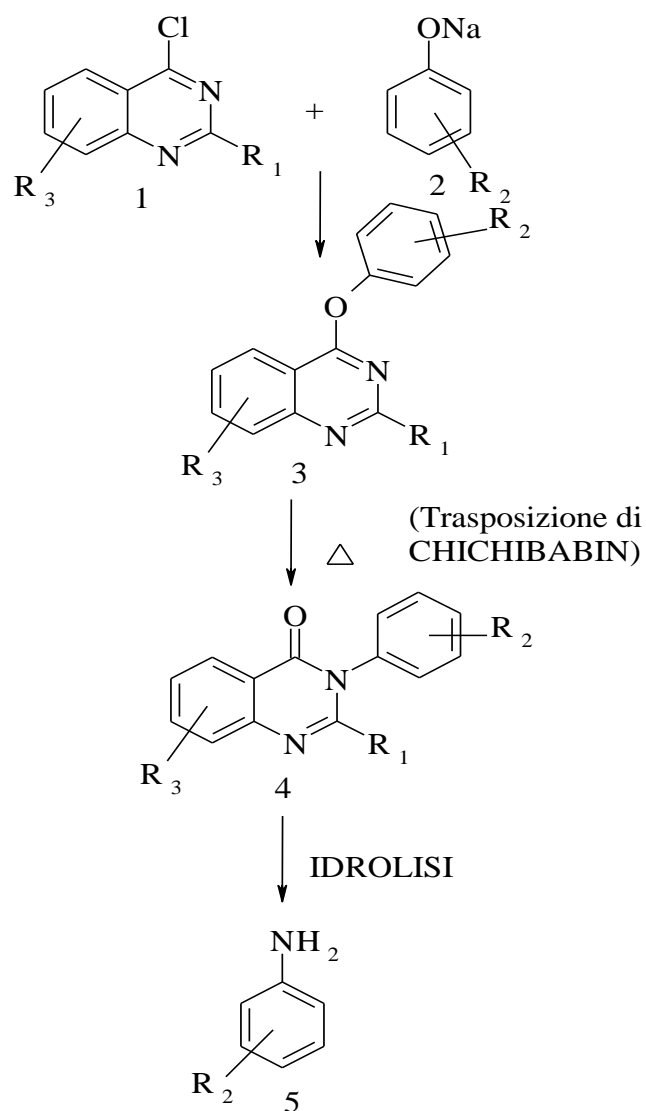
è stato dimostrato un particolare riarrangiamento che consiste in una trasposizione del gruppo arilico dall'N(3) all'O del C(4) con successiva perdita del radicale fenossilico **b** dallo ione molecolare (schema 1) con formazione dello ione c/c'. [26-27].



SCHEMA 1

Questa è stata chiamata reazione retro-Chichibabin dal riarrangiamento termico descritto dallo stesso autore che come si evince dallo schema 2 permette

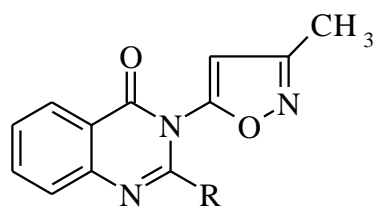
la formazione di 3-aryl-chinazolin-4(3*H*)-oni dalle 4-aryllossichinazoline e può essere anche usata come conversione del fenolo in anilina.[28].



SCHEMA 2

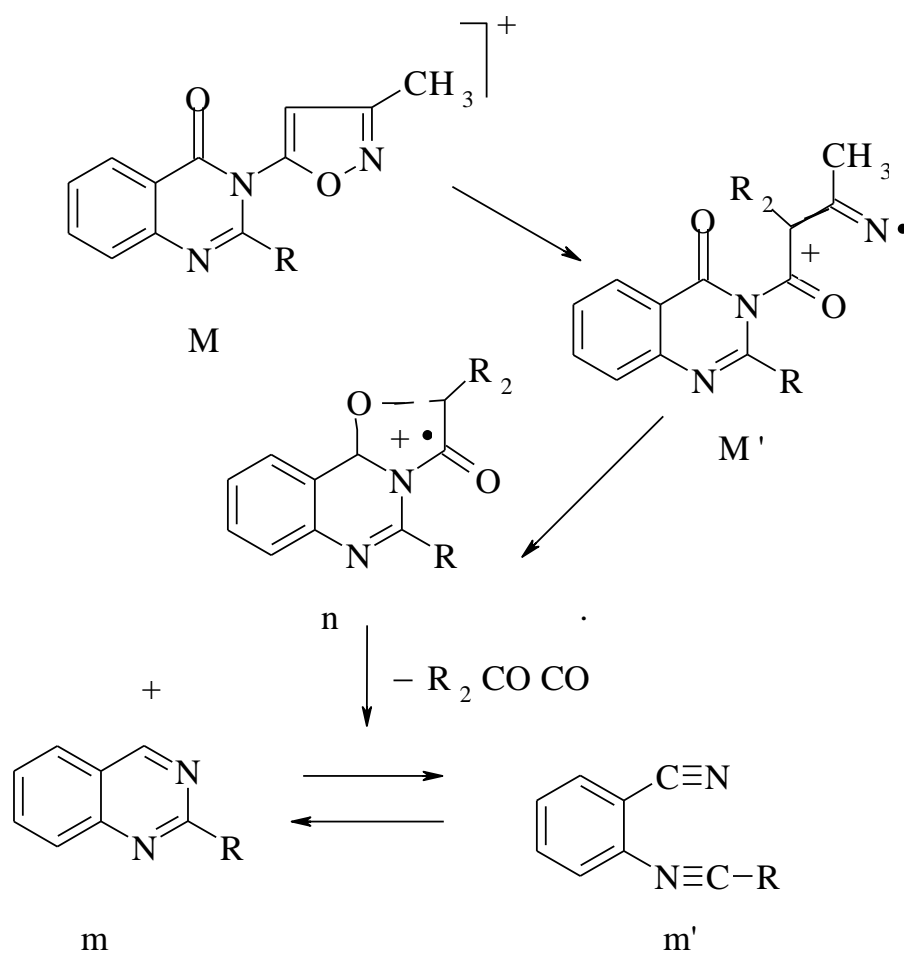
Inserendo in posizione 3 un isossazolo come nel caso dei 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]-chinazolin-4(3*H*)-oni

II



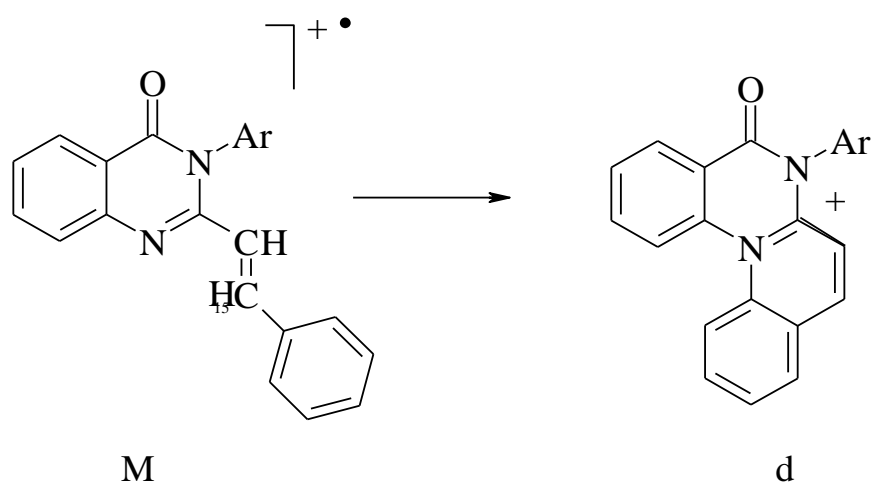
II

si registra una inusuale apertura dell'anello isossazolico, che con la partecipazione dell'O in C(4) [29] (schema 3), genera lo ione **n** che, attraverso l'identificazione di un appropriato metastabile, è stato indicato come il precursore degli ioni **m** ed **m'**.



SCHEMA 3

Studi di spettrometria di massa sulla serie 3-aryl-2-stiril-chinazolin-4(3H)-onica hanno evidenziato un picco base che indica la perdita di un H dallo ione molecolare, attribuibile allo ione **d** ottenuto per ciclizzazione coinvolgente l' N(1) e l'H in orto al gruppo etilenico dello stirile (schema 4) [30].

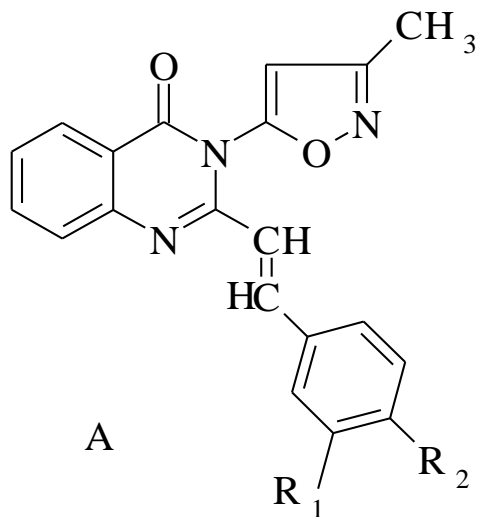


SCHEMA 4

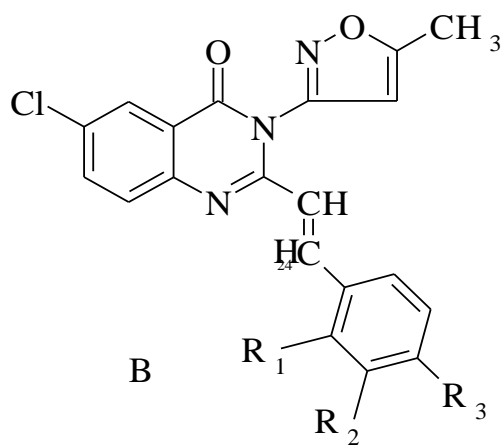
La struttura **d** rappresenta la più probabile in quanto stabilizzata per risonanza rispetto alle altre possibili strutture.

Durante il periodo di dottorato sono state effettuate le analisi di massa e sono state studiate le frammentazioni dei composti **A(1-2)** con struttura 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3H)-

onica e **B(1-7)** con struttura 3[3'-(5'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3H)-onica.



	R ₁	R ₂
A1	H	Cl
A2	NO ₂	H



	R ₁	R ₂	R ₃
B1	OCH ₃	H	H
B2	H	OCH ₃	H
B3	OCH ₃	H	OCH ₃
B4	OCH ₃	OCH ₃	H
B5	H	OCH ₃	OCH ₃
B6	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
B7	H	H	Cl

STUDIO DEGLI SPETTRI DI MASSA DEI COMPOSTI

A

Come descritto in letteratura [26], e come citato precedentemente, i derivati 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]4(3H)-chinazolin-4-onici presentano una particolare frammentazione dell'anello isossazolico (schema 3), comportamento da noi accertato anche in presenza del gruppo stirilico in posizione 2.

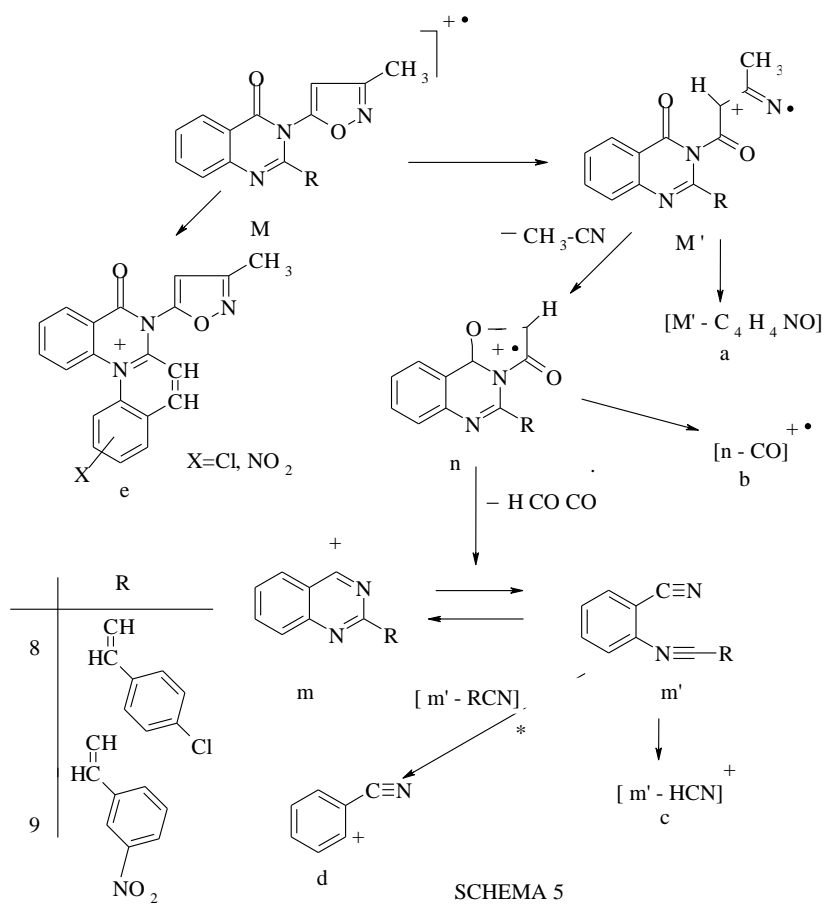
In presenza di tale gruppo si evince anche la presenza di un picco M-1 probabilmente dovuto alla ciclizzazione riportata nello schema 4.

Nella tabella 1 vengono riportati i valori di massa/carica (m/z) con le abbondanze relative delle frammentazioni comuni ai composti A1 e A2.

Le lettere a,b,c,d,e sono riferite alle frammentazioni riportate nello schema 5.

	M(M')	n	m(m')	a	b	c	d	e
A1	363	322 (23)	265 (26)	281 (79)	294 (30)	238 (10)	102 (29)	362 (8.7)
A2	374	333 (21)	276 (44)	292 (13)	305 (23)	----	102 (24)	373 (4,3)

TABELLA 1: valori di m/z e abbondanze relative riferite al picco base (in parentesi).



Queste frammentazioni sono state confermate con studi in alta risoluzione (HR). I valori sono riportati in tabella 2.

	valore teorico	valore calcolato	differenza in ppm
M(M)	363,0775	363,0766	2,5
n	322,0509	322,0475	10
m(m')	265,0533	265,0507	9,8
a	281,5448	281,5418	10,6
b	294,0560	294,0514	15,6
c	238,0424	238,0417	2,9

TABELLA 2

STUDIO DELLE FRAMMENTAZIONI DEI COMPOSTI

B

I composti della serie 3[3'-(5'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3*H*)-onica non sono mai stati studiati in spettrometria di massa.

Verranno trattate inizialmente le perdite comuni a tutti i composti e successivamente le perdite caratteristiche di ognuno di essi.

Precedentemente per tutti i 3[5'-(3'-Metil)-isossazolil]-chinazolin-4(3*H*)-oni è stata notata l'apertura dell'anello isossazolico per rottura del legame N-O e successiva perdita di CH₃CN (41) (**a**); nel caso dei 3[3'-(5'-Metil)-isossazolil]-2-stirilchinazolin-4(3*H*)-oni si ipotizza la stessa apertura ma questa volta con la perdita di CH₃CO (43) comune a tutti i derivati.

La perdita del sostituente R₁, già citata precedentemente (schema 4) come perdita di H, si presenta anche in questi composti; tuttavia come si evince dalle abbondanze relative del picco [M-R₁] (**c**) si ha un "effetto orto" molto accentuato quando R₁=OCH₃.

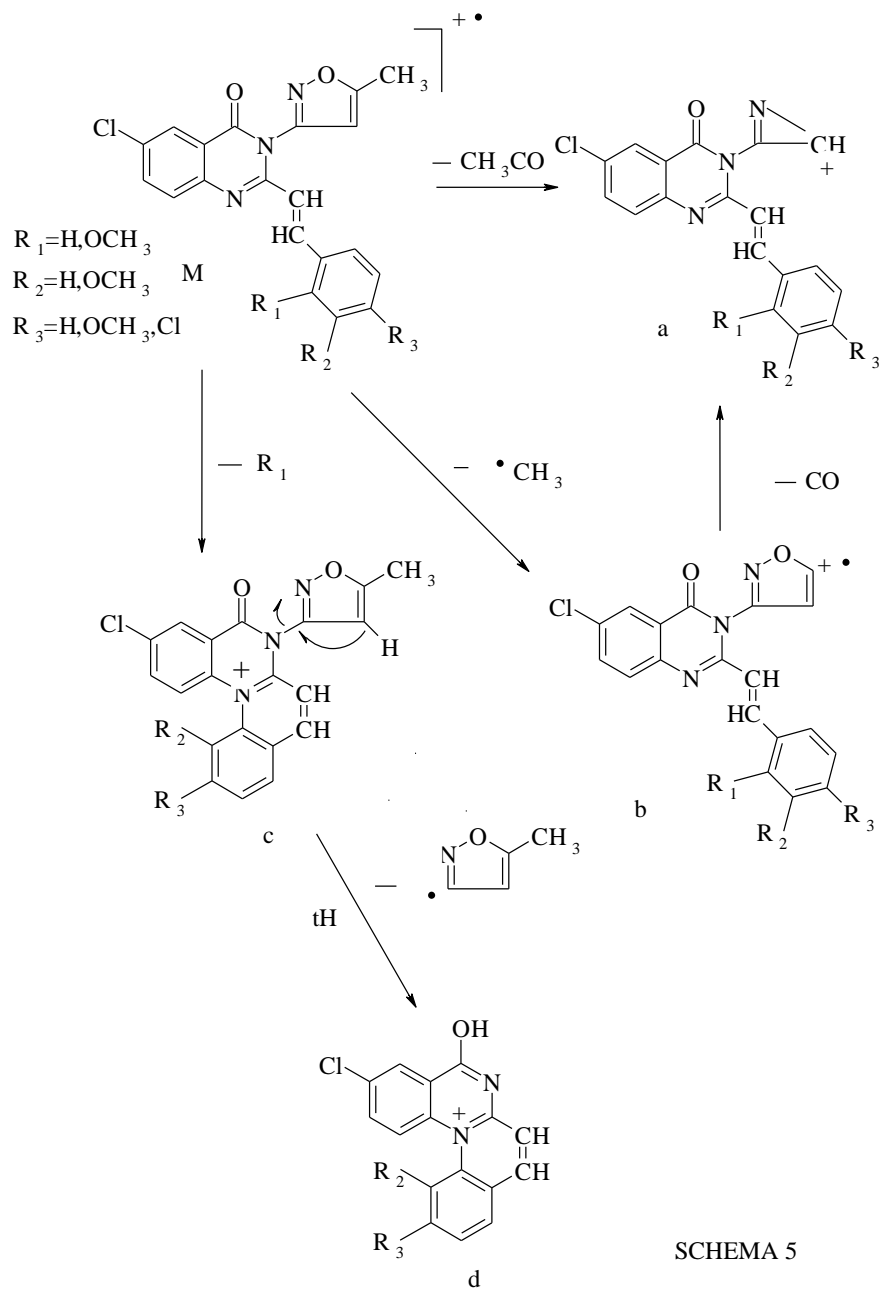
Successivamente a questa ciclizzazione si ipotizza la perdita dell'anello isossazolico con trasposizione di idrogeno sull'ossigeno che porta alla formazione della struttura **d**.

Nella tabella 3 vengono riportati i valori di m/z con le abbondanze relative delle perdite comuni ai composti B(3-9).

Le lettere a, b,c e d sono riferite alle frammentazioni riportate nello schema 5.

	M	a	b	c	d
B3	393	350 (78)	378 (23)	362 (97)	281 (34)
B4	393	350 (71)	378 (31)	392 (8.6)	311 (20)
B5	423	380 (56)	408 (28)	392 (31)	311 (21)
B6	423	380 (28)	408 (8)	392 (100)	311 (16)
B7	423	380 (54)	408 (24)	392 (2.8)	341 (10)
B8	453	410 (33)	438 (16)	422 (53)	341 (30)
B9	397	354 (85)	382 (48)	396 (4.3)	315 (17)

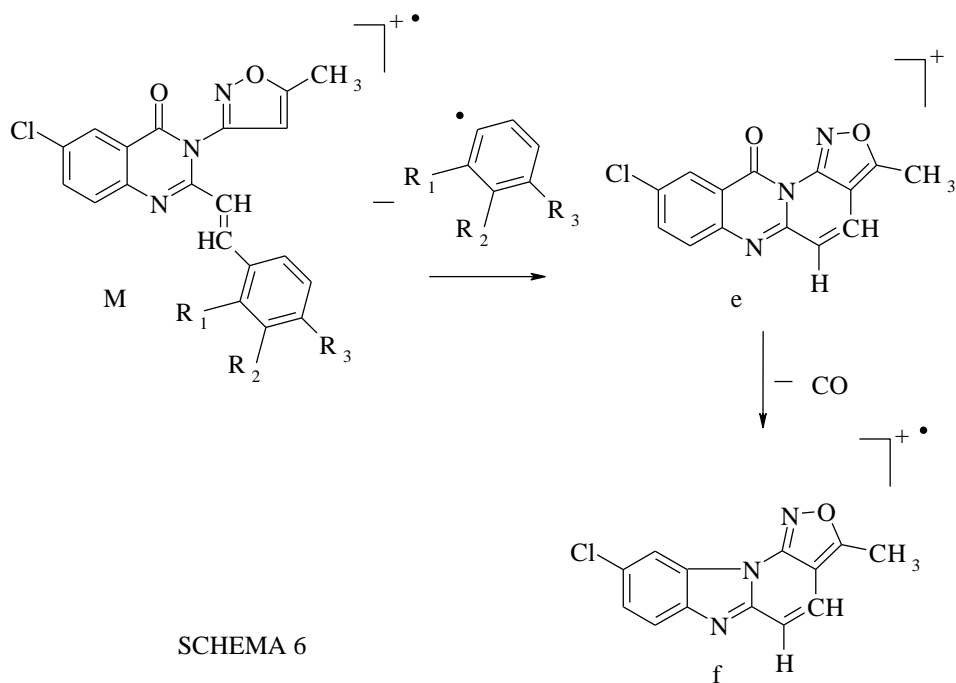
TABELLA 3



Un picco comune a tutti i composti B è quello a m/z 257 di cui è stata ipotizzata la struttura policiclica f con estesa coniugazione e quindi molto stabile (schema 6).

La perdita dell'anello benzenico dal sostituente stilirico viene confermato dal pattern isotopico dello

ione m/z 257, che indica la presenza di un solo atomo di cloro anche per il composto B7.



	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
m/z							
257	33	44	38	14	36	38	82

TABELLA 4: abbondanze del picco a m/z 257 relative al picco base.

Gli studi preliminari sono stati presentati alla GSK (Verona)-5th MS-Pharmaday 2008.[31]

PARTE SPERIMENTALE

Studi MS

Le analisi dei campioni sono state eseguite con uno spettrometro di massa Autospec-o-TOF (Micromass). Il campione in quantità circa di 10^{-9} g è stato inserito in un capillare di quarzo, quest'ultimo è stato alloggiato nel probe per l'introduzione diretta.

In seguito all'omogeneizzazione del vuoto, tramite apposite valvole, il probe è stato introdotto nella sorgente. La temperatura del probe è stata gradualmente aumentata fino alla temperatura di 200 °C.

Gli spettri a bassa risoluzione riportati sono la media di cinquanta acquisizioni.

Le condizioni utilizzate per la registrazione degli spettri di massa sono le seguenti :

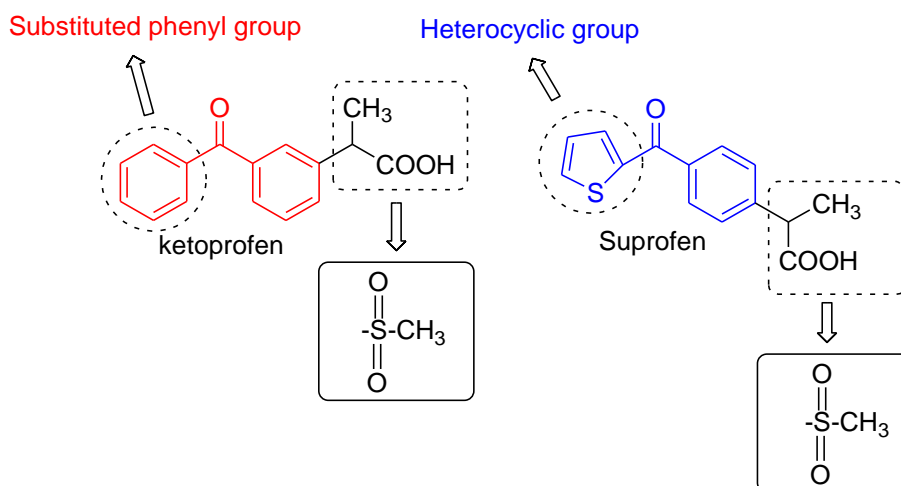
- metodo di ionizzazione: Ionizzazione Elettronica;
- temperatura della sorgente: 220 °C;
- energia del fascio di elettroni ionizzanti: 70 eV;
- corrente di emissione: 2,32 μ A;
- corrente nella trappola: 500 μ A;
- pressione in sorgente: 10^{-7} Torr;
- pressione nell'analizzatore: 10^{-8} Torr;

- voltaggio di accelerazione: 8 kV;
- potere risolutivo: 1.300 (Spettri a bassa risoluzione);
- potere risolutivo: 5.000 (Spettri ad alta risoluzione);
- intervallo di masse analizzato: 40-500 m/z.

CAPITOLO III

SINTESI e ATTIVITA' BIOLOGICA DI NUOVI 4-(Arioloil)fenil Metil Solfoni.

Durante il mio soggiorno all'estero, presso i laboratori del Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università di Barcellona, con la guida della Prof.ssa Maria Dolors Pujol, ho intrapreso uno studio relativo alla progettazione e alla sintesi di farmaci correlati con il Ketoprofene ed il Suprofen, farmaci antinfiammatori non steroidei, non dotati di selettività COX-1/COX-2 e largamente utilizzati nella pratica clinica.



Ai due composti LEAD sono state apportate le seguenti modifiche:

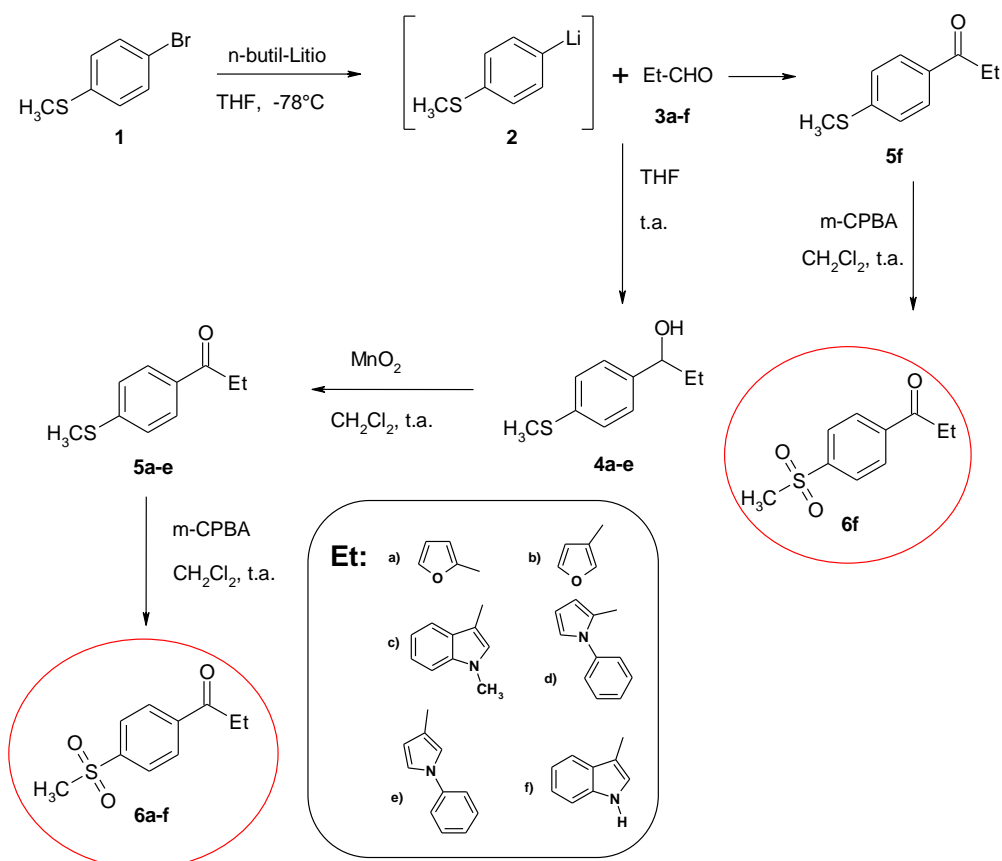
- Sostituzione del gruppo acido propionico con un gruppo metilsolfonico più lipofilo.

- Sostituzione bioisosterica dell'anello benzenico e tiofenico del ketoprofene e del surprofene con differenti sistemi eterocicli ed arilici.

Le modifiche sono state scelte per valutare se le sostituzioni giuochino un ruolo nella auspicabile selettività per le isoforme della COX: inoltre, tenuto conto che diversi studi epidemiologici [32] hanno evidenziato che FANS selettivi verso la COX-2 sono in grado di funzionare come chemiopreventivi in alcune patologie cancerose, i composti sintetizzati sono stati saggiati anche come inibitori della proliferazione cellulare.

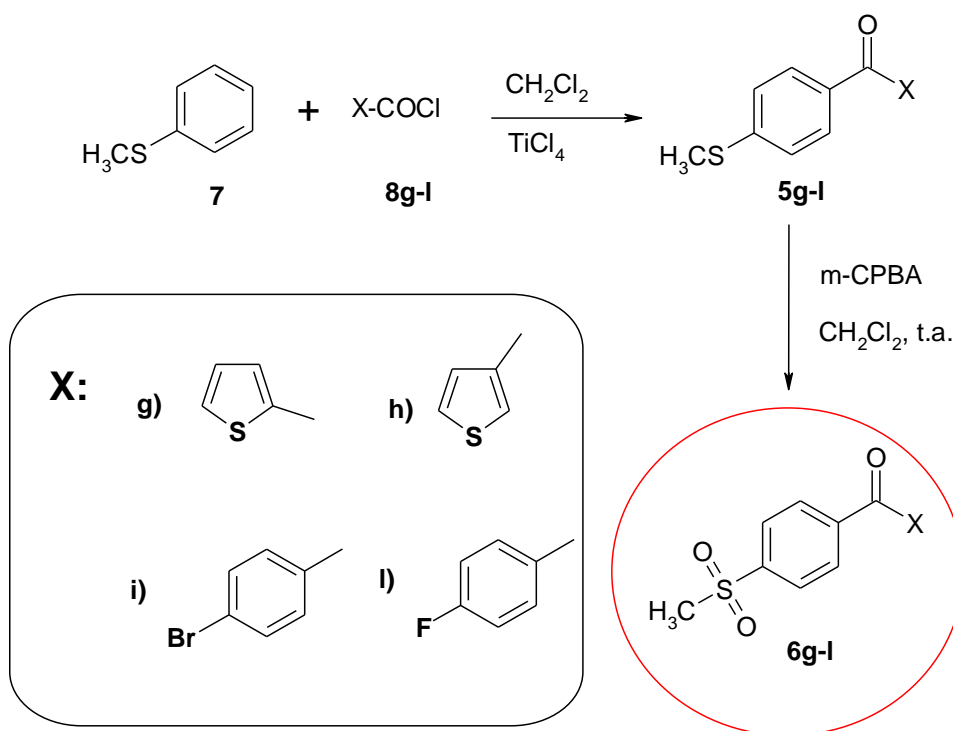
CHIMICA

I derivati metilsolfonici **6a-f** sono stati ottenuti in accordo con quanto riportato nello schema 1. In particolare, facendo reagire il Bromotioanisolo **1** con il *n*-Butil-Litio alla temperatura di -78°C in atmosfera di argon [33] si ottiene un prodotto non isolabile, perchè estremamente instabile, a struttura verosimile di tipo **2**, il quale, per aggiunta dell' opportuna aldeide **3a-f**, dopo 8h di agitazione a temperatura ambiente, porta ai desiderati Etero-aril-alcoli **4a-e** isolati per separazione cromatografica. Nel caso del derivato **4f**, la reazione di ossidazione avviene spontaneamente all'aria per cui dalla miscela di reazione si isola direttamente il chetone **5f**. In tutti gli altri casi, gli Etero-aril-chetoni **5a-e** sono ottenuti trattando i corrispondenti alcoli **4a-e** con MnO_2 a temperatura ambiente.



SCHEMA 1

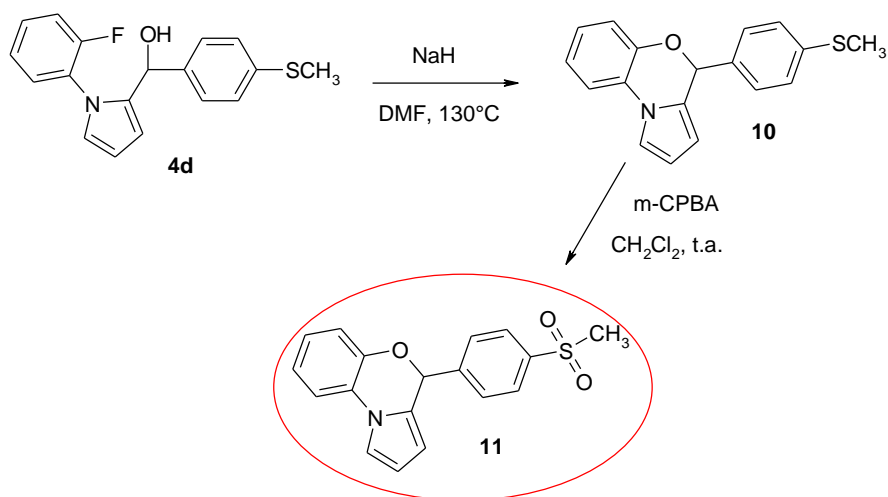
I derivati **5g-l** sono stati ottenuti seguendo una differente strategia sintetica in cui il gruppo chetonico viene direttamente introdotto nella molecola attraverso una reazione di Friedel-Kraft modificata [34]. Infatti, per trattamento del Tioanisolo **7** con il cloruro acido **8g-l**, in presenza di Tricloruro di Titanio, si ottengono i derivati Etero-aril-chetonici **5g-h** e Diaril-chetonici **5i-l** desiderati. (SCHEMA 2)



SCHEMA 2

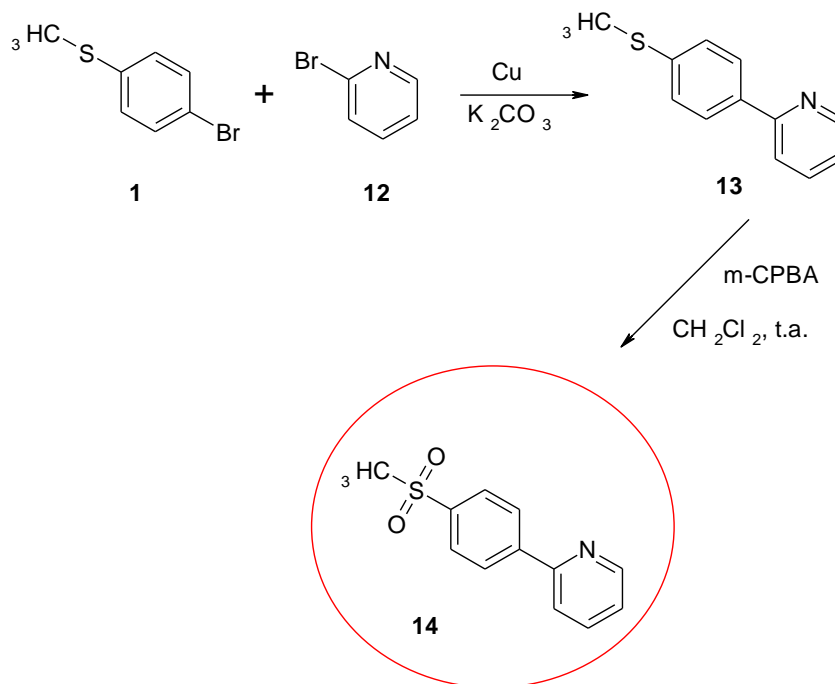
Infine i derivati **5a-l** sono stati trasformati nei corrispondenti solfoni **6a-l** utilizzando l'acido 3-cloroperossibenzoico (*m*-CPBA) come agente ossidante [35] a temperatura ambiente in diclorometano. (SCHEMI 1 e 2)

La 4-[4-(metilsulfonil)fenil]-4H-benzo[b]pirrolo[1,2-d][1,4]oxazina **11** è stata ottenuta attraverso una via sintetica in due step che prevede la ciclizzazione intramolecolare del composto **4d** con formazione della 4-[4-(metiltio)fenil]-4H-benzo[b]pirrolo[1,2-d][1,4]oxazina **10**, seguite dall'ossidazione di quest'ultimo con *m*-CPBA. (SCHEMA 3)



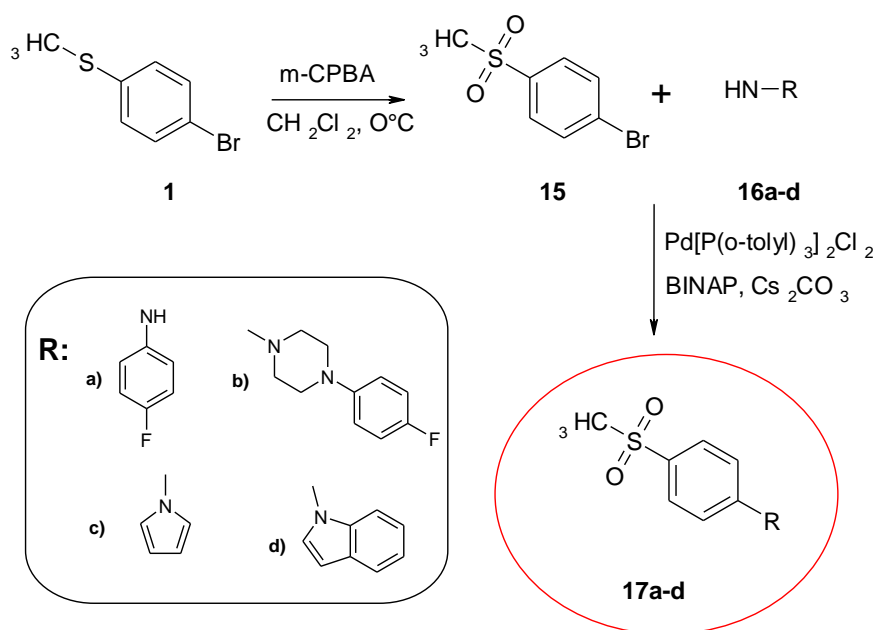
SCHEMA 3

La 2-arilpiridina **14** è stata ottenuta attraverso una reazione di coupling tra la 2-bromopiridina **12** e il *p*-bromotioanisolo **1** nelle condizioni della reazione di Ullman [36] seguita da ossidazione del gruppo metiltio con *m*.CPBA. (SCHEMA 4).



SCHEMA 4

Per la sintesi dei composti **17a-d** abbiamo usato una sintesi di *N*-arilamine utilizzando come catalizzatore il Pd come riportato in letteratura [37]. Il gruppo metilsolfonico del composto **15** è stato ottenuto nel primo step della reazione ossidando con *m*-CPBA il *p*-bromotioanisolo **1**. (SCHEMA 5)



SCHEMA 5

BIOLOGIA

I composti **6a-l**, **11**, **14** e **17a-d** sono stati saggiati per di valutarne l'attività antiinfiammatoria utilizzando il test dell'edema su zampa di ratto indotta da carragenina alla concentrazione screening di 70 mg/Kg, utilizzando l'ibuprofene come farmaco di riferimento.

La tabella 1, mostra che tra tutti i derivati solfonici saggiati, il composto **6g** è risultato il più attivo con una riduzione dell'edema indotta da carragenina pari a 59.7% e 56.0% dopo 3 h e 4 h rispettivamente. Il confronto tra i valori inibizione del composto **6g** e quelli dell'ibuprofene evidenzia che il composto in esame è circa 2.4 volte più attivo del farmaco di riferimento.

Tabella 1. Dati del test *in vivo* sull'attività anti-inflammatoria (Edema indotto da carragenina)

Composti	3 h		4 h	
	Gonfiore % inibizione		Gonfiore % inibizione	
6g	a) 17.5 ± 5.6 *** b) 43.4 ± 6.9	59.7	a) 19.1 ± 5.3*** b) 43.4 ± 8.4	56.0
14	a) 20.1 ± 4.9 *** b) 43.4 ± 6.9	51.4	a) 21.1 ± 5.5*** b) 43.4 ± 8.4	51.4
17d	a) 22.8 ± 4.5 *** b) 43.4 ± 6.9	46.0	a) 24.1 ± 5.1*** b) 43.4 ± 8.4	46.0
6a	a) 28.3 ± 5.6 *** b) 51.9 ± 6.8	45.5	a) 30.0 ± 4.4** b) 48.2 ± 7.7	37.8
17a	a) 31.7 ± 5.6 *** b) 54.5 ± 6.8	41.9	a) 25.2 ± 3.6** b) 38.9 ± 2.3	32.6

6b	a) 37.9±4.8** b) 51.9±6.8	27.0	a) 37.5±5.7* b) 48.2±7.7	22.2
6i	a) 40.5± 5.6** b) 51.9±6.8	22.0	a) 44.3±4.6 b) 48.2±7.7	8.1
6d	a) 32.2±5.1* b) 37.3±3.1	13.7	a) 34.9±5.0 b) 36.5±4.3	4.4
6e	NA		NA	
11	NA		NA	
Ibuprofen	a) 27.1 ± 3.6 *** b) 38.9 ± 6.0	30.3	a) 34.4 ± 6.9 ** b) 45.1 ± 5.0	23.9

a) Gonfiore per la dose di 70 mg/Kg

b) Gonfiore di controllo

NA nessuna attività attribuibile ad una scarsa solubilità in acqua

Valori significativamente diversi dai controlli: *P<0,05; **P<0,01;

***P<0,001; # does not differ significantly according to unpaired one-tailed Student's *t*-test.

I dati rappresentano la media ±S.E.M. di 6 animali (p<0.05). L'edema nella zampa è dopo 3 e 4 ore dalla somministrazione della carragenina.

Tabella 2. Test *In vitro* sull'attività inibitoria della Cicloossigenasi-1 (COX-1) e della Cicloossigenasi-2 (COX-2).

Composti	% di inibizione		
	IC ₅₀ [μM]		Indice di selettività (SI = COX-1/COX-2)
	COX-1	COX-2	
6a	26.7± 2.74	9.4± 0.36	2.8
6b	15.1± 0.94	19.2± 1.80	0.79
6c	150± 11.30	4.1± 1.00	36.6
6d	76.4± 8.50	36.8± 6.60	2.1
6e	183± 15.3	43.3± 5.70	4.20
6f	34.6±1.65	19.7±2.70	1.76
6g	231.2± 3.10	23.1± 3.00	10
6h	143.7± 4.20	15.2± 2.10	9.40
6i	150.0± 4.20	1± 0.15	150
6l	106.5± 4.32	7.7± 0.28	13.8
11	177.3± 4.70	26.5± 1.20	6.70
14	89.6 ± 3.22	1.3± 0.03	68.9
17a	140.7± 1.9	2 ± 0.3	70.3
17b	80 ± 7.50	18.8 ± 2.80	4.20
17c	86 ± 3.50	8.5 ± 1.00	10.10
17d	78.7 ± 3.60	0.3 ± 0.04	262
Ibuprofen	3.2	1.5	2.10

NS398 [0.2 μM]	14.1	73.2	0.19
Celecoxib	6.86	0.10	69
Rofecoxib	23.5	0.78	30.12

I risultati sono espressi come media (n =3) della % di inibizione della produzione di PGH₂ da parte dei composti testati rispetto ai composti controllo. Indice di selettività *in vitro* COX-2 (IC₅₀Cox-1 /IC₅₀ Cox-2).

Gli studi *in vitro* sull'inibizione della ciclossigenasi (tabella 2) mostrano che tutti i composti saggiati sono in grado di inibire ambedue le ciclossigenasi. Per quanto concerne la loro selettività si può affermare che, i composti **6b** e **6f** non presentano alcuna selettività, che i composti **6a**, **6d**, **6e**, **6g**, **6h**, **6l**, **11**, **17b** e **17c** sono inibitori moderati della COX-2 (SI = 2.8, 2.1, 4.2, 10, 9.4, 13.8, 6.7, 4.2, 10.1 rispettivamente) mentre derivati **6c**, **6i**, **14**, **17a**, **17d** sono i migliori inibitori della COX-2 un indice di selettività di 36.6, 150, 68.9, 70.3, 262 rispettivamente.

Risultati dei test sulla proliferazione cellulare [38-41]:

I composti **6a-l**, **11** e **17a-d** sono stati saggiati per la loro attività antiproliferativa sulle seguenti linee cellulari: K562 (leukemia-lymphoma cell line), NCI-H460 (Human non-small lung carcinoma) and HT29 (Human colon cancer cell line).

Il trattamento delle cellule K562 con i composti **6a-l**, **11** e **17a-d** alla concentrazione di 10 μM non ha mostrato effetti significativi sulla proliferazione cellulare (Tabella 3), mentre nel caso delle cellule NCI-460 pur se viene mantenuto il medesimo trend di scarsa attività, per il composto **6e** si

riscontra una diminuzione della vitalità cellulare del 54.8±0.70% (tabella 4) alla concentrazione di 10µM.

Tabella 3. Dati sulla proliferazione cellulare di K562

Compound [10 µM]	% inhibition
6a	8.3 ± 0.50
6b	8.3 ± 1.00
6c	2.1 ± 0.20
6d	2.1 ± 0.02
6e	12.5 ± 1.00
6f	25.1 ± 1.00
6g	1.0 ± 0.10
6h	14.6 ± 2.00
6i	6.2 ± 0.10
6l	6.5 ± 1.00
11	13.5 ± 3.90
17a	13.5 ± 3.90
17b	17.7 ± 2.00
17c	1.00 ± 0.05
17d	16.6 ± 0.90
celecoxib	38.8 ± 2.00
Purvalanol A	75.1 ± 2.30

Proliferazione cellulare di K562 dopo trattamento con 10 µM di **6a-l, 11 e 17a-d**. I valori rappresentano [controllo (DMSO)-trattati] /controllo (DMSO) e sono espressi come valori medi di due separati esperimenti riprodotti in duplice.

Tabella 4. Dati di proliferazione cellulare NCI-H460

Compound	%inhibition to [10 µM]
6a	3.0 ± 0.70
6b	6.0 ± 1.00
6c	7.0 ± 0.01
6d	13.3 ± 0.50
6e	54.8 ± 0.70
6f	5.1 ± 0.04
6g	3.0 ± 0.40
6h	2.0 ± 0.09
6i	12.7 ± 1.90
6l	5.4 ± 0.04
11	6.6 ± 0.08
17a	1.8 ± 0.01
17b	3.1 ± 0.20
17c	3.0 ± 0.30

17d	12.2 ± 1.00
Celecoxib	9.75 ± 1.10
Purvalanol A	3.98 ± 0.10

Proliferazione cellulare di NCI-H460 dopo trattamento con 10 µM di **6a-l**, **11** e **17a-d**. I valori rappresentano [controllo (DMSO)-trattati] /controllo (DMSO) e sono espressi come valori medi di due separati esperimenti riprodotti in quadruplica.

Infine, nel caso della cellule HT-29 i composti **6a-l**, **11** e **17a-d** non hanno mostrato effetti significativi sulla proliferazione cellulare con la sola esclusione del composto **6d** che ha mostrato una IC₅₀ di 34 µM.

Tabella 5. Data of HT-29 cell viability

Compound	IC₅₀ (µM)
6a	383.0 ± 6.40
6b	104.0 ± 1.60
6c	70.4 ± 0.50
6d	34.1 ± 2.10
6e	96.1 ± 1.00
6f	100 ± 1.00
6g	122.0 ± 2.10
6h	75.7 ± 9.00
6i	100.0 ± 8.40
6l	100.0 ± 1.00
11	100.0 ± 1.20
17a	130.0 ± 5.20
17b	65.8 ± 4.70
17c	146.4 ± 7.90
17d	85.0 ± 5.70
Celecoxib	45.5 ± 0.90
Purvalanol A	>>100

Proliferazione cellulare di HT-29 dopo trattamento con diverse concentrazioni di **6a-l**, **11** e **17a-d**. I valori di IC₅₀ sono espressi come valori medi di 2 distinti esperimenti ripetuti in quadruplica.

PARTE SPERIMENTALE

- Chimica

Generale. I punti di fusione sono stati misurati con un apparecchio Gallencamp MBF- 595010M con capillare aperto e sono incorretti. Gli spettri IR sono stati ottenuti usando uno spettrofotometro infrarosso FTIR Perkin-Elmer 1600. Solo assorbimenti IR degni di nota sono elencati (cm⁻¹). Gli spettri ¹H e ¹³C NMR sono stati registrati con strumenti Varian Gemini-200 (200 and 50.3 MHz rispettivamente) o Varian Gemini-300 (300 and 75.5 MHz) usando CDCl₃ come solvente usando come standard interno tetrametilsilano o (CD₃)₂CO. Altri spettri ¹H NMR ed eterocorrelazioni ¹H-¹³C (HMQC and HMBC) sono stati registrati usando uno strumento Varian VXR-500 (500 MHz). Gli spettri di massa sono stati registrati usando uno strumento Helwett-Packard 5988-A. Le colonne cromatografiche sono state eseguite usando silica gel (E. Merck, 70-230 in miscela). Le reazioni sono state monitorate usando TLC 0.25 mm silica gel F-254 (E. Merck). Le microanalisi sono state determinate con un analizzatore Carlo Erba-1106. Tutti i reagenti sono stati di qualità commerciale o sono stati purificati prima del loro utilizzo. I

solventi organici sono stati con grado di purezza analitico o purificati usando procedure standard. I prodotti commerciali sono stati comprati alla Sigma-Aldrich.

Metodo generale per la preparazione dei diarilalcoli (4a-f) e ossidazione a chetoni (5a-f).

A) Ad una soluzione di bromotioanisolo (**1**) (450 mg, 2.22 mmol) in THF (4 mL) viene aggiunta una soluzione di *n*-BuLi in esano (1.4 mL, 2.22 mmol) a -78 °C in atmosfera di argon. La miscela viene posta ad agitare alla stessa temperatura per 1h. Successivamente viene aggiunta una soluzione della corrispondente aldeide o chetone (2.50 mmol) in THF distillato (2 mL) e si attende che la miscela raggiunga 20 °C, a questo punto viene aggiunta una soluzione satura di NH₄Cl (3 mL), e il tutto lasciato agitare per 20 minuti. Infine la miscela viene estratta con etere (3x20 mL) e la fase acquosa acidificata con HCl 2N ed estratta con CH₂Cl₂ (3x20 mL). La fase organica seccata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata al rotavapor. Il prodotto crudo ottenuto viene purificato in colonna cromatografica di gel di silice usando una miscela esano/ etile acetato (5:95) come eluente ottenendo l'alcol desiderato.

B) L'alcol intermedio (1 mmol) viene rapidamente trattato con MnO₂ (3 mmol) in diclorometano (15

mL). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare per 12h a temperatura ambiente. Il crudo di reazione filtrato, lavato con acqua e il solvente allontanato al rotavapor. Il residuo ottenuto viene purificato con colonna cromatografica di gel di silice usando come eluente una miscela 8:2 esano/ etile acetato.

2-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)furano (4a).

Utilizzando la procedura sopra descritta, il furano-2-carbaldeide **3a** é stato trasformato nell'alcol sottoforma di olio con un rendimento del 92%. Il crudo di reazione ottenuto e' stato rapidamente ossidato con MnO₂ perche' molto instabile.

3-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)furano (4b).

Utilizzando la procedura sopra descritta, il furano-3-carbaldeide **3b** (400 mg, 4.16 mmol) é stato trasformato nell'alcol sottoforma di olio (798 mg, 3.62 mmol) con un rendimento del 87%. Il crudo di reazione ottenuto é stato rapidamente ossidato con MnO₂ perché molto instabile. **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 3300 (OH); 1212 (Ar-O); 1086 (C-S). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 2.40 (s, 3H, CH₃-S); 4.36 (s, 2H, CH-OH); 5.53 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H-4 furan); 7.20 (m, 4H, Ar); 7.35 (s, 1H, H-2 furan).

***N*-(Metil)-2-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)indolo (4c).** Utilizzando la procedura sopra descritta, l'indolo-2-carbaldeide **3c** é stato trasformato nell'alcol sottoforma di olio (674 mg, 2.3 mmol) con un rendimento del 93 %. **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 3260 (OH); 1234 (Ar-O); 1088 (C-S). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 2.48 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 3.71 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 6.20 (d, $J = 6$ Hz, 1H, CH-O); 6.79 (s, 1H, C-2H); 7.12 (m, 1H, C-5H); 7.21 (m, 4H, Ar); 7.27 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar); 7.57 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Ar). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz) δ (ppm):** 32.8 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-}$); 69.7 (CH, CH-O); 109.4 (CH, C-2); 118.1 (C, C-3); 119.4 (CH, C-6); 119.7 (CH, C-4); 121.9 (CH, C-5); 126.2 (C, C-3a); 126.2 (CH, C-3' and C-5'); 126.9 (CH, C-2' and C-6'); 127.4 (CH, C-7); 137.1 (C, C-7a); 137.3 (C, C-1'); 140.7 (C, C-4').

***N*-(2-Fluorofenil)-2-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)pirrolo (4d).** Utilizzando la procedura sopra descritta, il pirrolo-2-carbaldeide **3d** é stato trasformato nell'alcol sottoforma di olio con un rendimento del 90%. **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 3220 (OH); 1180 (C-O); 1091 (C-S). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 2.47 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 5.60 (d, $J = 4$ Hz, 1H, CH-O); 6.08 (m, 1H, C-4H); 6.28 (m, 1H, C-3H); 6.78 (m, 1H, C-5H); 7.22 (m, 8H, Ar).

***N*-(2-Fluorofenil)-3-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)pirrolo (4e).** Utilizzando la procedura sopra descritta, il pirrolo-3-carbaldeide **3e** é stato trasformato nell'alcol sottoforma di olio con un rendimento del 86%. ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm): 2.47 (s, 3H, CH₃-S); 5.72 (d, *J* = 4 Hz, 1H, CH-O); 6.56 (m, 1H, C-4H); 6.68 (s, 1H, C-2H); 6.72 (m, 1H, C-5H); 7.08 (m, 1H, C-3'H); 7.09 (m, 1H, C-5'H); 7.10 (m, 2H, C-2''H, C-6''H); 7.14 (m, 4H, C-3''H, C-5''H, C-4'H, C-6'H). Il crudo di reazione e' stato rapidamente ossidato con MnO₂ perche' molto instabile.

3-(*p*-Metiltiofenilidrossimetil)indolo (4f). Questo composto non e' stato isolato nelle condizioni di reazione.

2-(*p*-Metiltiobenzoil)furano (5a). Partendo dal *p*-bromotioanisolo (500 mg, 2.46 mmol), e furfurale (196.8 mg, 2.05 mmol) seguendo la procedura descritta prima, usando BuLi in THF a -78 °C é stato ottenuto il corrispondente carbinolo **4a** con una purezza sufficiente per effettuare la reazione successiva di ossidazione a chetone con MnO₂. Il composto e' stato ottenuto come solido bianco (406 mg, 1.87 mmol) con un rendimento del 91%. **Mp:** 81-

83 °C (esano / etil acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1633 (CO); 1296 (Ar-O); 1091 (C-S). **^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 2.54 (s, 3H, CH_3 -); 6.59 (m, 1H, C-4H), 7.23 (m, 1H, C-3H); 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-3'H and C-5'H); 7.69 (m, 1H, C-5'H); 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-2'H and C-6'H). **^{13}C -NMR (CDCl_3 , 50.3 MHz) δ (ppm):** 14.8 (CH_3 , CH_3 -); 112.1 (CH, C-4); 119.9 (CH, C-3); 124.8 (CH, C-3' and C-5'); 129.8 (CH, C-2' and C-6'); 133.2 (C, C-1'); 145.4 (C, C-2); 146.8 (CH, C-5); 152.3 (C, C-4'); 182.4 (C, CO).

3-(*p*- Metiltiobenzoil)furano (5b). L'ossidazione del carbinolo **4b** (970 mg, 4.41 mmol) al corrispondente chetone é stata effettuata secondo la procedura generale sopra descritta. Il composto é stato ottenuto come polvere bianca (970 mg, 4.37 mmol) con un rendimento del 92%. **Mp:** 132-136°C (esano / etil acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1654 (CO); 1224 (Ar-O); 1102 (C-S). **^1H -NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 2.42 (s, 3H, CH_3 -S); 6.97 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-4 furan); 7.24 (m, 4H, Ar), 7.62 (s, 1H, H-2 furan); 7.98 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-5 furan).

***N*-(Metil)-2-(*p*- Metiltiobenzoil)indolo (5c).** L'ossidazione del carbinolo **4c** (674 mg, 2.3 mmol) al corrispondente chetone é stata effettuata secondo la

procedura generale sopra descritta. Il composto é stato ottenuto come polvere bianca (575 mg, 2.05 mmol) con un rendimento del 89%. **Mp**: 142-144 °C (esano / etil acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 1665 (CO); 1234 (Ar-O); 1087 (C-S). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm)**: 2.52 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 3.78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 7.24 (m, 1H, C-7H); 7.30 (m, 4H, Ar); 7.50 (s, 1H, H-2); 7.75 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar); 8.43 (m, 1H, Ar). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz) δ (ppm)**: 15.1 (CH_3); 32.8 (CH_3); 109.5 (CH, C-2); 115.4 (C, C-3); 122.5 (CH, C-6); 123.5 (CH, C-5); 123.4 (CH, C-4); 125.1 (CH, CH, C-3' and C-5'); 127.1 (C, C-3a) ; 129.1 (CH, C-2' and C-6'); 136.9 (C, C-7a); 137.3 (CH, C-7 and C-1'); 142.9 (C, C-4'), 189.7 (CO).

***N*-(2-Fluorofenil)-2-(*p*-Metiltiobenzoil)pirrolo**

(5d). L'ossidazione del carbinolo **4d** (320 mg, 1 mmol) al corrispondente chetone é stata effettuata secondo la procedura generale sopra descritta. Il composto é stato ottenuto come polvere bianca (210 mg, 0.67 mmol) con un rendimento del 52%. **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm)**: 2.53 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 6.38 (m, 1H, H-4); 6.88 (m, 1H, H-3); 7.06 (m, 1H, H-5); 7.18 (m, 2H, C-3'H y C-5'H); 7.22 (m, 2H, Ar); 7.31 (m, 2H, Ar); 7.80 (m, 2H, C-2'H and C-6'H). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm)**: 2.53 (s, 3H, CH_3);

6.38 (t, $J = 3$ Hz, 1H, H-3); 6.88 (dd, $J = 3, J = 4$ Hz, 1H, H-5); 7.05 (m, 1H, H-2); 7.16 (t, $J = 11$ Hz, H-4); 7.22 (t, $J = 18.5$ Hz, 1H, H-3''); 7.27 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.36 (m, 2H, H-4'', H-6''); 7.81 (d, $J = 10.5$, 2H, H-2', H-6'). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm):** 15.0 (CH_3 , CH_3 -); 109.7 (CH, C-4); 116.9 (CH, $J = 20$ Hz, C-3''); 121.9 (CH, C-3); 124.3 (CH, $J = 3.8$ Hz, C-5'); 124.8 (CH, C-3', C-5'); 127.7 (CH, C-5); 127.6 (C, C-2); 129.1 (CH, $J = 7.7$ Hz, C-4''); 129.9 (CH, (CH, C-2' and C-6')); 130.4 (CH, C-6''); 131.7 (C, C-1''); 134.9 (C, C-1'); 144.3 (C, C-4'); 156.4 (C, $J = 248$ Hz, C-2''); 184.1 (CO).

***N*-(2-Fluorofenil)-3-(*p*-Metiltiobenzoil)pirrolo**

(5e). L'ossidazione del carbinolo **4e** (636.9 mg, 2.04 mmol) al corrispondente chetone é stata effettuata secondo la procedura generale sopra descritta. Il composto é stato ottenuto come polvere bianca (529 mg, 1.70 mmol) con un rendimento del 83%. **Mp:** 104-106 °C (esano / etil acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1625 (CO); 1507 (C=C); 1468 (SO₂); 1230 ((Ar-O); 1200 (C-O); 1091 (S=O). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 2.54 (s, 3H, CH_3 -S); 6.28 (m, 1H, H-4); 7.02 (m, 1H, H-5); 7.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-3'H y C-5'H); 7.28 (m, 4H, Ar); 7.51 (m, 1H, H-2); 7.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-2'H and C-6'H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ,**

50.3 MHz) δ (ppm): 15.0 (CH₃, CH₃-); 111.7 (CH, C-4); 116.9 (CH, $J = 20$ Hz, C-3''); 122.9 (CH, $J = 3$ Hz, C-4''); 125.0 (CH, C-3' and C-5'); 125.1 (CH, C-5); 127.7 (CH, $J = 3$ Hz, C-6''); 128,6 (CH, C-5''); 128.8 (CH, C-2); 129.8 (CH, C-2'and C-6'); 135.8 (CH, C-1'); 143.7 (C, C-4'); 153.2 (C, $J = 242$ Hz, C-2''); 152.3 (C, C-1''); 191.2 (CO).

3-(*p*-Metiltiobenzoil)indolo (5f). L'ossidazione del carbinolo **4f** (100 mg, 0.34 mmol) al corrispondente chetone é stata effettuata secondo la procedura generale sopra descritta. Il composto é stato ottenuto come polvere bianca (53 mg, 0.2 mmol) con un rendimento del 4%. **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1632 (CO); 1502 (C=C); 1215 ((Ar-S). **¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm):** 2.61 (s, 3H, CH₃-S); 6.08 (m, 2H, H-5, H-6); 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-3'H y C-5'H); 7.28 (m, 2H, Ar); 7.61 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, C-2'H and C-6'H); 7.85 (m, 1H, H-7); 8.12 (s, 1H, H-2); 8.23 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H-4). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.5 MHz) δ (ppm):** 15.0 (CH₃, CH₃-); 112.8 (C, C-3); 113.1 (CH, C-7); 116.9 (CH, C-4); 119.8 (CH, C-6); 124.1 (CH, C-5); 126.2 (C, C-3a); 126.4 (CH, C-3', C-5'); 128,1 (CH, C-2', C-6'); 135.8 (CH, C-1'); 135.6 (C, C-7a); 139.3 (C, C-4'); 185.7 (CO). HMS (ESIpos.m) 268.0788 (M·)⁺

Metodo generale per la preparazione dei diarilchetoni (5g-I). Una soluzione di tioanisolo (7) (127 mg, 1.02 mmol) in diclorometano anidro (15mL) viene posta sotto forte agitazione, raffreddata a 0 °C in atmosfera di argon e addizionata goccia a goccia di una soluzione di tetracloruro di titanio (0.15 mL, 1.36 mmol). A questo punto una soluzione del corrispondente cloruro dell'acido carbossilico (8g-I) (0.80 mmol) in diclorometano anidro (2 mL). Il tutto lasciato agitare per 10h a temperatura ambiente. Al crudo di reazione si aggiungono 40mL di ghiaccio e la fase acquosa viene separata. La fase organica lavata con una soluzione satura di NaHCO₃, seccata con Na₂SO₄, ed evaporata. Il residuo purificato in colonna cromatografica usando come eluente una miscela esano/etile acetato 8:2.

2-(p-Metiltiobenzoil)tiofene (5g). Il composto desiderato é stato ottenuto partendo dal cloruro dell'acido 2-tiofene carbossilico (8g) con una resa del 50% dopo purificazione in colonna cromatografica. **Mp:** 64-66 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr): ν (cm⁻¹):** 1622 (C=O); 1088 (S-CH₃). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 2.54 (s, 3H, CH₃-S); 7.16 (dd, $J_1 = 5.2, J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C-4H); 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-3'H y C-5'H); 7.64 (dd, $J_1 = 3.8, J_2 =$

1 Hz, 1H, C-3H); 7.71 (dd, $J_1 = 5.2$, $J_2 = 1$ Hz, 1H, C-5H); 7.82 (d, $J = 8.8$, 2H, C-2'H y C-6'H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 14.8 (CH₃, CH₃-); 124.8 (CH, C-3' y C-5'); 127.7 (CH, C-4); 129.6 (CH, C-2' and C-6'); 133.7 (CH, C-3); 133.9 (C, C-1'); 134.1 (CH, C-5); 143.4 (C, C-2); 144.9 (C, C-4'); 186.9 (C, CO).

3-(*p*-Methylthiobenzoyl)thiophene (5h). Il composto desiderato é stato ottenuto partendo dal cloruro dell'acido 3-tiofene carbossilico (**8h**) con una resa del 65% dopo purificazione in colonna cromatografica. **Mp:** 65-68 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr): ν (cm⁻¹):** 1645 (C=O); 1100 (S-CH₃). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 2.54 (s, 3H, CH₃-S); 7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-3'H, C-5'H); 7.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, C-4H); 7.56 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, C-5H); 7.78 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-2'H and C-6'H); 7.91 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-2). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 14.6 (CH₃, CH₃-); 124.6 (CH, C-3' and C-5'); 125.1 (CH, C-4); 128.4 (CH, C-5), 129.7 (CH, C-2' and C-6'); 133.1 (CH, C-2); 134.4 (C, C-1'); 140.8 (CH, C-3); 144.3 (C, C-4'); 188.7 (C, CO).

4-Bromo-4'-(metiltio)benzofenone (5i). Il composto desiderato é stato ottenuto partendo dal

cloruro dell'acido 4-bromobenzoico (**8i**) come polvere bianca con una resa dell' 85 % yield. **Mp**: 143-145 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 1634 (C=O); 767 (C-Br). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm)**: 2.55 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-3H and C-5H); 7.64 (s, 4H, C-2'H, C-3'H, C-5'H, C-6'H); 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-2H, C-6H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz) δ (ppm)**: 14.9 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-S}$); 124.8 (CH, C-3' and C-5'); 127.2 (C, C-4'); 130.5 (CH, C-3 and C-5); 131.3 (CH, C-2' and C-6'); 131.5 (CH, C-2 and C-6); 133.1 (C, C-1'); 136.5 (C, C-4); 145.7 (C, C-1); 194.6 (C=O).

4-Fluoro-4'-(metiltio)benzofenone (5l). Il composto desiderato é stato ottenuto partendo dal cloruro della acido 4-fluorobenzoico (**8l**) (500 mg, 3.15 mmol) e tioanisolo (3.78 mmol) con una resa del 34% (260 mg, 1.05). **Mp**: 94-97 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 1717 (C=O); 1595 (C=); 1221 (Ar-S); 1089 (C-S); 754 (C-F). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm)**: 2.53 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-S}$); 7.15 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3 and H-5); 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.81 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2, H-6). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ (ppm)**: 15.2 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-S}$); 115.6 and 115.9 (CH, $J = 22$ Hz, C-3 and C-5); 125.2

(CH, C-3', C-5'); 130.8 (CH, C-2', C-6'); 132.6 and 132.7 ((CH, $J = 9$ Hz, C-3 and C-5); 133.8 (C, C-1); 134.4 (C, C-1'); 145.7 (C, C-4'); 163.8 and 167.2 (C, $J = 254$ Hz, C-4); 194.6 (C=O).

Procedura generale per l'ossidazione dei metiltioderivati a sulfoni.

Ad una soluzione di metiltioderivato (**6a-l e 11**) (100mg, 0.34 mmoli) in 25 mL di diclorometano anidro raffreddata a 0 °C si aggiunge lentamente *m*-CPBA (129 mg, 0.75 mmol). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare per 4 h a temperatura ambiente. Successivamente viene trattata con una soluzione di NaOH 2N (3x25mL), la fase organica separata, seccata con sodio solfato anidro, filtrata ed il solvente evaporato al rotavapor. Il residuo purificato con colonna cromatografica di gel di silice utilizzando come eluente una miscela esano/ etile acetato 7:3.

2-(*p*-metilsulfonilbenzoil)furano (6a). Dal corrispondente metiltio derivato (**5a**) (218.27 mg, 1 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 95% (207.1 mg, 0.95 mmol). **Mp:** 96-98 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1642 (CO); 1434 (SO₂); 1278 (Ar-S); 1099 (C-O). **¹H-NMR (CDCl₃,**

200 MHz) δ (ppm): 3.11 (s, 3H, CH₃-S); 6.62 (m, 1H, C-4H); 7.31 (m, 1H, C-3H); 7.79 (s, 1H, C-5H); 8.13 (d, $J = 5.6$ Hz, 4H, C-2'H, C-3'H, C-5'H and C-6'H). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.4 (CH₃, CH₃-); 112.7 (CH, C-4); 121.4 (CH, C-3); 127.4 (CH, C-3', and C-5'); 130.0 (CH, C-2', and C-6'); 141.5 (C, C-1'); 143.4 (C, C-2); 147.8 (CH, C-5); 151.7 (C, C-4'); 180.6 (C, CO).

3-(*p*- metilsulfonilbenzoil)furano (6b). Dal corrispondente metiltio derivato (**5b**) (220 mg, 0.87 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 95% (148 mg, 0.59 mmol). **Mp:** 125-127 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1643 (CO); 1562 (C=C); 1443 (SO₂); 1234 (Ar-S); 1108 (C-O). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 3.18 (s, 3H, CH₃-S); 6.98 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, C-4H); 7.60 (s, 1H, C-2H); 8.00 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, C-5H); 8.10 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, C-H2', C-H6'); 8.16 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, C-H3', C-H5'). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.4 (CH₃, CH₃-); 109.8 (CH, C-4); 125.9 (CH, C-3); 127.7 (CH, C-3', and C-5'); 129.4 (CH, C-2', and C-6'); 142.1 (C, C-1'); 142.8 (C, C-2); 144.5 (CH, C-5); 148.5 (C, C-4'); (149.0 (CH, C-2); 189.2 (C, CO).

***N*-metil-3-(*p*- metilsulfonilbenzoil)indolo (6c).**

Dal corrispondente metiltio derivato (**5c**) (281 mg, 1 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 93% (261.33 mg, 0.93 mmol). **Mp:** 203-205 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1562 (C=C); 1425 (SO₂); 1212 (Ar-O); 1108 (C-O); 1047 (S=O). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 3.12 (s, 3H, CH₃-S); 3.88 (s, 3H, CH₃-N); 7.40 (m, 3H, Ar); 7.48 (s, 1H, H-2); 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C-2'H and C-6'H); 78.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, C-3'H and C-5'H); 8.42 (m, 1H, H-7). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 33.6 (CH₃); 44.2 (CH₃, CH₃-); 109.8 (CH, C-2); 114.8 (C, C-3); 122.2 (C, C-6); 123.1 (CH, C-5); 124.0 (CH, C-4); 126.6 (C, C-3a); 127.3 (CH, C-2' and C-6'); 129.1 (CH, C-3' and C-5'); 137.5 (C, C-7a); 138.8 (CH, C-7); 141.9 (C, C-1'); 145.5 (C, C-4'); 190.1 (C, CO).

***N*-(2-fluorofenil)-2(*p*metilsulfonilbenzoil)pirrolo (6d).**

Dal corrispondente metiltio derivato (**5d**) (138 mg, 0.588 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 41% (84 mg, 0.25 mmol). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1658 (CO); 1465 (SO₂); 1243 (Ar-S); 1102 (SO₂). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 3.09 (s, 3H, CH₃-S); 6.42 (m, 1H, C-4H); 6.89 (m, 1H, C-5H);

7.12 (m, 1H, C-3H); 7.28 (m, 4H, C-2'H, C-3'H, C-5'H and C-6'H); 8.02 (m, 4H, Ar). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.4 (CH₃, CH₃-); 110.3 (CH, C-4); 116.1 (CH, *J* = 20 Hz, C-3''); 123.3 (CH, C-5); 124.3 (CH, C-5''); 127.2 (CH, C-2', and C-6'); 127.3 (CH, *J* = 8 Hz, C-6''); 129.4 (CH, *J* = 8 Hz, C-4''); 129.9 (CH, C-3' and C-5'); 130.9 (C, C-2); 131.0 (CH, C-3); 142.8 and 143.4 (C, C-2 and C-4'); 155.5 (C, *J* = 234 Hz, C-2''); 188.7 (C, CO).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 3.11 (s, 3H, CH₃); 6.44 (dd, *J* = 2.5, *J* = 4 Hz, H-3); 6.88 (dd, *J* = 1.5, *J* = 3 Hz, 1H, H-5); 7.13 (t, *J* = 2 Hz, 1H, H-4); 7.21 (t, *J* = 10 Hz, 1H, H-3''); 7.27 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-5''); 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-4'', H-6''); 8.03 (dd, *J* = 8.5, *J* = 17, 4H, Ar). **¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ (ppm):** 44.4 (CH₃, CH₃-); 110.3 (CH, C-4); 116.1 (CH, *J* = 20 Hz, C-3''); 123.3 (CH, C-5); 124.3 (CH, C-5''); 127.2 (CH, C-2', and C-6'); 127.3 (CH, *J* = 8 Hz, C-6''); 129.4 (CH, *J* = 8 Hz, C-4''); 129.9 (CH, C-3' and C-5'); 130.9 (C, C-2''); 131.0 (CH, C-3); 142.8 and 143.4 (C, C-2 and C-4'); 155.5 (C, *J* = 234 Hz, C-2''); 183.0 (C, CO).

***N*-(2-fluorofenil)-3-(*p*-etilsulfonilbenzoil)pirrolo (6e).** Dal corrispondente metiltio derivato (5e) (311 mg, 1 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del

92% (286 mg, 0.92 mmol). **Mp**: 134-136 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 1632 (CO); 1402 (SO₂); 1283 (Ar-S); 1153 (SO₂). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm)**: 3.09 (s, 3H, CH₃-S); 6.85 (m, 1H, C-4H); 7.05 (m, 1H, C-5H); 7.24 (s, 1H, C-2H); 7.37 (m, 4H, C-2''H, C-3''H, C-5''H, and C-6''H); 8.02 (m, 4H, Ar). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm)**: 44.4 (CH₃, CH₃-); 111.4 (CH, C-4); 117.4 (CH, $J = 28$ Hz, C-3''); 123.7 (CH, C-5); 125.1 (CH, C-2); 127.3 (CH₂, C-3', and C-5'); 128.7 (CH, $J = 21$ Hz, C-4''); 129.1 (CH, $J = 8$ Hz, C-5''); 129.2 (CH, $J = 2$ Hz, C-6); 129.5 (CH, C-2', and C-6'); 142.6 (C, C-3, and C-2''); 144.2 (C, C-1', and C-4'); 155.5 (C, $J = 234$ Hz, C-1''); 188.7 (C, CO).

3-(*p*-metilsulfonilbenzoil)indolo (6f). Dal corrispondente metiltio derivato (**5f**) (100 mg, 0.34 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 14% (16 mg, 0.05 mmol). **Mp**: 217-219 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 3300 (NH); 1681 (CO); 1445 (SO₂); 1271 (Ar-S); 1147 (C-S). **¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm)**: 3.07 (s, 3H, CH₃-S); 6.89 (bs, 1H, NH); 7.03 (m, 1H, H-6); 7.20 (m, 1H, H-5); 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7); 7.62 (s, 1H, H-2); 7.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 8.42 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H-4). **¹³C-NMR**

(CDCl₃, 75.5 MHz) δ (ppm): 44.6 (CH₃, CH₃-); 112.3 (CH, C-7); 117.9 (CH, C-4); 118.6 (CH, C-6); 119.1 (C, C-3); 122.5 (CH, C-5); 126.1 (C, C-3a); 128.0 (CH, C-3', C-5'); 128.4 (CH, C-2', C-6'); 132.6 (CH, C-1); 137.4 (C, C-7a); 140.7 (C, C-1'); 145.6 (C, C-4'); 185.0 (C, CO). HMRS (ESIpos.m) 284.0741 (M+H)⁺.

2-(*p*- metilsulfonilbenzoil)tiofene (6g). Dal corrispondente metiltio derivato (**9g**) (120 mg, 0.51 mmol), e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 73% (100 mg, 0.37 mmol). **Mp:** 136-138 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1636 (CO); 1413 (SO₂); 1286 (Ar-S); 1154 (SO₂). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 3.13 (s, 3H, CH₃-S); 7.20 (dd, $J_1 = 4.8, J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C-4H); 7.62 (dd, $J_1 = 3.6, J_2 = 1$ Hz, 1H, C-3H); 7.81 (dd, $J_1 = 4.8, J_2 = 1$ Hz, 1H, C-5H); 8.05 (dd, $J_1 = 8.4, J_2 = 1$ Hz, 4H, C-2'H, C-3'H, C-5'H y C-6'H). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.3 (CH₃, CH₃-); 127.5 (CH, C-3' and C-5'); 128.3 (CH, C-4); 129.7 (CH, C-2' and C-6'); 135.4 and 135.5 (CH, C-3, and C-5); 142.5 and 142.6 (C, C-2 and C-1'); 143.2 (C, C-4'); 186.5 (C, CO). **Anal. Calcd.** for C₁₂H₁₀O₃S₂: C, 54.11 %; H, 3.78 %. **Found:** C, 53.86 %; H, 3.64 %.

3-(*p*- metilsulfonilbenzoil)tiofene (6h). Dal corrispondente metiltio derivato (**9h**) (240 mg, 1.02 mmol) e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 74% (208 mg, 0.75 mmol). **Mp:** 122-124 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1665 (CO); 1424 (SO₂); 1212 (Ar-S); 1134 (SO₂). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 3.12 (s, 3H, CH₃-S); 7.46 (m, 1H, C-4H); 7.59 (d, J = 2.8 Hz, 1H, C-5H); 7.96 (d, J = 1.4 Hz, 1H, C-2H); 8.01 (d, J = 8.6, 2H, C-3'H, C-5'H); 8.10 (d, J = 8.6, 2H, C-2'H, C-6'H). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.3 (CH₃, CH₃-); 126.9 (CH, C-4); 127.5 (CH, C-3' and C-5'); 128.2 (CH, C-5); 129.8 (CH, C-2' and C-6'); 135.0 (CH, C-3); 143.1 (C, C-1'); 143.2 (C, C-4'); 188.2 (C, CO). **Anal. Calcd.** for C₁₂H₁₀O₃S₂: C, 54.11 %; H, 3.78 %. Found: C, 54.23 %; H, 3.98 %.

4-Bromo-4'-(metilsulfonil)benzofenone (6i). Dal corrispondente metiltio derivato (**9i**) (300 mg, 0.97 mmol), e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 90% (296 mg, 0.87 mmol). **Mp:** 186-188 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1649 (C=O); 1316 (SO₂); 756 (C-Br). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ**

(ppm): 3.12 (s, 3H, CH₃-SO₂); 7.68 (s, 4H, C-2'H, C-3'H, C-5'H, C-6'H); 7.91 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, C-2H, C-6H); 8.06 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, C-3H, C-5H). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.4 (CH₃, CH₃-S); 127.5 (CH, C-2 and C-6); 128.7 (C, C-4'); 130.4 (CH, C-2' and C-6'); 131.5 (CH, C-3 and C-5); 132.0 (CH, C-3' and C-5'); 134.9 (C, C-1'); 141.7 (C, C-4); 143.6 (C, C-1); 193.9 (C=O). **Anal. Calcd.** for C₁₄H₁₁BrO₃S: C, 49.57 %; H, 3.27 %. Found: C, 49.82 %; H, 3.43 %.

4-Fluoro-4'-(metilsulfonil)benzofenone (6l). Dal corrispondente metiltio derivato (**9l**) (216 mg, 0.87 mmol), e seguendo la procedura sopra descritta si ottiene il prodotto desiderato con una resa del 100% (242 mg, 0.87 mmol). **Mp:** 120-123 °C (esano/ etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1716 (C=O); 1271 (SO₂); 1270 (Ar-S); 1152 (C-S); 754 (Ar-F). **¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 3.12 (s, 3H, CH₃-SO₂); 7.22 (t, $J = 5.4$ Hz, H, H-3', H-5'); 7.56 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.92 (CH, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8.08 (CH, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-3, H-5). **¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ (ppm):** 44.3 (CH₃, CH₃-S); 115.7 and 116.0 (CH, $J = 22$ Hz, C-3' and C-5'); 127.5 (C, C-3 and C-5); 130.3 (C, C-2 and C-4); 132.6 and 132.7 ($J = 9$ Hz, C-2' and C-6'); 132.8 (C, C-1); 142.2 (C, C-1'); 143.5 (C, C-4); 164.1 and 167.5 (C, $J = 256$ Hz, C-4'); 193.5 (C=O). **HMRS** 279.2402 (M+H)⁺

**4-(*p*-metilsulfonilmetil)-4*H*-pirrolo[2,1-
c]1,4benzoxazine (11).** Dal corrispondente metiltio
derivato (10) seguendo la procedura sopra descritta
si ottiene il prodotto desiderato con una resa del
45%. **Mp:** 109-111 °C (esano/etile acetato). **IR**
(KBr), ν (cm^{-1}): 1519 (C=C); 1413 (SO₂); 1224
(Ar-O); 956 (C-O); 1043 (S=O). **¹H-NMR (CDCl₃,
200 MHz) δ (ppm):** 3.10 (s, 3H, CH₃-S); 5.75 (dt, J_1
= 3 Hz, J_2 = 1 Hz, 1H, C-3H); 6.21 (s, 1H, C-4H); 6.33
(t, J = 3 Hz, 1H, C-2H); 7.10 (m, 3H, Ar); 7.23 (dd, J_1
= 3 Hz, J_2 = 1 Hz, 1H, C-1H); 7.40 (m, 1H, C-9H); 7.70
(d, J = 8.2 Hz, 2H, C-2'H, and C-6'H); 7.98 (d, J = 8,2
Hz, 2H, C-3'H, and C-5'H). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3
MHz) δ (ppm):** 44.5 (CH₃, CH₃-); 75.2 (CH, C-4);
106.8 (CH, C-3); 110.7 (CH, C-2); 114.8 (CH, C-1);
115.4 (CH, C-6); 118.3 (CH, C-9); 122.8* (CH, C-7);
125.2* (CH, C-8); 125.8 (C, C-3a); 126.5 (C, C-1');
127.6 (CH, C-2', and C-6'); 128.5 (CH, C-3', and C-5');
140.6 (C, C-9a); 146.1 (C, C-4'); 145.2 (C, C-5a).
Interchangeable. **Anal. Calcd.** for C₁₈H₁₅NO₃S: C,
66.44 %; H, 4.65 %; N, 4.30 %. Found: C, 66.59 %; H,
4.77 %; N, 4.56 %.

Preparazione delle 1,4-Benzoxazine

4-(*p*-metiltiofenil)-4*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzoxazina (11). Ad una soluzione di *N*-(2-fluorofenil)-2-[(*p*-metiltiofenil)idrossimetil]pirrolo (500 mg, 1.59 mmol) in in DMF anidra (5 mL) viene aggiunto idruro di sodio (127 mg, 3.18 mmol) (dispersione oleosa al 60 %). La miscela di reazione viene lasciata ad agitare per 24h a 130 °C. Successivamente lasciata agitare per 30 minuti a temperatura ambiente e addizionata di 20 mL di etere. La fase organica separata, lavata tre volte con acqua, seccata con solfato di sodio anidro, filtrata ed evaporata al rotavapor. Il residuo viene purificato in colonna cromatografica di gel di silice utilizzando come eluente una miscela esano/etile acetato 8:2 con una resa del 50% (233 mg, 0.795 mmol). **Mp:** 122-123 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1504 (C=C); 1216 (Ar-O); 1088 (C-O). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 2.5 (s, 3H, CH₃-S); 5.73 (m, 1H, C-3H); 6.06 (s, 1H, C-4H); 6.31 (t, 1H, $J = 3.8$ Hz, C-2H); 7.06 (m, 3H, Ar); 7.21 (dd, $J_1 = 3$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, C-1H); 7.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar); 7.40 (m, 3H, Ar). **¹³C-NMR (CDCl₃, 50.3 MHz) δ (ppm):** 15.7 (CH₃, CH₃-S); 76.0 (CH, C-4); 106.3 (CH, C-3); 110.5 (CH, C-2); 114.7 (CH, C-1); 114.9 (CH, C-9); 118.3 (CH, C-6); 122.3* (CH, C-7); 124.9* (CH, C-8); 126.2 (CH, C-2', and C-6'); 126.6 (C, C-3a); 127.3 (C, C-1'); 128.5 (CH, C-3', and C-5'); 134.5 (C, C-9a); 139.4 (C, C-4'); 145.9 (C, C-5a).

* scambiabili.

Procedura generale per l'ottenimento dei diaril composti

Una sospensione di bromoaril derivato (2.46 mmoli), Cu (134mg, 3.69 mmoli) e K₂CO₃ anidro senza solvente in un tubo Schlenk viene riscaldato a 300°C per 8h. a questo punto, la miscela di reazione viene versata in 25 mL di acqua ed estratta con etere (3 x 30 mL). La fase organica seccata con Na₂SO₄ ed evaporata sotto vuoto si ottiene un olio incolore. Il residuo purificato con colonna cromatografica di gel di silice utilizzando come eluente una miscela esano/ etile acetato 8:2.

2-(*p*-metiltiofenil)piridina (13). Partendo da (500 mg, 2.46 mmoli) di 4-bromotioanisolo e seguendo la procedura descritta prima, si ottiene il composto desiderato come solido bianco (50 mg, 0.25 mmoli) con una resa del 10%. **Mp:** 55-57 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr), ν (cm⁻¹):** 1584 (C=C); 1463 (C=C); 843 (C-S). **¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm):** 2.53 (s, 3H, CH₃-S); 7.20 (m, 1H, C-Ar); 7.40 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C-2'H e C-6'H); 7.68 (m, 2H, H-piridina); 7.91 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C-3'H e C-5'H); 8.65 (m, 1H, C-6H piridina).

2-(*p*-metilsulfonilfenil)piridina (14). Partendo dal corrispondente metiltioderivato (50 mg, 0.25 mmoli) e seguendo la procedura generale descritta prima si ottiene il prodotto desiderato come solido bianco (35 mg, 0.15 mmoli) con una resa del 60%. **Mp:** 86-88 °C (esano/etile acetato). **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 1300 (SO_2); 1152 (SO). **$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm):** 3.10 (s, 3H, CH_3 -); 7.28 (m, 1H, C-5H); 7.81 (m, 2H, C-3H e C-4H); 8.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, C-2'H e C-6'H); 8.07 (d, $J = 8.8$, 2H, C-3'H e C-5'H); 8.73 (d, $J = 5.5$, C-6H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz) δ (ppm):** 44.6 (CH_3 , CH_3 -); 121.1 (CH, C-3); 123.4 (CH, C-5); 127.7 (CH, C-2' e C-6'); 127.8 (CH, C-3' e C-5'); 137.1 (CH, C-4); 140.4 (C, C-1'); 144.4 (C, C-4'); 149.9 (CH, C-6); 155.1 (C, C2). **Anal. Calcd.** per $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$: C, 61.78 %; H, 4.75 %; N, 6.00 %. **Found:** C, 66.63 %; H, 4.65 %; N, 6.17 %.

- **BIOLOGIA**

Saggi *In vivo*

Il test dell'edema su zampa di ratto indotta da carragenina é stato effettuato utilizzando una versione modificata del metodo di Winter come esame preliminare di screening. I ratti (in gruppi di sei animali del peso di 160-200 gr, maschio giovane adulto Sprague-Dawley) sono stati a digiuno prima che il composto in esame venisse somministrato (70 mg/Kg po). Il farmaco era stato somministrato un ora prima della carragenina. L'edema nella zampa del ratto é stata indotta mediante iniezione subplantare di 0.1 mL di una soluzione sterile e apirogena di carragenina all'1% in NaCl 0.9% e il volume della zampa é stato misurato mediante lo spostamento di acqua con un pletismometro s-5128, Ugo Basile. Tre e quattro ore dopo la somministrazione della carragenina é stato misurato il volume della zampa. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate al computer.

Gli eventuali trattamenti di media significativamente inferiori rispetto al controllo sono stati indicativi di una significativa attività antinfiammatoria. Il volume della zampa del ratto é stata confrontata con animali che ricevono ibuprofene per comparare la potenza

relativa. Assenza di sintomi tossici sono stati osservati dopo la somministrazione orale di 70 mg/Kg nel test sugli animali.

Saggi *In vitro*

La capacità di alcune sostanze di inibire la conversione dell'Acido Arachidonico (AA) in Prostaglandine H₂ (PG H₂) è stata determinata utilizzando il kit "COX (ovine) Inhibitor Screening Assay" (n° cat. 560101; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Il saggio consta di due fasi.

Nella prima parte si effettua una reazione enzimatica in cui l'enzima Cicloossigenasi (COX) catalizza la reazione di sintesi delle prostaglandine a partire dall'acido arachidonico.

Per cui, in tubi da 1.5 ml aggiungo un buffer di reazione, eme, l'enzima (COX1 o COX2) (inclusi nel kit) e l'inibitore da saggiare. Incubo 5 min. a 37°C per permettere l'attivazione dell'enzima; quindi per iniziare la reazione aggiungo acido arachidonico (il substrato), per 2 min. a 37°C. La reazione enzimatica viene bloccata aggiungendo acido cloridrico ed una soluzione satura di cloruro di stagno (che permette la riduzione di PG H₂, prodotto durante la reazione COX, ad una prostaglandina più stabile PG F_{2α}).

Sono stati effettuato controlli positivi e negativi:

- È stata determinata l'attività di COX in assenza di inibitore (quindi 100% di attività)
- Sono stati inattivati gli enzimi COX1 e COX2 al calore per verificare la presenza di attività non determinata da COX
- È stata saggiata la capacità di inibizione dei composti Indometacina e NS398, due inibitori noti (l'Indometacina non è un inibitore selettivo, mentre l'NS398 è un inibitore selettivo per COX2).

Quindi, la quantità di prostaglandine prodotta è determinata nella seconda parte del saggio, una reazione immunoenzimatica (ACE™ competitive EIA) che utilizza anticorpi specifici che si legano a tutte le maggiori componenti di prostaglandine presenti.

Questo saggio si basa sulla competizione tra le prostaglandine prodotte durante la reazione catalizzata da COX, e prostaglandine coniugate con acetilcolinesterase (AChE) (PG-tracer) per una quantità limitata di anticorpo monoclonale. Poiché la concentrazione di PG-tracer è sempre costante mentre la concentrazione di PG prodotte dalla reazione catalizzata da COX (1 o 2) varia, la quantità di PG-tracer che è capace di legare l'anticorpo monoclonale sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di prostaglandine.

Il complesso PG-anticorpo si legherà poi all'anti-IgG di topo policlonale ovino che è legato ai pozzetti di una piastra (inclusa nel kit). Dopo aver incubato per 18h a temperatura ambiente, si effettuano dei lavaggi della piastra con una soluzione tampone (presente nel kit) per rimuovere ciò che non si è legato, quindi si aggiunge a ciascun pozzetto il reagente di Ellman (che contiene il substrato per l'AChE) e si incuba per 18 h al buio su uno shaker orbitale.

Il prodotto della reazione enzimatica è di colore giallo ed assorbe ad una lunghezza d'onda compresa tra 405 e 420 nm. L'intensità di questo colore, determinata spettrofotometricamente, è proporzionale alla quantità di PG-tracer legata all'anticorpo, che è inversamente proporzionale alla quantità di prostaglandine libere presenti nel pozzetto durante l'incubazione:

$$A \propto \text{PG-tracer} \propto 1/\text{PG}$$

Una piastra da 96 pozzetti deve contenere oltre ai campioni da saggiare (che dovrebbero essere saggiati almeno a 2 diluizioni e ciascuna diluizione dovrebbe essere saggiata 2 volte), anche

- 2 pozzetti per il Bianco: assorbanza del reagente di Ellman che dovrà poi essere sottratto a tutti gli altri valori

- 2 pozzetti per il “Legame non specifico”: legame non immunologico del tracer al pozzetto
- 2 pozzetti per il “Massimo di legame” (B_0): la massima quantità di tracer che l'anticorpo può legare in assenza di analita libero
- 1 pozzetto per l' “Attività totale” (TA): l'attività enzimatica totale del tracer legato all'AChE
- 16 pozzetti per gli 8 punti della “Curva standard” (saggiati in doppio): che permettono di disegnare un grafico di valori $\%B/B_0$ contro le diverse concentrazioni note dello standard, dove $\%B/B_0$ indica il rapporto tra l'assorbanza delle diverse concentrazioni note dello standard e l'assorbanza del “ B_0 ”.

Materiali e Metodi

-Materiali:

la linea cellulare K562 di leucemia umana è stata fornita dall'Ospedale Policlinico di Palermo. Le linee cellulari NCI-H460 (tumore solido al polmone), e HT29 (tumore al colon retto) sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia.

-Metodi:

- Colture cellulari Le cellule K562 sono state cresciute in fiasche da 75cm² con terreno RPM11640 supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina,

100µg/ml streptomicina - ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.

- Le cellule NCI-H460 e HT-29 sono state cresciute su monostrato in fiasche da 75cm² con terreno Minimum Essential Medium-Eagle (MEM) supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomicina-ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.

- Le sostanze sintetizzate da saggiare sono state disciolte in DMSO per avere una concentrazione finale 10mM.

Saggi di proliferazione cellulare

- Le cellule K562 sono state cresciute in micropiastre da 24 pozzetti aggiungendo 1ml di terreno completo contenente 2x10⁵ cellule in assenza e in presenza di inibitori. Gli effetti delle sostanze sulla crescita e vitalità delle cellule sono saggiati su una porzione della sospensione cellulare (100µl). Il numero delle cellule è stato determinato con un emocitometro (camera di Bürker) e la vitalità è stata stimata mediante esclusione del trypan blu.

- I saggi sulla proliferazione delle cellule NCI-H460 e HT-29 invece, sono stati condotti su piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C ad una concentrazione 2x10⁴ cell/pozzetto (in 100µl). Dopo 2 giorni il terreno viene sostituito da MEM privo di rosso fenolo (che potrebbe alterare la lettura dello

spettrofotometro) e vengono aggiunti i presunti inibitori (alla concentrazione $10\mu\text{M}$). Dopo 48h di incubazione a 37°C si aggiunge l'MTT (5mg/ml) a ciascun pozzetto; 4h dopo il formazano prodotto dalle cellule vive viene risospeso in una soluzione di isopropanolo, tritonX-100, HCl 37% ($4,5\text{ml}$ - $0,5\text{ml}$ - $150\mu\text{l}$ rispettivamente); la densità ottica ($\text{OD}_{570-690}$) viene quindi paragonata ai pozzetti controllo per saggiare la vitalità cellulare.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti e in particolare quelli relativi al prodotto **6g** (X = 2-tienilo), più attivo dell'ibuprofene, si evince che la sostituzione del gruppo acido propionico con il gruppo metilsolfonico porta vantaggi per l'attività antiinfiammatoria (tabella 1). Inoltre alcuni di questi nuovi derivati (**6c**, **6i**, **14**, **17a** e **17d**) presentano una ottima selettività per le COX-2 (Tabella 2).

Dal confronto delle nuove entità chimiche sintetizzate si può sostenere che la presenza della subunità *N*-fenil-pirrolo apporta una maggiore citotossicità rispetto ad altri composti caratterizzati dalla presenza di anelli aromatici differenti. Inoltre, i risultati dimostrano che il derivato **6d** che ha il gruppo para-metil-sulfonil-benzoico nel C-2 dell'anello pirrolico manifesta una maggiore attività contro le linee cellulari HT-29 rispetto al suo isomero di posizione **6e**: quest'ultimo, mostra un'interessante inibizione di crescita sulla linea cellulare NCI-H460. L'attività citotossica, alle concentrazioni testate non sembra sufficiente ad inibire la proliferazione delle cellule del cancro, ma nel caso di un effetto tempo-dipendente, questi composti potrebbero concentrarsi nel tessuto tumorale esercitando effetti cumulativi. Studi clinici

indicano che il celecoxib causa una riduzione della crescita di polipi alla dose di 400 mg b.i.d mentre questo effetto è risultato trascurabile alla concentrazione di 100 mg b.i.d. e il rofecoxib non ha mostrato attività antitumorale nemmeno a dosi relativamente elevate.

Studi preliminari di modellistica molecolare risultano interessanti e degni di ulteriore approfondimento per uno studio S.A.R. più ampio, finalizzato alla progettazione e alla sintesi di analoghi strutturali più attivi, come farmaci antiinfiammatori con ridotte gastro- e nefrotossicità.

BIBLIOGRAFIA:

1. Smith W.L., Marnet L.J., *Biochim. Biophys. Act.* **1083**, 1-17 (1991).
2. Vane J.R. *Nature (New Biol.)* **231**,232-239 (1971).
3. Xie W., Chipman J.G, Robertson D.L., Erikson R.S., Simmons D.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2692-2696 (1991).
4. Proc. Amer. Assoc. Cancer res. **2004**, 45, (Ibuprofen HT-29)
5. Arber, N.; Levin, B. *Gastroenterology* **2008**, 134, 1224-1237.
6. Chen, L.; He, Y.; Huang, H.; Liao, H.; Wei, W. *Medical Oncology* **2008**, 25, 161-171.
7. Thun, M. J.; Henley, S. J.; Pairono, C. J. *National Cancer Institute* **2002**, 94, 252-266.
8. Soh, J.-W.; Kazi, J. V.; Li, H.; Thompson, W. J.; Weinstein, B. *Mol. Carcinogenesis* **2008**, 47, 519-525.
9. Plescia S.; Raffa D.; Plesia F.; Casula G.; Maggio B.; Daidone G.; Raimindi M.V.; Cusimano M.G.; Bombieri G.; Meneghetti F. *Arkivoc* **2010**, (x),163-177.
10. Harrak Y.; Casula G.; Basset J.; Rossel G.; Plescia S.; Raffa D.; Cusimano M.G.; Pouplana

- R.; Pujol M.D. *J. Med. Chem.*. **2010**, 53, 6560-6571.
11. B. Maggio, G. Daidone, D. Raffa, S. Plescia, L. Mantione, V.M.C. Cutuli, N.G. Mangano, A. Caruso *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, 36, 737-742.
 12. G. Daidone, D. Raffa, B. Maggio, F. Plescia, V.C.M. Cutuli, N.G. Mangano, A. Caruso *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **332**, 50-54 (1999).
 13. G. Daidone, B. Maggio, S. Plescia, D. Raffa, D. Schillaci, O. Migliora, A. Caruso, V.M.C. Cutuli, M. Amico-Roxas *Il Farmaco* **53**, 350-356 (1998).
 14. Varsha Jatav, Pradeep Mishra, Sushil Kashaw, J.P. Stables. *Eur. J. Med. Chem.*, **43**, 135-141 (2008).
 15. Vassilios Bavetsias, Elisa A. Henderson, Edward McDonald *Tetrahedron*, **63**, 1537-1543 (2007).
 16. Sarah T. Al-Rashood, Ihsan A. Aboldahab, Mahmoud N. Nagi, Laila A. Abouzeid, Alaa A.M. Abdel-Aziz, Sami G. Abdel-hamide, Khairia M. Youssef, Abdulrahman M. Al-Obaid, Hussein I. El-Subbagh. *Bioorg. & Med. Chem.*, **14**, 8608-8621 (2006).
 17. D. Raffa, M. C. Edler, G. Daidone, B. Maggio, M. Merickeh, S. Plescia, D. Schillaci, R. Bai, E. Hamel. *Eur. J. Med. Chem.*, **39**, 299-304 (2004).
 18. D. Raffa, G. Daidone, B. Maggio, S. Cascioferro, F. Plescia, D. Schillaci. *Il Farmaco*, **59**, 215-221 (2004).
 19. D. Raffa, G. Daidone, B. Maggio, S. Cascioferro, F. Plescia, D. Schillaci. *Il Farmaco*, **59**, 451-455 (2004).

20. W. J. Watkins, L. Chong, A. Cho, R. Hilgenkamp, M. Ludwikow, N. Garizi, N. Iqbal, J. Barnard, R. Singh, D. Madsen, K. Lolans, O. Lomovskaya, U. Oza, P. Kumaraswamy, A. Blecken, S. Bai, D. J. Loury, D. C. Griffith, M. N. Dudley *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 2802-2806 (2007).
21. W. J. Watkins, R. C. Lemoine, L. Chong, A. Cho, T. E. Renau, B. Kuo, V. Wong, M. Ludwikow, N. Garizi, N. Iqbal, J. Barnard, R. Jankowska, R. Singh, D. Madsen, K. Lolans, O. Lomovskaya, U. Oza, M. N. Dudley, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**, 5133-5137 (2004).
22. D. Raffa, G. Daidone, S. Plescia, D. Schillaci. *Pharmazie*, **46**, H.9 (1991).
23. Laddha, S. S.; Wadodkar S. G.; Meghal, S. K. *Arkivoc*, (**xi**), 1-20 (2006).
24. Raffa, D.; Daidone, G.; Maggio, B.; Schillaci, D.; Plescia, F. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **332**, 317-320 (1999).
25. Sprio, V.; Plescia, S. *J. Heterocyclic Chemistry*, **9**, 951 (1972)
26. Ceraulo L., Agozino P., Ferruggia M., Rainieri R. *Trends in Heterocyclic Chemistry* **4** (1995) 115-134.
27. Ceraulo L., Di Stefano V., Ferruggia M., Ludànil K., Segreto S., Vékey K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001) 433-439.
28. Chichibabin A. E. & Jeleysky N. P. *Chem. Ber.* **57** (1924) 1158.

29. Ceraulo L., Plescia S., Daidone G., Bajardi M.L. *J. Heterocyclic Chem.* **21** (1984) 1209-1213.
30. Agozzino P., Ceraulo L., Ferruggia M., Rainieri R., *Journal of Mass Spectrometry* **31** (1996) 1441-1442.
31. Casula G., Ceraulo L., Ferruggia M., Filizzola F., Plescia S. *Atti del Convegno 5th MS-Pharmaday 2008*, GSK Verona **P03**.
32. Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr-Doss D. *Oncology Reports* **2004**, *13*, 559-583.
33. Capilla, A.S.; Pujol, M.D. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1729-1738. (*Lithium derivatives*).
34. Vázquez, M.T.; Rosell, G.; Pujol. M.D. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 529-534, and references cited herein.
35. Hamdouchi, C.; de Blas, J.; Ezquerra, J. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 541-552.
36. Lindley, J. *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 1433-1438.
37. Romero, M.; Harrak, Y.; Basset, J.; Ginet, L.; Constans, P.; Pujol, M.D. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 9010-9016.
38. Waskewich C., *et al.* *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2029-2033.
39. Giles F.J., *et al.*: *Br. J. Haematol.* **2002**, *119*, 38-45.
40. Cianchi F., *et al.* *Clinical Cancer Research* **2004**, *10*, 2694-2704.
41. Shin Y.K., *et al.* *Cancer. Res.* **2005**, *65*, 9501-9509.