



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE MOLECOLARI E BIOMOLECOLARI (STEMBIO)

- SEZIONE DI CHIMICA FARMACEUTICA E BIOLOGICA -

DOTTORATO IN SCIENZE FARMACEUTICHE

PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI DERIVATI ETEROCICLICI CHE INTERFERISCONO CON IL CICLO CELLULARE

SSD CHIM/08-CHIMICA FARMACEUTICA

TESI DI DOTTORATO DELLA
DOTT.^{ssa} ANNA CAROLLO

COORDINATORE DEL DOTTORATO
CH.MO PROF. GIROLAMO CIRRINCIONE

TUTOR
CH.MO PROF. DEMETRIO RAFFA

BANDO A.A. 2008-2009 XXIII CICLO - ANNO ACCADEMICO 2009-2011

DOTTORATO



INDICE

- 1. INTRODUZIONE**
- 2. RISULTATI E DISCUSSIONI**
 - 2.1 CHIMICA**
 - 2.2 BIOLOGIA**
- 3. CONCLUSIONI**
- 4. PARTE SPERIMENTALE**
 - 4.1 CHIMICA**
 - 4.2 BIOLOGIA**
- 5. BIBLIOGRAFIA**

1. INTRODUZIONE

La ricerca di nuovi farmaci antitumorali è sempre molto attiva. Questo è dovuto ai limiti dei farmaci antitumorali attualmente disponibili che, sebbene numerosi, presentano spesso l'inconveniente di indurre farmaco resistenza e di provocare gravi effetti collaterali per l'insufficiente selettività verso le cellule tumorali.

Allo scopo di ottenere nuove molecole in grado di superare questi limiti, la ricerca è attualmente indirizzata verso la scoperta di nuovi bersagli molecolari la cui attivazione e/o disattivazione da parte di piccole molecole organiche possa portare alla distruzione selettiva delle cellule tumorali senza colpire cellule sane.

Un potenziale bersaglio per la ricerca di nuovi farmaci antitumorali è rappresentato dall'inibizione della polimerizzazione dei microtubuli.

I microtubuli sono organelli citoplasmatici coinvolti in numerose funzioni fisiologiche, quali il trasporto intracellulare, la secrezione, il movimento ciliare o flagellare, la mobilità e il mantenimento della forma cellulare. Tra le varie funzioni del microtubulo di cruciale importanza è il loro coinvolgimento nel processo della divisione mitotica della cellula stessa. Essi, infatti, partecipano alla formazione del fuso mitotico, si legano ai cromosomi e mediante una loro contrazione separano i due genomi destinati alle cellule figlie prima che si concluda la mitosi cellulare. A seconda del ruolo svolto, queste strutture si distinguono in elementi stabili e labili; i microtubuli citoplasmatici e quelli che costituiscono il fuso mitotico sono labili, mentre quelli che si organizzano a formare ciglia e flagelli sono stabili e molto più resistenti.

In particolare, nel fuso mitotico la caratteristica labilità rende possibile un continuo assemblamento e disassemblamento che genera un movimento in grado di fare migrare i cromosomi durante la divisione cellulare ripartendo quindi il DNA duplicato tra le due cellule figlie. La componente principale dei microtubuli è una proteina eterodimerica

denominata tubulina, formata da due subunità strutturalmente correlate, dette α e β , ciascuna delle quali raggiunge un peso molecolare di 55 KDa [1].

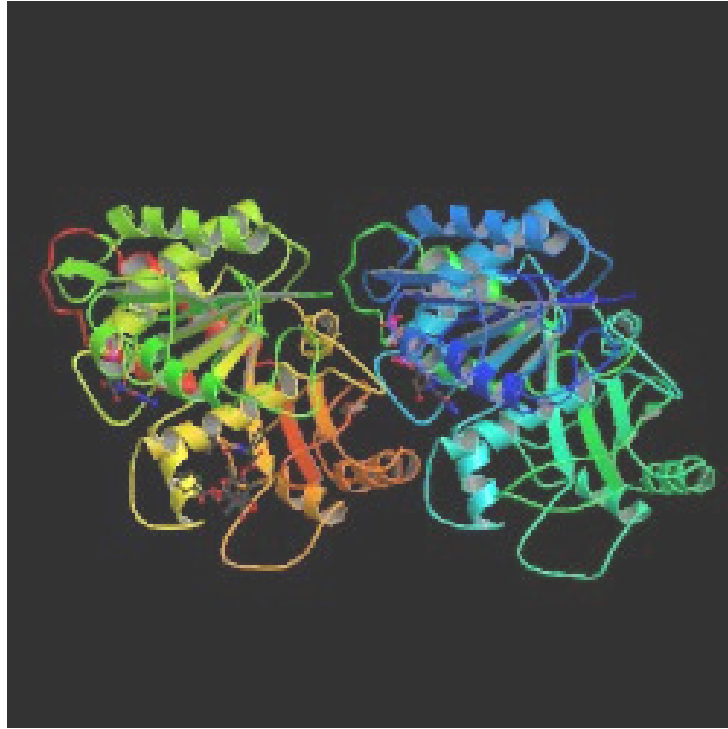


Figura 1

Ogni singolo microtubulo è composto da 13 filamenti ciascuno dei quali formato da una catena di unità di tubulina organizzata a costituire dei tubuli del diametro di 25 nm, lunghi parecchi micron e con una parete di spessore pari 6 nm (figura 1). Entrambe le subunità, α e β della tubulina, contengono un sito di legame per il GTP, denominato rispettivamente sito N e sito E. Dei due siti, solo il sito E è in grado di scambiare velocemente il GTP legato con quello libero in soluzione. Durante il processo di polimerizzazione, quando la tubulina è incorporata nel microtubulo, la molecola di GTP legata al sito E viene idrolizzata a GDP. La molecola di GDP legata al sito E della tubulina rende quest'ultima incapace di rimanere legata al microtubulo, determinandone il distacco.

Quindi il microtubulo si allunga dal lato in cui è presente il GTP che è detto lato + e si accorcia dall'altro lato che viene detto lato - [2,3] (figura 2).

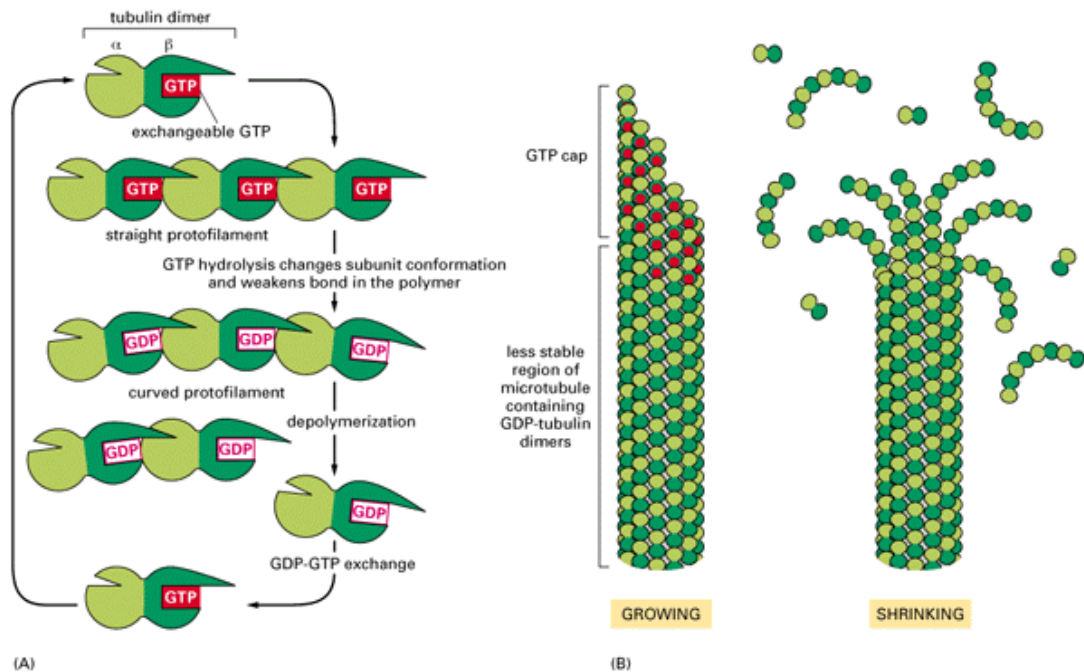
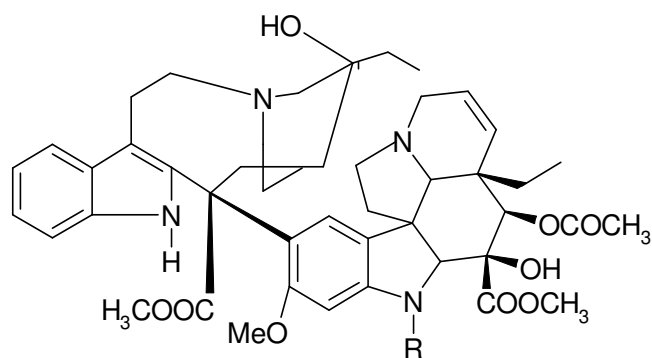
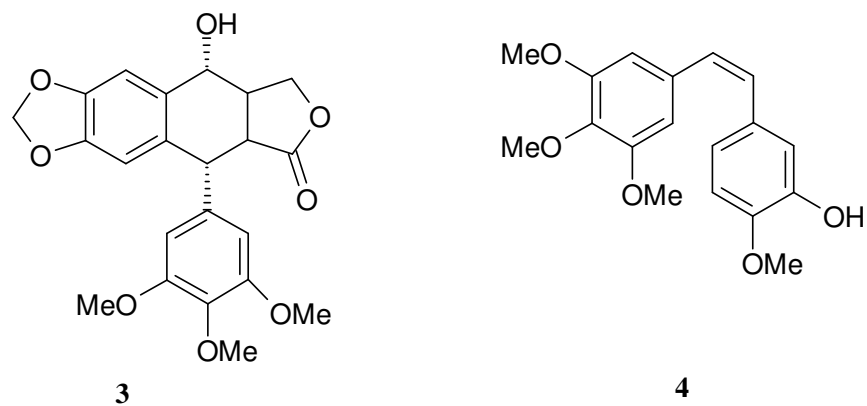
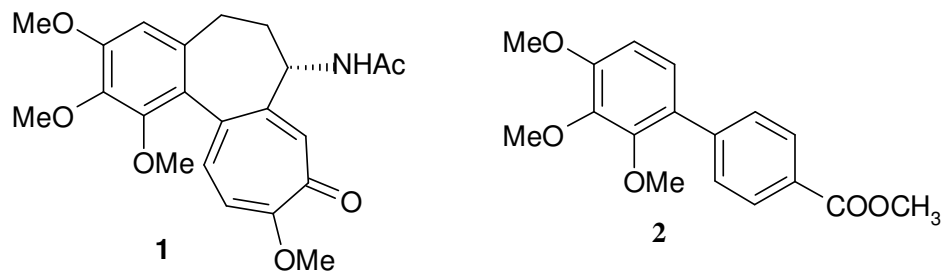


Figura 2

Gli agenti antimitotici sono in grado di legarsi alla tubulina in maniera altamente specifica, interferendo con il processo di polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli. Questa interferenza si ripercuote nella cellula durante il processo mitotico, in quanto il fuso mitotico non è più in grado di spingere i cromatidi fratelli verso i poli opposti della cellula arrestando la divisione allo stato di metafase.

Colchicina **1**, 2,3,4-trimetossi-4'-carbametossi-1-1'-difenile (TBC) **2**, podofillotossina **3**, combretastatina A-4 **4**, Vinblastina **5** e Vincristina **6** sono molecole note di origine naturale, semisintetica o sintetica, in grado di legarsi alla tubulina in un sito comune inibendo la polimerizzazione di tale proteina e destabilizzando pertanto la struttura dei microtubuli (figura 3).



5 VINBLASTINA R=CH₃

6 VINCRISTINA R=CHO

Figura 3

Tutti questi avvelenatori del fuso mitotico, benché strutturalmente molto differenti, condividono una caratteristica comune rappresentata da un sistema a ponte biarilico. All'interno della loro struttura, infatti, sono comunque presenti due sistemi aromatici o eteroaromatici variamente

sostituiti direttamente legati tra loro o separati da una catena lunga da due a quattro atomi di carbonio, in modo da trovarsi vicini nello spazio ma non coplanari [4] (figura 4).

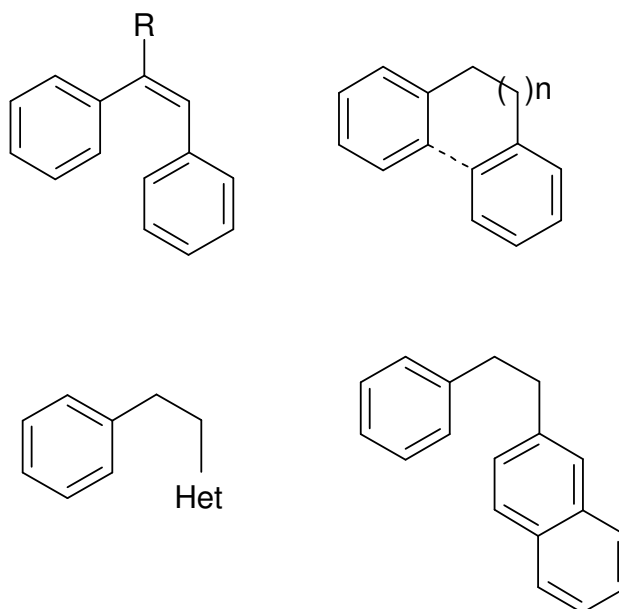


Figura 4

Tra le molecole che contengono la caratteristica strutturale comune agli agenti antimitotici inibitori della polimerizzazione della tubulina è possibile annoverare anche i derivati 2-stirilchinazolinonici **7** (figura 5), oggetto di studio presso i nostri laboratori [5-7], per i quali è stata descritta la sintesi e le attività antiproliferativa attraverso un'inibizione della polimerizzazione della tubulina.

A parte la struttura 2-stirilchinazolinonica, anche numerosi suoi precursori sintetici condividono la caratteristica comune agli agenti antimitotici rappresentata da un sistema a ponte biarilico [4] e per tale motivo sono stati oggetto d'interesse quali potenziali agenti antiproliferativi inibitori della polimerizzazione della tubulina.

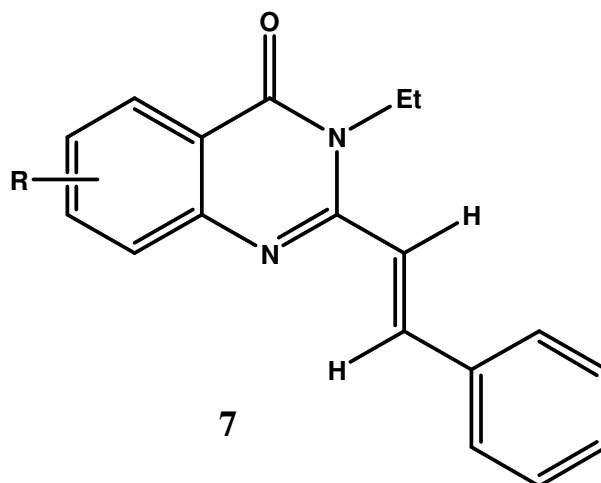


Figura 5

Per tale motivo è stato intrapreso un programma di screening indirizzato all'individuazione di nuove molecole ad attività antiproliferativa. In particolare, tra un set di precursori sintetici presenti presso i nostri laboratori è stato scoperto che la 2-cinnamido-5-iodobenzamide **8** inibisce del 74% la proliferazione della linea cellulare leucemica K-562 alla concentrazione di 10 μ M (figura 6).

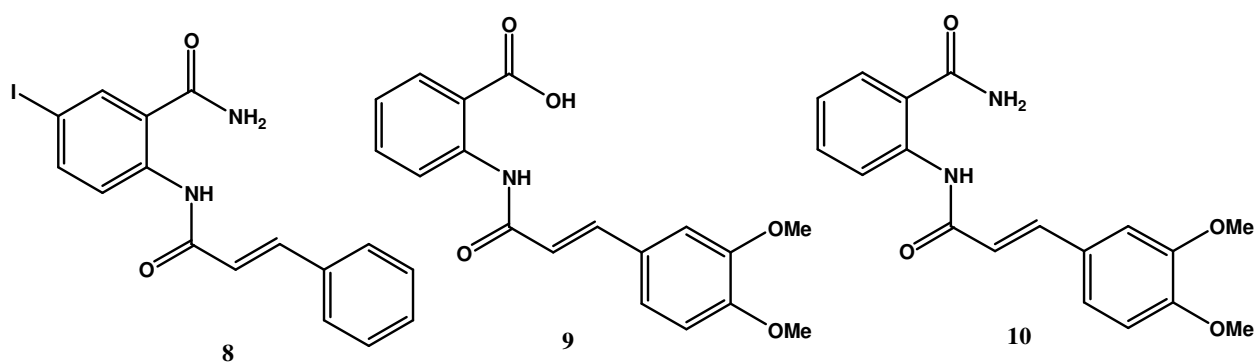


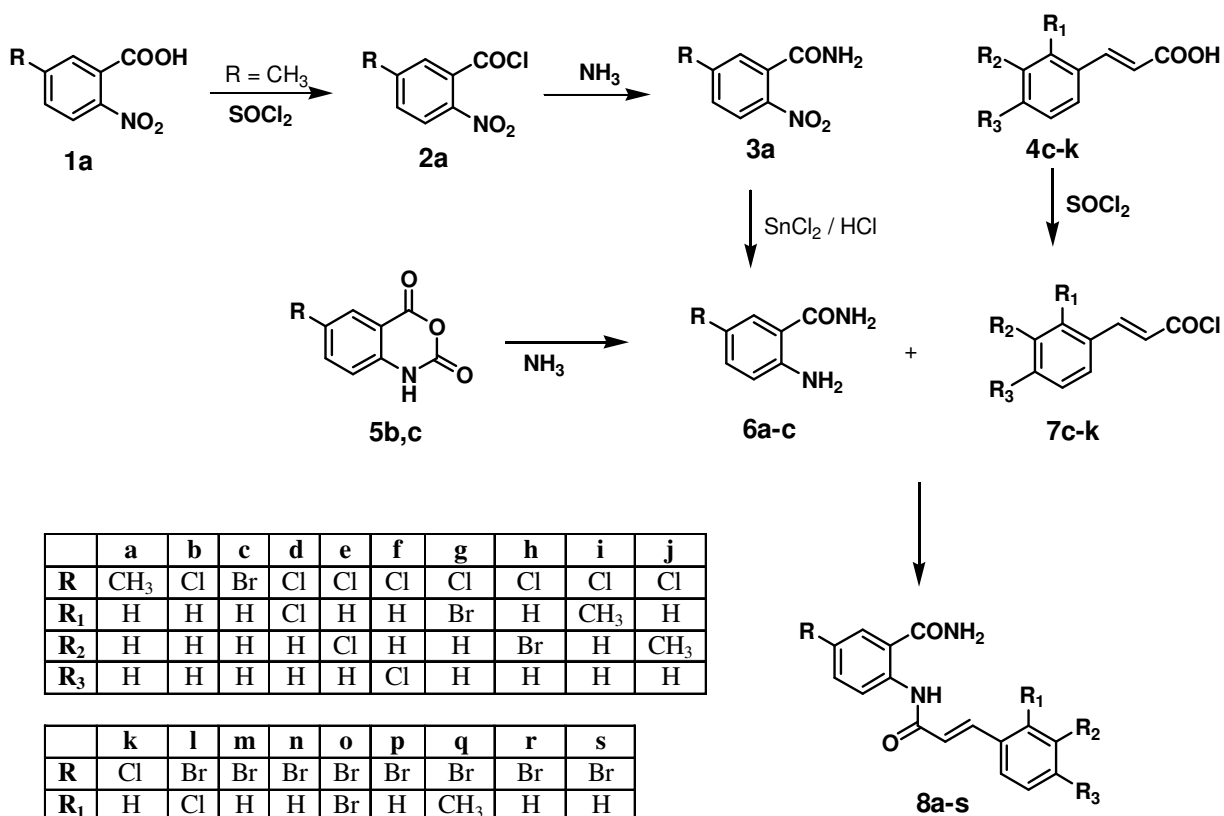
Figura 6. Struttura dei cinnamoilantranilati.

Il composto **8** appartiene alla classe dei cinnamoilantranilati, che rappresentano una classe di sostanze biologicamente attive di grande rilevanza in chimica farmaceutica, tra cui degni di nota sono il Tranilast

(Rizaben[®]) **9** ed il suo derivato (*E*)-2-(3-(3,4-dimetossifenil)acrilamido)benzamide **10** [8].

Altre attività biologiche possedute da questa classe di composti sono proprietà antifibrotiche ed antiinfiammatorie [9,10] nonché inibizione del pterygium corneale e dello sviluppo di vasi sanguigni [11,12]. Infine, i cinnamoilantranilati sono utili nella prevenzione e nel trattamento delle malattie glomerulari e di quelle causate da un'eccessiva proliferazione delle cellule vascolari dell'intima [13].

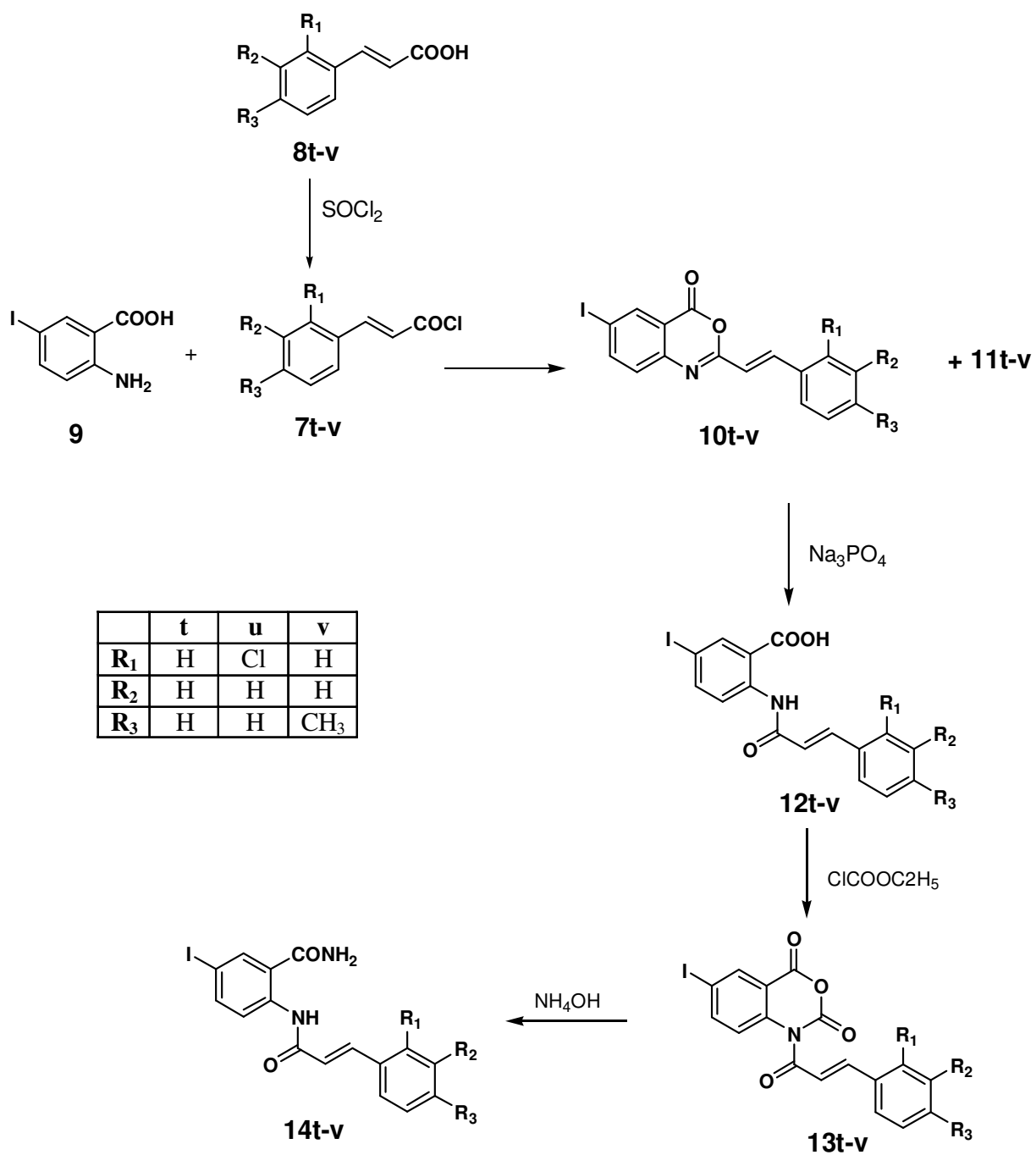
Comunque, nonostante il loro ampio range di attività biologiche, in letteratura non sono riportati esempi di cinnamoilantranilati ad attività antitumorale. Quindi, considerando la capacità del derivato **1** di inibire la proliferazione delle cellule K-562 sono stati sintetizzati presso i nostri laboratori (schemi 1 e 2) e saggiati per la loro attività antiproliferativa i nuovi cinnamoilantranilati **8a-s** e **14t-v** [14].



	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
R	CH ₃	Cl	Br	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl
R₁	H	H	H	Cl	H	H	Br	H	CH ₃	H
R₂	H	H	H	H	Cl	H	H	Br	H	CH ₃
R₃	H	H	H	H	H	Cl	H	H	H	H

	k	l	m	n	o	p	q	r	s
R	Cl	Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br
R₁	H	Cl	H	H	Br	H	CH ₃	H	H
R₂	H	H	Cl	H	H	Br	H	CH ₃	H
R₃	CH ₃	H	H	Cl	H	H	H	H	CH ₃

Schema 1.



Scheme 2.

I composti **8a**, **8b**, **8c**, **14t** e **14u** sono stati scelti dall'NCI e saggati per la loro attività antiproliferativa nei confronti dell'intero pannello di linee cellulari derivati da nove tipi di cancro (leucemia, cancro polmonare a cellule non piccole, cancro al colon, cancro del SNC, melanoma, cancro ovarico, cancro renale, cancro alla prostata e cancro della mammella) (tabella 1).

Tabella 1. Attività antitumorale *in vitro* dei composti **8a-c** e **14t,u**^a.

Comp	no. Studied ^c	pGI50 ^b			pTGI ^e			pLC50 ^d		
		no. giving positive results ^e	range	MG_MID ^f	no. giving positive results ^e	range	MG_MID ^f	no. giving positive results ^e	Range	MG_MID ^f
8a	58	58	6.18-4.59	5.36	30	5.53-4.00	4.31	2	4.44-4.00	4.01
8b	58	58	6.58-4.82	5.65	29	6.06-4.00	4.53	7	5.19-4.00	4.06
8c	52	52	6.64-5.47	5.99	23	6.18-4.00	4.58	10	5.02-4.00	4.07
14t	59	59	7.27-4.67	6.05	44	6.41-4.00	4.71	17	4.94-4.00	4.10
14u	57	57	6.78-4.41	5.97	32	6.17-4.00	4.62	8	4.90-4.00	4.05

^a Dati *in vitro* ottenuti dallo screening disease-oriented human tumor cells screen effettuato dall'NCI. ^b pGI50 è il logaritmo negativo della concentrazione molare che inibisce il 50% della crescita cellulare netta. ^c pTGI è il logaritmo negativo della concentrazione molare che induce la totale inibizione della crescita. ^d pLC50 è il logaritmo negativo della concentrazione molare che induce il 50% della morte cellulare netta. ^e Si riferisce al numero delle linee cellulari. ^f MG_MID = mean graph midpoint = valore aritmetico medio per tutte le linee cellulari tumorali testate. Se il valore indicato non era compreso all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato, è stata usata la più alta concentrazione testata per il calcolo.

L'analisi COMPARE, gli effetti sulla polimerizzazione della tubulina sia nelle cellule che sulla tubulina purificata nonché gli effetti sulla distribuzione del ciclo cellulare sul composto **14t**, risultato il più attivo della serie, indicano che questi nuovi agenti antiproliferativi agiscono inibendo la polimerizzazione della tubulina.

In particolare, attraverso immunofluorescenza sono stati esaminati gli effetti di **14t** sui microtubuli (tubulina) e sui microfilamenti (actina) nelle cellule PtK2. Come mostra la figura 7, i microtubuli scompaiono mentre i microfilamenti persistono a concentrazioni micromolari di **14t**. In aggiunta, è stato evidenziato come **14t** inibisca parzialmente la polimerizzazione della tubulina purificata alla concentrazione di 10 µM.

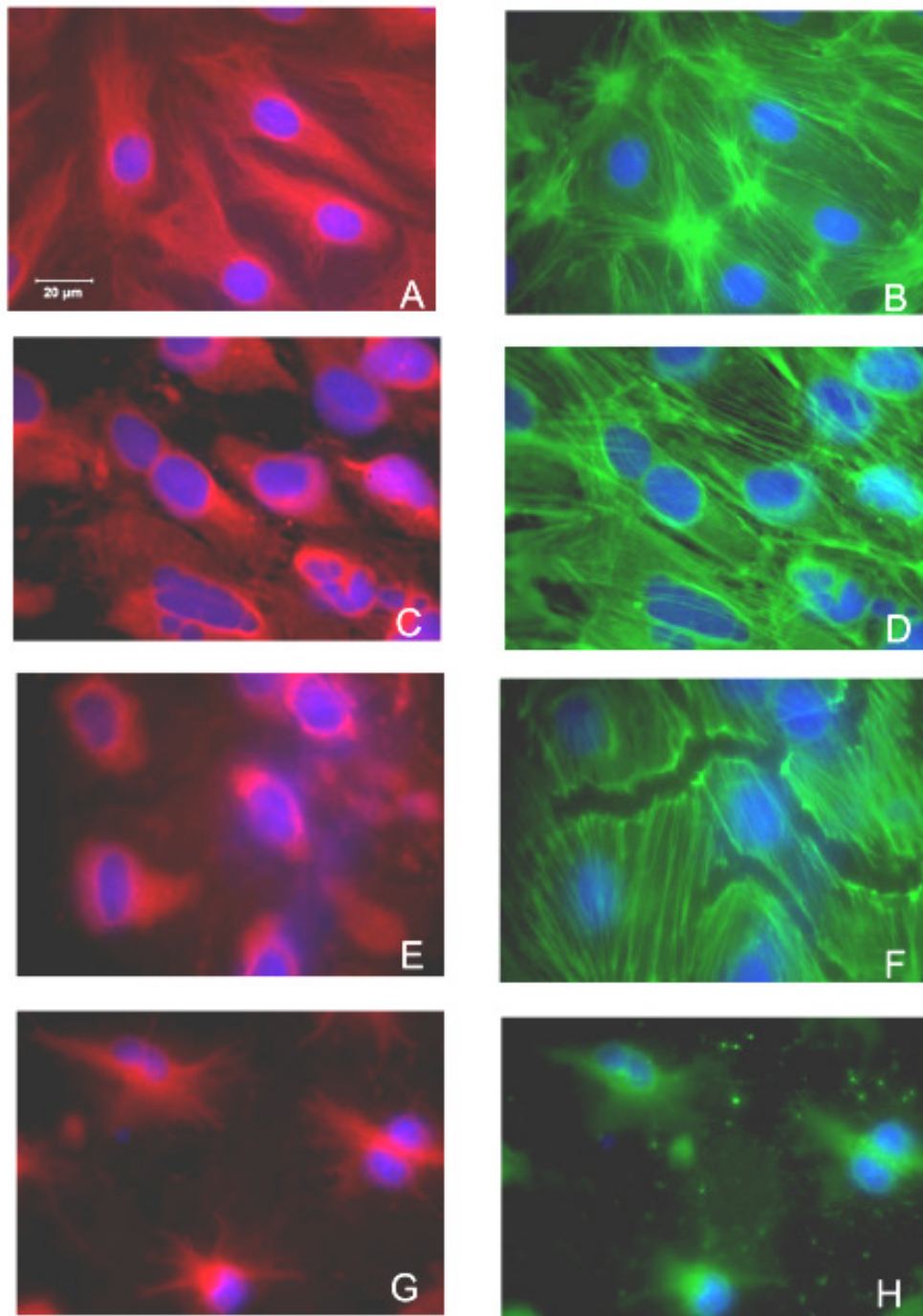


Figura 7. Pannelli A, C, E, e G, cellule PtK2 colorate per la tubulina con un anticorpo β -tubulina coniugato alla Cy3. Pannelli B, D, F, e H, cellule PtK2 colorate per l'actina con un anticorpo β -actina coniugato alla FTIC. A e B, cellule non trattate. C e D, cellule trattate con $10 \mu\text{M}$ di **14t**. E e F, cellule trattate con $1 \mu\text{M}$ di combretastatina A-4 (un potente farmaco antitubulinico). G e H, cellule trattate con $1 \mu\text{M}$ di latrunculina A (un potente inibitore dell'assemblaggio dell'actina).

Alla luce di tali risultati, oggetto del mio lavoro di tesi è stata l'estensione della serie con la sintesi di nuovi derivati modificati rispetto ai derivati **8** e **14** secondo lo schema riportato in figura 8 allo scopo di individuare i migliori sostituenti da inserire nelle molecole per migliorare l'attività antiproliferativa.

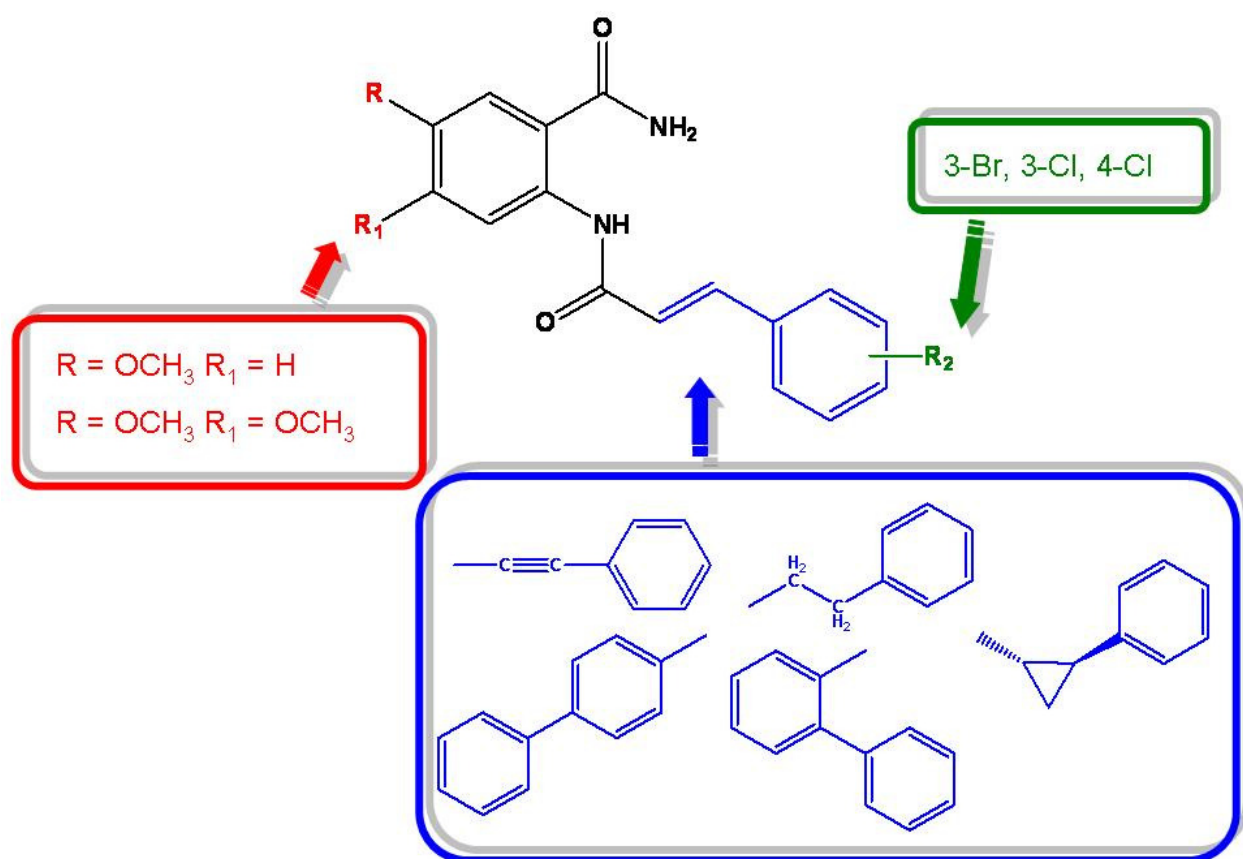


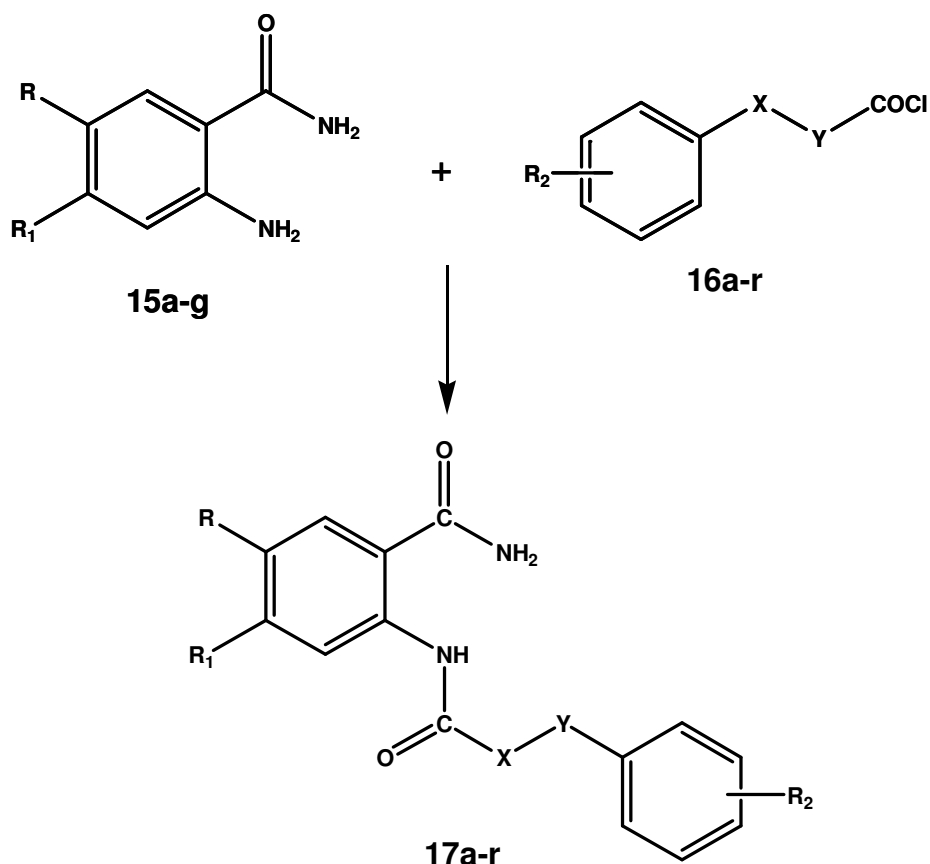
Figura 8

In particolare, come evidenziato in figura 8, sono state effettuate le seguenti modifiche strutturali: introduzione dei sostituenti 3-bromo, 3-cloro e 4-cloro sul nucleo cinnamammidico, introduzione dei sostituenti 5-metossi e 4,5-dimetossi sul nucleo benzammidico, sostituzione del legame olefinico con i gruppi etilico, etinico, ciclopropilico, sostituzione del gruppo stirilico con quello 2-bifenilico e 4-bifenilico.

2. RISULTATI E DISCUSSIONI

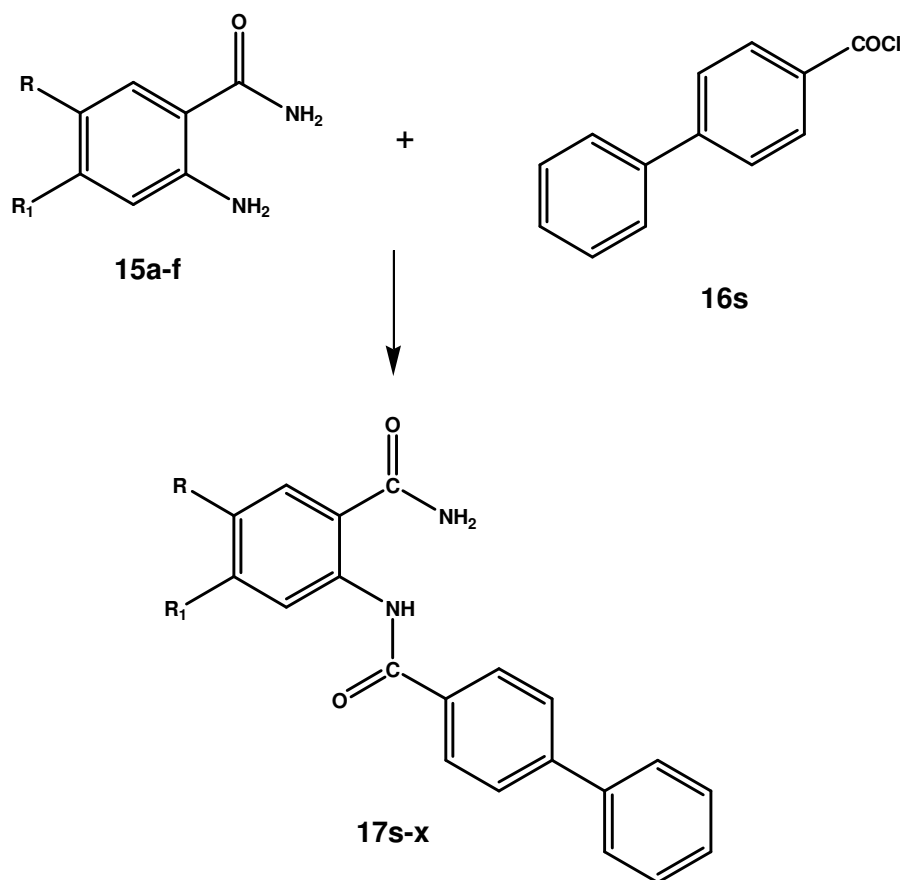
2.1 CHIMICA

La sintesi dei derivati benzamidici **17a-x** è stata ottenuta secondo quanto riportato negli schemi 3, 4 ponendo sotto agitazione magnetica in bagno di ghiaccio una miscela dell'opportuno cloruro acido **16a-s** con la 5-R-4-R₁-2-amminobenzamide **15a-f**.



15a R=H, R ₁ =H	16i R ₂ =H, X-Y =etinile	17e R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, X-Y= <i>t</i> -etenile
15b R=Cl, R ₁ =H	16j R ₂ =H, X-Y =etinile	17f R=H, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etinile
15c R=Br, R ₁ =H	16k R ₂ =H, X-Y =etinile	17g R=Cl, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etinile
15d R= CH ₃ , R ₁ =H	16l R ₂ =H, X-Y =etinile	17h R=Br, R ₁ =H, R ₂ =Br X-Y =etinile
15e R=I, R ₁ =H, R ₂ =H	16m R ₂ =H, X-Y =etile	17i R= CH ₃ , R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etinile
15f R=OCH ₃ , R ₁ =H	16n R ₂ =H, X-Y =etile	17j R=I, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etinile
15g R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃	16o R ₂ =H, X-Y =etile	17k R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, X-Y =etinile
16a R ₂ =3-Br, X-Y= <i>t</i> -etenile	16p R ₂ =H, X-Y =etile	17l R=I, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =t-ciclopropile
16b R ₂ =3-Cl, X-Y= <i>t</i> -etenile	16q R ₂ =H, X-Y =etile	17m R=H, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etile
16c R ₂ =4-Cl, X-Y= <i>t</i> -etenile	16r R ₂ =H, X-Y =etile	17n R=Cl, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etile
16d R ₂ =H, X-Y= <i>t</i> -etenile	17a R=I, R ₁ =H, R ₂ =3-Br, X-Y= <i>t</i> -etenile	17o R= CH ₃ , R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etile
16e R ₂ =H, X-Y= <i>t</i> -etenile	17b R=I, R ₁ =H, R ₂ =3-Cl, X-Y= <i>t</i> -etenile	17p R=I, R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etile
16f R ₂ =H, X-Y =etinile	17c R=I, R ₁ =H, R ₂ =4-Cl, X-Y= <i>t</i> -etenile	17q R=OCH ₃ , R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y =etile
16g R ₂ =H, X-Y =etinile	17d R=OCH ₃ , R ₁ =H, R ₂ =H, X-Y= <i>t</i> -etenile	17r R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, X-Y =etile
16h R ₂ =Br X-Y =etinile		

Schema 3

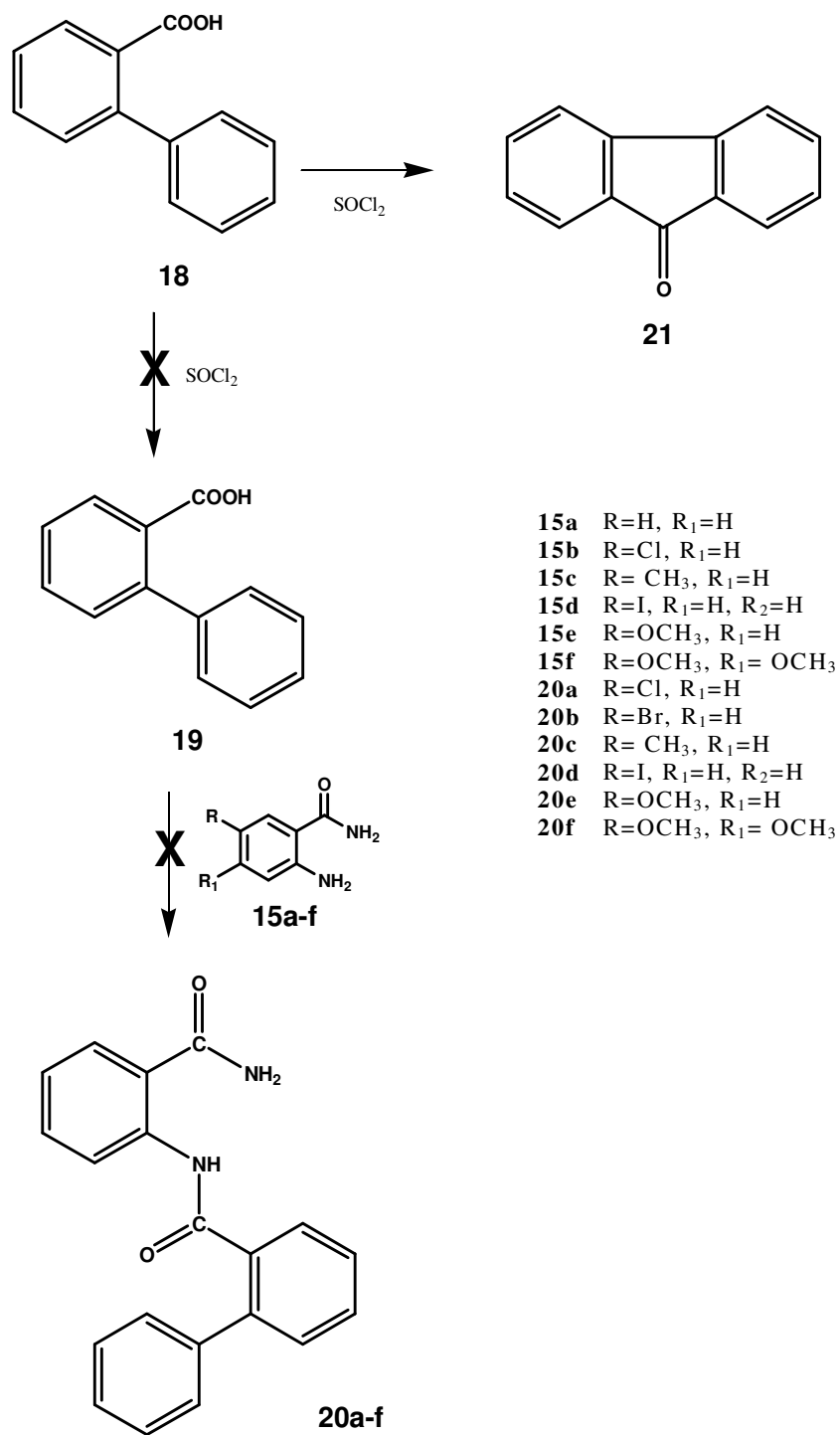


15a	R=H, R ₁ =H	17s	R=H, R ₁ =H
15b	R=Cl, R ₁ =H	17t	R=Cl, R ₁ =H,
15c	R= CH ₃ , R ₁ =H	17u	R= CH ₃ , R ₁ =H
15d	R=I, R ₁ =H, R ₂ =H	17v	R=I, R ₁ =H
15e	R=OCH ₃ , R ₁ =H	17w	R=OCH ₃ , R ₁ =H
15f	R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃	17x	R=OCH ₃ , R ₁ = OCH ₃

Schema 4

I cloruri **16a-s**, non disponibili commercialmente, sono stati ottenuti a partire dal corrispondente acido per trattamento con cloruro di tionile.

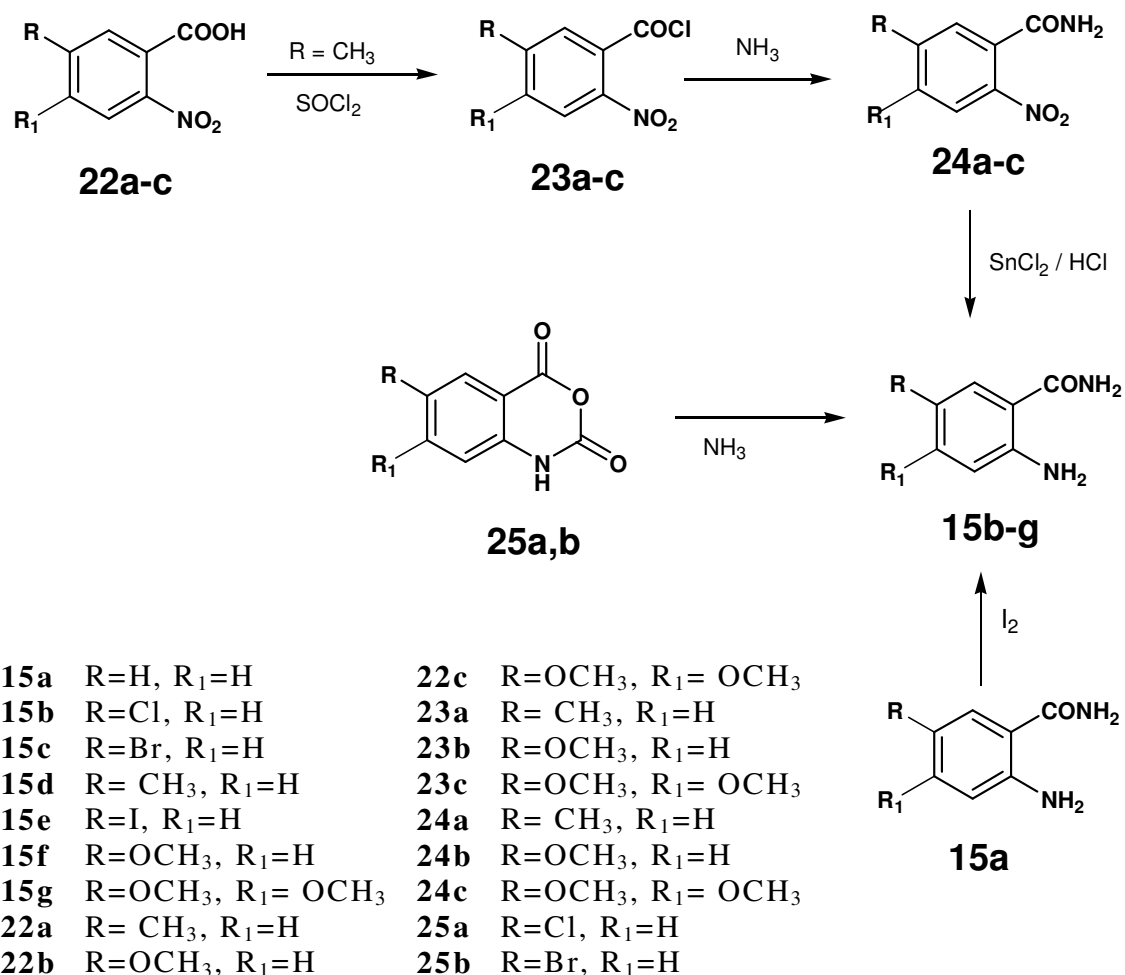
Il tentativo di ottenere i derivati N-(2-carbamoilfenil)bifenil-2-carbossamidici **20a-f** attraverso la reazione tra il cloruro dell'acido 2-bifenilico **19** con l'opportuna benzammide **15a-f** (schema 5) non è andato a buon fine.



Schema 5

Infatti, il trattamento con cloruro di tionile dell'acido **18** non ha prodotto il corrispondente cloruro **19** bensì il 9-fluorenone **21** [15].

L'antranilammide **15a** è disponibile commercialmente, mentre le 5-R-4R₁-2-amminobenzammidi **15b-g** sono state ottenute secondo lo schema 6.



Schema 6

In particolare, la 5-iodo-2-amminobenzammide **15e** è stata ottenuta, secondo quanto riportato in letteratura [16], per trattamento dell'antranilammide **15a** con iodio in soluzione acquosa di bicarbonato di sodio.

La 5-metilantranilammide **15d**, la 5-metossiantranilammide **15f** e la 4,5-dimetossiantranilammide **15g** sono state invece preparate per clorurazione

degli acidi 5-metil-2-nitrobenzoico **22a**, 5-metossi-2-nitrobenzoico **22b** e 4,5-dimetossi-2-nitrobenzoico **22c**, successiva trasformazione dei cloruri **23a-c** così ottenuti a 5-metil-2-nitroantranilamide **24a**, 5-metossi-2-nitroantranilammide **24b** e 4,5-dimetossi-2-nitroantranilammide **24c** e riduzione, infine, di quest'ultime con cloruro stannoso in acido cloridrico.

La 5-cloroantranilammide **15b**, la 5-bromoantranilammide **15c** sono state invece ottenute ponendo sotto agitazione a temperatura ambiente in ammoniacca acquosa (25%) i 2H-3,1-benzoxazin-2,4(1H)-dioni **25a,b** [17]. Le strutture dei nuovi composti sono state determinate attraverso tecniche analitiche e spettroscopiche.

In particolare, tutti i derivati **17a-x** hanno mostrato segnali relativi ai protoni aromatici nell'intervallo 6.18-8.77 δ ed un singoletto, scambiabile con D₂O, relativo al protone del gruppo NH nell'intervallo 11.00-13.43 δ . Differenti valori di chemical shift sono stati evidenziati per i segnali dei protoni relativi al gruppo NH₂ benzamidico in funzione del diverso solvente di registrazione dello spettro. Infatti, per i composti **17a-c,g-l,s-x**, il cui spettro ¹H-NMR è stato registrato in DMSO, tale segnale cade insieme con i segnali aromatici mentre, nel caso dei composti **17d,e,n-r**, registrati in CDCl₃, si nota uno sdoppiamento dei segnali relativi ai due protoni del gruppo NH₂ che cadono intorno a 5.84 e 6.29 δ rispettivamente. Inoltre per i derivati 5-metil, 5-metossi e 4,5-dimetossi sostituiti, si evidenziano segnali relativi ai gruppi metilici e metossilici a circa 2.30 δ e 3.84-3.99 δ rispettivamente.

Gli spettri ¹H-NMR dei composti **17a-e** sono in accordo con una struttura *trans*-olefinica. Essi hanno, infatti, mostrato segnali attribuibili ai protoni β -olefinici a 6.86-6.96 δ con costanti di accoppiamento di 15.6-15.9 Hz, come richiesto per una struttura di tipo *trans* [18], mentre gli idrogeni α -olefinici cadono insieme ai segnali aromatici.

Per quanto riguarda i derivati fenilpropiolammidici **17f-k** gli spettri IR hanno mostrato il caratteristico assorbimento intorno a 2210 cm⁻¹ relativo allo stretching del legame acetilenico. Lo spettro ¹H-NMR del composto **17l**

portante il gruppo ciclopropilico ha evidenziato la presenza di due multipletti a 1.51 δ e 1.98 δ attribuibili ai protoni del gruppo etilenico e due multipletti che cadono a 1.98 e 2.42 δ attribuibili ai due gruppi metinici del sistema ciclopropanico. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei composti **17m-r** sono infine in accordo con la presenza di una catena etilenica mostrando due tripletti intorno a 2.70 e 3.00 δ rispettivamente.

2.2 BIOLOGIA

L'attività antiproliferativa *in vitro* dei derivati **17a-x** è stata valutata in via preliminare nei confronti della linea cellulare K562 derivante da una leucemia mieloide cronica e della linea cellulare HEPG2 derivante da epatoblastoma umano (tabella 2).

Tabella 2. Attività antiproliferativa ed apoptotica dei composti **17a-x** alla concentrazione screening di 10 μ M.

Comp.	K562		HEP G2
	% inib. (10 μ M)	IC50 (μ M)	% inib. (10 μ M)
17a	ns	>10	31.5
17b	26.6	>10	25.0
17c	19.4	>10	27.9
17d	79.0	4.4	47.3
17e	40.7	>10	38.7
17f	80.0	0.4	62.8
17g	27.5	>10	56.6
17h	15.0	>10	45.2
17i	36.2	>10	34.3
17j	64.5	1.0	57.0
17k	59.5	3.2	31.2
17l	58.6	3.9	21.7
17m	ns	>10	39.7
17n	66.7	5.6	32.2
17o	25.7	>10	49.4
17p	37.8	>10	27.1
17q	55.8	8.0	46.2
17r	40.6	>10	39.5
17s	21.6	>10	35.2
17t	45.0	>10	58.9
17u	39.7	>10	76.3
17v	38.5	>10	31.8
17w	29.2	>10	72.5
17x	48.0	>10	68.9
colchicina	63.6	0.02	41.8

ns non significativo (% inibizione <10%)

I dati riportati in tabella 2 evidenziano come, tutti i derivati saggiati sono dotati di attività antiproliferativa a 10 μ M nei confronti delle due linee

cellulari con valori di inibizione compresi nell'intervallo 15.0-80.0% e 21.7-68.9% per le linee cellulari K562 e HEPG2 rispettivamente.

In particolare, sulle cellule K562 i derivati più attivi sono risultati **17d** ($IC_{50}=4.4 \mu M$), **17f** ($IC_{50}=0.4 \mu M$), **17j** ($IC_{50}=1.0 \mu M$), **17k** ($IC_{50}=3.2 \mu M$), **17l** ($IC_{50}=3.9 \mu M$), **17n** ($IC_{50}=5.6 \mu M$) e **17q** ($IC_{50}=8.0 \mu M$) seppure con attività inferiore a quella della colchicina presa come riferimento ($IC_{50}=0.02 \mu M$). I dati riportati in tabella 2 evidenziano come, nella serie delle cinnamamidobenzammidi, venga mantenuto l'andamento riscontrato nel precedente lavoro [14] ed in particolare la riduzione dell'attività in presenza di sostituenti sul nucleo cinnamamidico (**17a**, **17b**, **17c**). Inoltre, l'introduzione dei sostituenti 5-metossi (**17d**) e 4,5-dimetossi (**17e**) sul nucleo benzamidico porta a composti che mantengono l'attività antiproliferativa. Tra di essi, il derivato monosostituito (**17d**) presenta la maggiore attività ($IC_{50}=4.4 \mu M$) anche se inferiore all'analogo più attivo **14t** ($IC_{50}=0.57 \mu M$) della serie precedente [14].

Quando il doppio legame dei derivati **8** e **14** viene sostituito con un triplo legame si nota un analogo andamento in cui viene mantenuta l'attività antiproliferativa sui composti iodo (**17j**) e dimetossi (**17k**) sostituiti sul nucleo benzamidico (**17j** $IC_{50}=1.0 \mu M$ e **17k** $IC_{50}=3.2 \mu M$) anche se la migliore attività in questa serie è relativa al derivato non sostituito **17f** ($IC_{50}=0.4 \mu M$). Nel caso delle altre sostituzioni, l'introduzione di un gruppo etilico al posto del doppio legame o la sostituzione del gruppo stirilico con quello 4-bifenilico comporta una riduzione dell'attività.

Nel caso delle cellule HEPG2, i dati riportati in tabella 2 mostrano come buona parte dei composti tra quelli saggiati presentino attività antiproliferativa simile o superiore a quella della colchicina. In particolare, per i composti **17f** (62.8%, $IC_{50}=5.9 \mu M$), **17g** (56.6%), **17j** (57.0%), **17o** (49.4%), **17t** (58.9%), **17u** (76.3%) e **17x** (68.9%), si riscontrano valori di IC_{50} superiori a quello della colchicina (41.8%, $IC_{50}>10.0 \mu M$). A differenza della linea cellulare K562, le cellule HEPG2 risultano particolarmente

sensibili nei confronti dei composti **17s-x** in cui il gruppo stirilico è sostituito con quello 4-bifenilico.

Nel complesso, tra tutti i derivati saggiati, il derivato **17f** ha presentato il migliore profilo farmacologico risultando il più attivo in ambedue le linee cellulari ($IC_{50}=0.4 \mu M$ e $IC_{50}=5.9 \mu M$ sulle cellule K562 e HEPG2 rispettivamente).

Inoltre, sulla linea cellulare HEPG2 è stata valutata, presso i laboratori di Medicina Rigenerativa e Terapie Cellulari dell'Istituto Mediterraneo Trapianti e Terapie Alta Specializzazione (ISMETT), anche l'attività apoptotica dei composti **17a-x** attraverso l'analisi con annessina V. In particolare, nelle prime fasi dell'apoptosi, si verificano cambiamenti sulla superficie cellulare tra cui alterazioni della membrana plasmatica. Una di queste alterazioni è la traslocazione della fosfatidilserina, normalmente situata esclusivamente sul lato interno della membrana plasmatica, verso la superficie esterna della cellula. L'annexina V, una proteina che lega i fosfolipidi in maniera Ca^{2+} -dipendente, ha un'alta affinità per la fosfatidilserina che è esposta sullo strato esterno della membrana cellulare e può essere utilizzata come sonda sensibile (figura 9).

Tuttavia, a causa della perdita di integrità della membrana delle cellule necrotiche, l'annexina V può entrare nelle cellule legandosi alla fosfatidilserina che è esposta sullo strato interno della membrana cellulare.

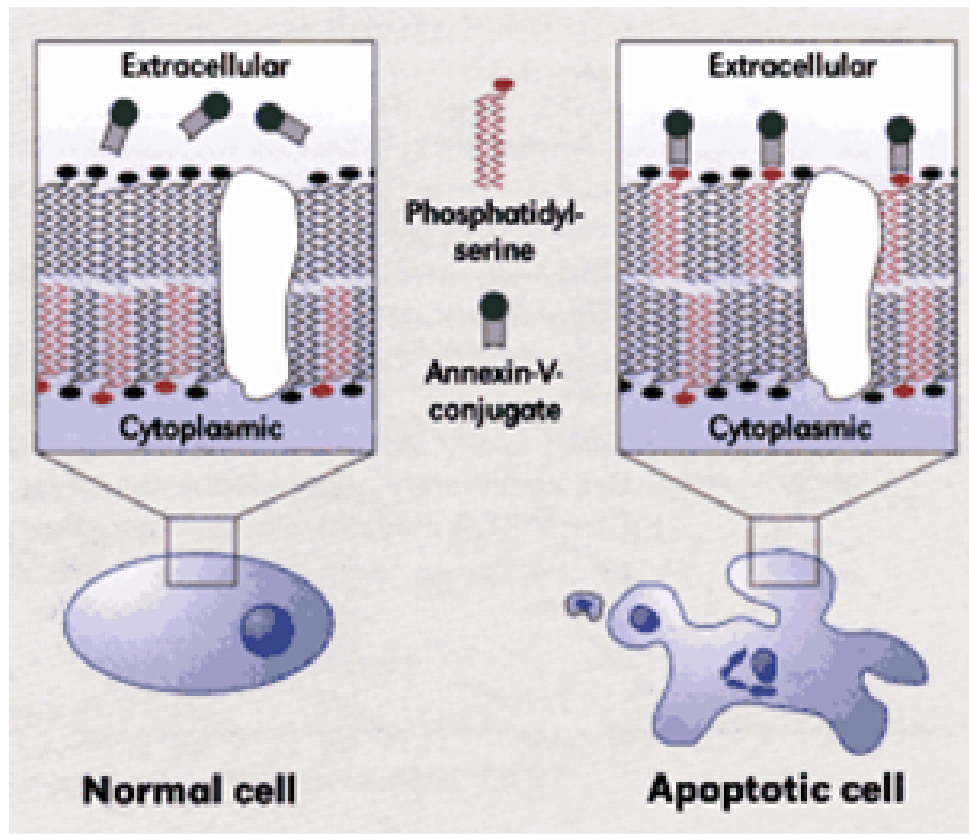


Figura 9

Una colorazione simultanea con ioduro di propidio, un colorante del DNA che non è permeabile alla membrana cellulare, permette di distinguere le cellule apoptotiche da quelle necrotiche. In particolare, le cellule apoptotiche daranno colorazione positiva per l'annessina V ma negativa per lo ioduro di propidio, perché quest'ultimo non può attraversare la membrana cellulare intatta. Le cellule necrotiche invece daranno colorazione positiva sia per l'annessina V sia per lo ioduro di propidio, poiché la membrana cellulare non è intatta. In figura 10 sono riportati alcuni esempi relativi a tale saggio per i derivati **17j** (41.7%), **17k** (67.9%), **17q** (40.8%) e **17s** (40.8%), dotati di attività apoptotica.

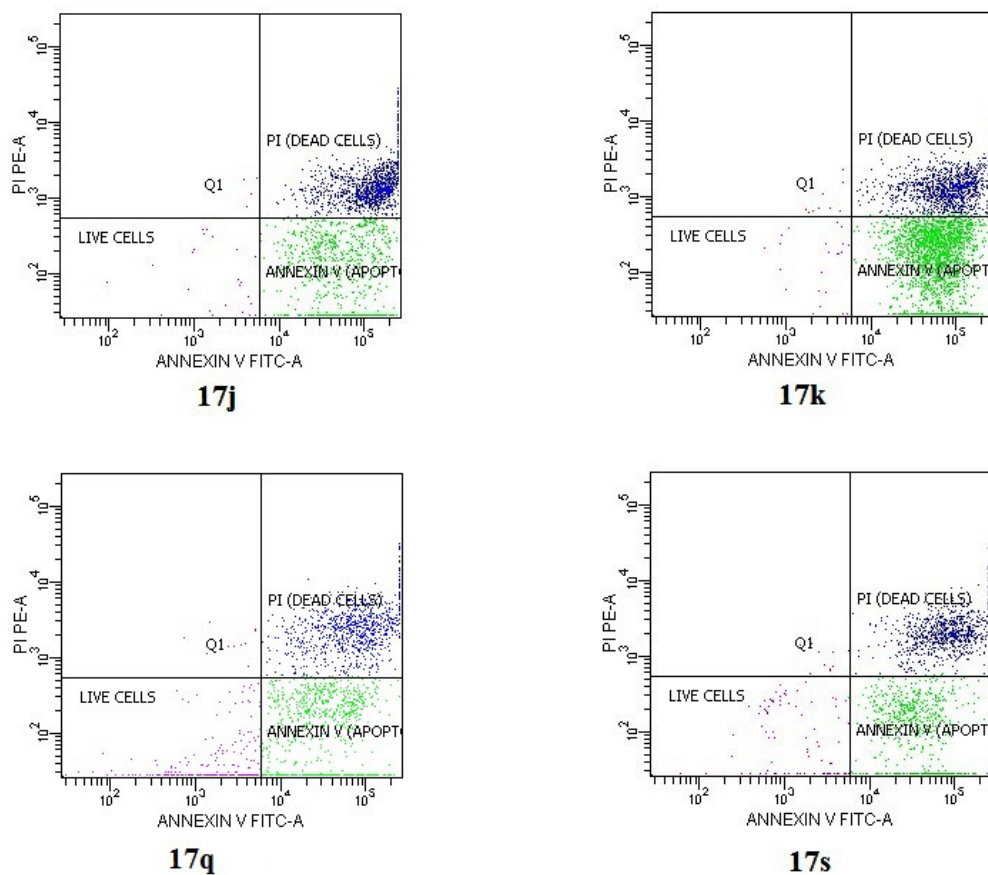


Figura 10. Esempio di composti dotati di attività apoptotica.

Un confronto della percentuale di cellule in apoptosi e di cellule necrotiche trattate per 72h con i derivati **17a-x** (tabella 3) evidenzia una significativa attività apoptotica dei composti **17f** (28%), **17j** (41.7%), **17k** (67.9%), **17n** (26.0%), **17o** (34.9%), **17q** (40.8%), **17s** (40.8%), **17t** (30.0%) e **17x** (25.5%) rispetto al controllo in assenza di farmaco (13.9%). Inoltre, per il composto **17k**, si evidenzia un effetto apoptotico marcato rispetto alla cellule in necrosi (67.9% e 31,2% rispettivamente).

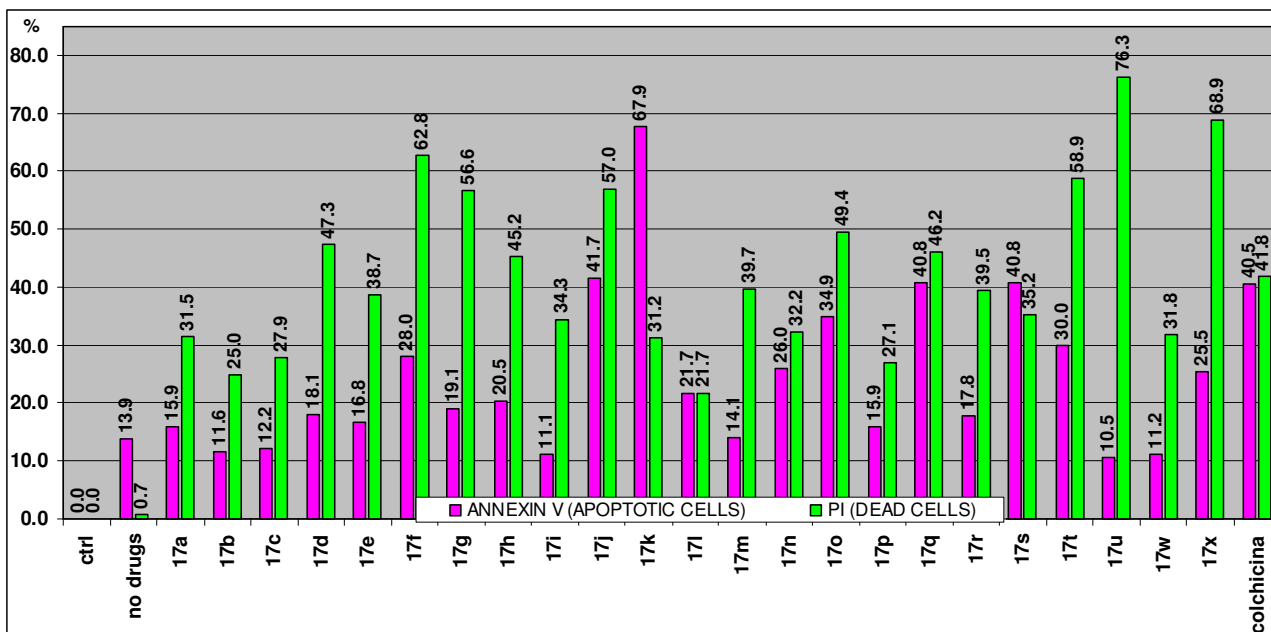


Tabella 3. Attività apoptotica ed antiproliferativa dei composti **17a-x** sulle cellule HEP G2 alla concentrazione screening di 10 μ M.

Al fine di confermare anche per i derivati **17** un'attività inibitoria della polimerizzazione della tubulina sono stati valutati gli effetti sulla distribuzione del ciclo cellulare dei derivati risultati più attivi (**17d**, **17e**, **17f**, **17l**, **17n** e **17r**) (Figura 11).

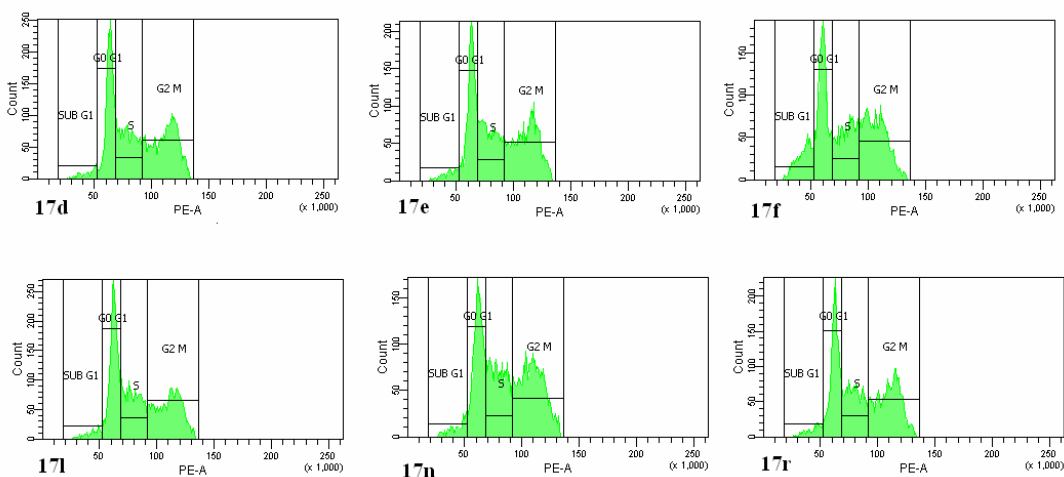


Figura 11. Esempio di composti che bloccano le cellule in fase G2M.

Alla luce di tali risultati, come riportato in tabella 4, l'incremento in fase G2M per i composti presi in esame è compreso tra il 36 ed il 40%.

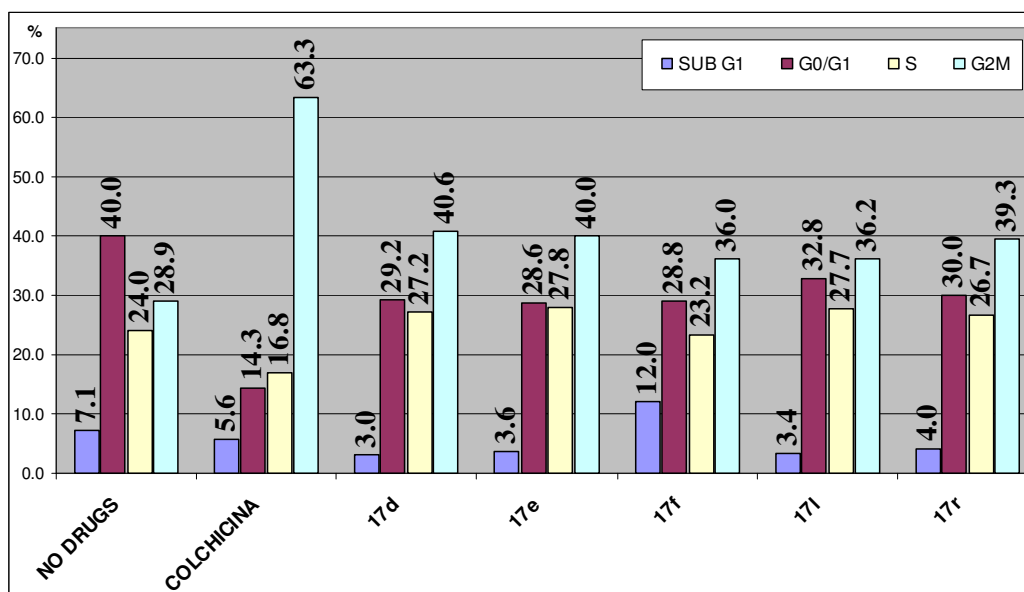


Tabella 4. Effetti sulla distribuzione del ciclo cellulare dei composti **17d-f**, **17i**, **17r** alla concentrazione screening di 10 μ M.

Considerando che l'andamento tipico di un inibitore della tubulina, come la colchicina che presenta un picco significativo in G2M pari al 63.3%, prevede un picco G2M molto netto ed intenso, i derivati **17** saggiati risultano deboli inibitori della polimerizzazione della tubulina.

Gli effetti sulla polimerizzazione della tubulina sia nelle cellule (immunofluorescenza) che sulla tubulina purificata (saggio in vitro) confermano tale ipotesi.

Bisogna sottolineare che all'interno del picco relativo alla fase G2M sono raggruppate insieme tutte le cellule che sono bloccate in fase G2, quelle bloccate in fase M e le cellule bloccate in citocinesi. La conoscenza dell'andamento percentuale delle cellule bloccate in ciascuna di queste fasi sarebbe di grande utilità per verificare esattamente quale sia il meccanismo d'azione. Infatti, un netto blocco in fase G2 potrebbe essere indicativo di una inibizione della topoisomerasi, mentre il blocco in fase M è tipico degli antitubulinici ed, infine, l'arresto in citocinesi potrebbe rivelare un'attività inibitoria sull'actina. Attualmente è corso un esame morfologico allo scopo di valutare tale aspetto poiché le cellule in arresto in G2 hanno un singolo

nucleo, quelle bloccate in mitosi cromosomi condensati e quelle in citocinesi hanno due nuclei.

3. CONCLUSIONI

Scopo della mia tesi di dottorato è stato la sintesi, l'ottimizzazione strutturale e lo studio dell'attività biologica di derivati cinnammidobenzammidici in grado di inibire la polimerizzazione della tubulina. Per quanto riguarda il primo aspetto della ricerca, i risultati ottenuti presso i nostri laboratori sulle cinnammidobenzammidi [14] hanno evidenziato una buona attività antiproliferativa nei confronti di numerose linee cellulari a concentrazioni micromolari o submicromolari contro tutte le linee tumorali studiate. L'analisi COMPARE, gli effetti sulla polimerizzazione della tubulina e sul ciclo cellulare hanno indicato che questi agenti antiproliferativi agiscono come antitubulinici. Sulla base di tali risultati ho intrapreso la sintesi mirata effettuando le seguenti modifiche strutturali: introduzione dei sostituenti 3-bromo, 3-cloro e 4-cloro sul nucleo cinnammidico, introduzione dei sostituenti 5-metossi e 4,5-dimetossi sul nucleo benzammidico, sostituzione del legame olefinico con i gruppi etilico, etinico, ciclopropilico, sostituzione del gruppo stirilico con quello 2-bifenilico e 4-bifenilico.

Per tutti i composti sintetizzati è stata valutata l'attività antiproliferativa *in vitro* nei confronti della linea cellulare K562, derivante da una leucemia mieloide cronica, e della linea cellulare HEPG2 derivante da epatoblastoma umano. Sono state, inoltre, valutate l'attività apoptotica attraverso l'analisi con annessina V e gli effetti dei composti sulla distribuzione del ciclo cellulare. I dati biologici confermano per numerosi composti la presenza di un'attività antiproliferativa e apoptotica. Dati sugli effetti dei composti sulla distribuzione del ciclo cellulare confermerebbero una debole attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina anche se un'ipotesi di un differente meccanismo d'azione per spiegare alcune risultanze sperimentali.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 CHIMICA

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi 350 e non sono corretti. Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin-Elmer 1720 in KBr. Gli spettri NMR sono stati ottenuti con uno spettrometro Bruker AC 300 MHz usando TMS come standard interno. Le analisi centesimali di C, H, N sono state eseguite con un apparecchio Elemental Vario EL III ed i valori sono in accordo con quelli teorici ($\pm 0.4\%$).

Preparazione dei cloruri degli acidi 16a-r, 23a-c.

I cloruri **16a-r**, **23a-c** sono stati ottenuti ponendo a riflusso per 5h i corrispondenti acidi (0,01 moli) con cloruro di tionile (7.25 mL). Dopo evaporazione a pressione ridotta, il residuo liquido grezzo viene utilizzato per la successiva reazione senza purificazione.

Preparazione della 5-iodo-2-amminobenzammide 15e [16].

11.7 g (46.2 mmoli) di iodio in polvere sono stati aggiunti a porzioni nell'arco di 1h ad una soluzione agitata magneticamente di 2-amminobenzammide (5.72 g, 42.0 mmoli) e NaHCO₃ in acqua (1.3 L). La miscela di reazione è stata lasciata ad agitare tutta la notte a temperatura ambiente. Dopo sono stati aggiunti 0.87 g di NaHSO₃ (8.40 mmoli). La miscela di reazione è stata quindi estratta con acetato di etile (3 x 800 mL), seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata sotto ridotta pressione. Il prodotto grezzo è stato ricristallizzato con una miscela acqua/metanolo (10:1, v/v, 600 mL) per dare la 5-iodo-2-amminobenzammide **15e** pura (9.07 g, 34.6 mmoli, 87%) come cristalli bianchi; m.p. 197-198°C.

Preparazione della 5-R-4-R₁-2-nitrobenzammide 24a-c.

A 0.01 moli di cloruro dell'acido 5-metil-2-nitrobenzoico **23a**, 5-metossi-2-nitrobenzoico **23b** e 4,5-dimetossi-2-nitrobenzoico **23c**, sono stati aggiunti 10 mL di ammoniaca acquosa (25%) e 33 mL di acetonitrile, la soluzione è stata dapprima posta a riflusso per 8h quindi evaporata a pressione ridotta per dare la 5-R-4-R₁-2-nitrobenzammide **24a-c**.

Preparazione della 5-R-4-R₁-amminobenzammide 15d,f,g.

Ad una sospensione, raffreddata in bagno di ghiaccio e agitata magneticamente di 0.038 moli di cloruro stannoso in HCl concentrato al 37% (15ml) sono stati aggiunte, ad una velocità tale da mantenere la temperatura al di sotto dei 5°C (circa 1h), 0.013 moli di 5-R-4-R₁-2-nitrobenzammide **24a-c**. Dopo il completamento dell'aggiunta la miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 24h. Il residuo semiliquido bianco così ottenuto è stato diluito con acqua fredda (180 mL) quindi addizionato di una soluzione acquosa di idrossido di sodio (40%) fino a dissoluzione dei sali di stagno. La soluzione alcalina è stata quindi estratta con acetato di etile (3x150ml), gli estratti seccati su solfato sodico ed evaporati in vacuo per ottenere la 5-R-4-R₁-amminobenzammide **15d,f,g**.

Procedura di preparazione della 5-R-4-R₁-amminobenzammide 15b,c.

0.01 moli di 2H-3,1-benzoxazin-2,4(1H)dione **25a,b** sono posti in 25 mL di ammoniaca acquosa (25%) e lasciati sotto agitazione magnetica per 1h. Il prodotto solido che si ottiene è stato filtrato, lavato con ammoniaca acquosa e (5%) quindi cristallizzato da etanolo.

Procedura di preparazione dei derivati benzamidici 17a-x.

Ad una sospensione fredda (0-5°C) e agitata magneticamente dell'opportuna 2-amminobenzammide **15a-g** (0.016 moli) in piridina (13 mL) sono state aggiunte nello spazio di 30 minuti 0.016 moli dell'opportuno cloruro acido **16a-r**.

Dopo aver completato l'aggiunta, la soluzione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 24h quindi versata in ghiaccio pestato. Il prodotto solido che si separa, è stato prima lavato con acqua quindi cristallizzato con l'opportuno solvente.

(E)-2-(3-(3-bromofenil)acrilamido)-5-iodobenzamide (17a): resa 38.0 %; mp 252-254°C (diossano); I.R. (KBr) cm^{-1} 3347, 3145 (NH, NH₂), 1659, 1620 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 6.96 (d, 1H, J=15.9 Hz, CH olefinico); 7.36-8.41 (insieme di segnali, 10H, protoni aromatici, CH olefinico e NH₂); 11.76 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₆H₁₂BrIN₂O₂) C,H,N.

(E)-2-(3-(3-clorofenil)acrilamido)-5-iodobenzamide (17b): resa 26.4 %; mp 254-256°C (diossano); I.R. (KBr) cm^{-1} 3354, 3150 (NH, NH₂), 1657, 1618 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 6.96 (d, 1H, J=15.6 Hz, CH olefinico); 7.46-8.44 (insieme di segnali, 10H, protoni aromatici, CH olefinico e NH₂); 11.82 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₆H₁₂ClIN₂O₂) C,H,N.

(E)-2-(3-(4-clorofenil)acrilamido)-5-iodobenzamide (17c): resa 31.6 %; mp 250-252°C (diossano); I.R. (KBr) cm^{-1} 3377, 3218 (NH, NH₂), 1660, 1616 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 6.86 (d, 1H, J=15.9 Hz, CH olefinico); 7.42-8.40 (insieme di segnali, 10H, protoni aromatici, CH olefinico e NH₂); 11.78 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₆H₁₂ClIN₂O₂) C,H,N.

2-cinnamamido-5-metossibenzamide (17d): resa 38.3 %; mp 196-198°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3371, 3188 (NH, NH₂), 1660, 1616 (2XCO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃); 5.68 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.27 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.58 (d, 1H, J=15.6 Hz, CH olefinico); 7.42-8.40 (insieme di segnali, 9H, protoni aromatici, CH olefinico); 11.03 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 55.74 (OCH₃), 113.17 (CH_{Ar}), 117.92 (CH_{Ar}), 119.90 (C_{Ar}), 122.06 (C_{Ar}), 123.43 (CH_{Ar}), 128.01 (2XCH_{Ar}),

128.83 (2XCH_{Ar}), 129.82 (CH_{Ar}), 133.42 (C_{Ar}), 134.80 (CH_{Ar}), 141.63 (C_{Ar}), 154.78 (CH_{Ar}), 164.07 (CO), 170.98 (CO). Anal. (C₁₇H₁₆N₂O₃) C,H,N.

2-cinnamamido-4,5-dimetossibenzamide (17e): resa 41.6 %; mp 214-216°C (etanolo); I.R. (KBr) cm⁻¹ 3411, 3326, 3221 (NH, NH₂), 1660, 1616 (2XCO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃); 3.99 (s, 3H, OCH₃); 5.92 (s allargato, 2H, NH₂, scambiabile); 6.59 (d, 1H, J=15.6 Hz, CH olefinico); 6.97-8.61 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici, CH olefinico); 11.73 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 56.15 (OCH₃), 56.52 (OCH₃), 104.79 (CH_{Ar}), 109.52 (C_{Ar}), 110.00 (CH_{Ar}), 122.12 (CH_{Ar}), 128.07 (2XCH_{Ar}), , 128.86 (2XCH_{Ar}), 129.92 (CH_{Ar}), 134.71 (C_{Ar}), 136.77 (C_{Ar}), 141.88 (CH_{Ar}), 144.09 (C_{Ar}), 153.16 (C_{Ar}), 164.54 (CO), 171.15 (CO). Anal. (C₁₈H₁₈N₂O₄) C,H,N.

5-cloro-2-(3-fenilpropiolammido)benzamide (17g): resa 95%; mp 239-240°C (etanolo-acqua); I.R. (KBr) CM⁻¹ 3390, 3215 (NH, NH₂), 2208 (C≡C), 1666, 1649 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 7.47-8.52 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 8.55 (s, 2H, NH₂); 12.29 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₆H₁₁ClN₂O₂) C,H,N.

5-bromo-2-(3-fenilpropiolammido)benzamide (17h): resa 95%; mp 239-240°C (etanolo-diossano); I.R. (KBr) CM⁻¹ 3392, 3217 (NH, NH₂), 2209 (C≡C), 1664, 1651 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 7.45-8.43 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 8.43 (s, 2H, NH₂); 12.26 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₆H₁₁BrN₂O₂) C,H,N.

5-metil-2-(3-fenilpropiolammido)benzamide (17i) : resa 95%; mp 239-240°C (etanolo-diossano); I.R. (KBr) CM⁻¹ 3393, 3213 (NH, NH₂), 2207 (C≡C), 1666, 1647 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 2.32 (s 3H, CH₃); 7.35-8.27 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 8.30 (s, 2H, NH₂, scambiabile); 12.26 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. (C₁₇H₁₄N₂O₂) C,H,N.

5-iodo-2-(3-fenilpropiolammido)benzamide (17j) : resa 84.0%; mp 235-237°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3402, 3211 (NH, NH_2), 2207 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1666, 1647 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ 7.50-8.16 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 8.43 (s, 2H, NH_2 , scambiabile); 12.26 (s, 1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (DMSO) 83.99 (CH_{Ar}), 84.98 (C_{Ar}), 87.79 (CH_{Ar}), 119.15 (C_{Ar}), 122.12 (C_{Ar}), 123.00 (CH_{Ar}), 129.23 (2X CH_{Ar}), 131.01 (CH_{Ar}), 132.58 (2X CH_{Ar}), 136.97 (CH_{Ar}), 138.45 (C_{Ar}), 140.99 (CH_{Ar}), 150.12 (CO), 169.27 (CO). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{IN}_2\text{O}_2$) C,H,N.

4,5-dimetossi-2-(3-fenilpropiolammido)benzamide (17k) : resa 87.4%; mp 190-193°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3359, 3164 (NH, NH_2), 2208 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1677, 1618 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ 3.81 (s 6H, 2XOCH₃); 7.40-8.36 (insieme di segnali, 9H, protoni aromatici, NH_2); 12.86 (s, 1H, NH; scambiabile). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$) C,H,N.

2-((1S,2R)-2-fenilciclopropanocarbossamido)-5-iodobenzamide (17l): resa 53.3 %; mp 200-205°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3348, 3296, 3189 (NH, NH_2), 1675, 1652 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ 1.39 (m, 1H, CH-H ciclopropanico); 1.51 (m, 1H, CH-H ciclopropanico); 1.98 (m, 1H, CH ciclopropanico); 2.42 (m, 1H, CH ciclopropanico); 7.19-8.36 (insieme di segnali, 10H, protoni aromatici e NH_2); 11.81 (s, 1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (DMSO) 16.33 (CH_2), 25.26 (CH), 27.62 (CH), 85.89 (C_{Ar}), 121.89 (C_{Ar}), 122.41 (CH_{Ar}), 125.88 (2X CH_{Ar}), 126.09 (CH_{Ar}), 128.25 (2X CH_{Ar}), 136.50 (C_{Ar}), 139.92 (CH_{Ar}), 140.31 (C_{Ar}), 140.35 (CH_{Ar}), 169.13 (CO), 169.77 (CO). Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_2$) C,H,N.

5-cloro-2-(3-fenilpropanammido)benzamide (17n): resa 76.6 %; mp 165-166°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3404, 3347, 3173 (NH, NH_2), 1683, 1618 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.72 (t, 2H, CH_2); 3.05 (t, 2H, CH_2); 5.69 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.15 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.19-8.64 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 11.00 (s,

1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (CDCl_3) 31.29 (CH_2), 39.92 (CH_2), 119.81 (C_{Ar}), 123.04 (CH_{Ar}), 126.25 (CH_{Ar}), 126.99 (CH_{Ar}), 127.56 (C_{Ar}), 128.37 (2XCH_{Ar}), 128.53 (2XCH_{Ar}), 133.15 (CH_{Ar}), 138.67 (C_{Ar}), 140.52 (C_{Ar}), 169.81 (CO), 171.09 (CO). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$) C,H,N.

5-metil-2-(3-fenilpropanammido)benzamide (17o): resa 58.8 %; mp 155-158°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3294, 3162 (NH, NH_2), 1667, 1630 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.33 (s, 3H, CH_3); 2.71 (t, 2H, CH_2); 3.06 (t, 2H, CH_2); 5.59 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.13 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 7.20-8.54 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 11.01 (s, 1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (CDCl_3) 20.78 (CH_3), 31.41 (CH_2), 39.95 (CH_2), 118.48 (C_{Ar}), 121.61 (CH_{Ar}), 126.15 (CH_{Ar}), 127.45 (CH_{Ar}), 128.38 (2XCH_{Ar}), 128.48 (2XCH_{Ar}), 132.17 (C_{Ar}), 134.03 (CH_{Ar}), 137.66 (C_{Ar}), 140.73 (C_{Ar}), 170.91 (CO), 171.21 (CO). Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$) C,H,N.

5-iodo-2-(3-fenilpropanammido)benzamide (17p): 67.4 %; mp 183-185°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3388, 3267, 3188 (NH, NH_2), 1654, 1610 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.71 (t, 2H, CH_2); 3.04 (t, 2H, CH_2); 5.83 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.31 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 7.19-8.43 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 11.03 (s, 1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (CDCl_3) 31.24 (CH_2), 39.97 (CH_2), 85.00 (C_{Ar}), 120.54 (C_{Ar}), 123.43 (CH_{Ar}), 126.24 (CH_{Ar}), 128.36 (2XCH_{Ar}), 128.53 (2XCH_{Ar}), 135.76 (CH_{Ar}), 139.70 (C_{Ar}), 140.48 (C_{Ar}), 141.89 (CH_{Ar}), 169.62 (CO), 171.13 (CO). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_2$) C,H,N.

5-metossi-2-(3-fenilpropanammido)benzamide (17q): resa 72.1 %; mp 156-158°C (etanolo); I.R. (KBr) cm^{-1} 3382, 3280, 3187 (NH, NH_2), 1652, 1608 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 2.75 (t, 2H, CH_2); 3.11 (t, 2H, CH_2); 3.85 (s, 3H, OCH_3); 5.98 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 6.54 (s allargato, 1H, NH-H, scambiabile); 7.06-8.52 (insieme di segnali, 8H, protoni aromatici); 10.76 (s, 1H, NH; scambiabile). $^{13}\text{C-NMR}(\delta)$ (CDCl_3) 31.43 (CH_2), 39.72 (CH_2), 55.64

(OCH₃), 113.15 (CH_{Ar}), 117.58 (CH_{Ar}), 120.72 (C_{Ar}), 123.31 (CH_{Ar}), 126.19 (CH_{Ar}), 128.35 (2XCH_{Ar}), 128.50 (2XCH_{Ar}), 132.75 (C_{Ar}), 140.66 (C_{Ar}), 154.69 (C_{Ar}), 170.86 (CO), 171.02 (CO). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₃) C,H,N.

4,5-dimetossi-2-(3-fenilpropanammido)benzamide (17r): resa 44.3 %; mp 170-172°C (etanolo); I.R. (KBr) cm⁻¹ 3381, 3280, 3230 (NH, NH₂), 1660, 1621 (2XCO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.73 (t, 2H, CH₂); 3.06 (t, 2H, CH₂); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 3.96 (s, 3H, OCH₃); 5.84 (s allargato, 2H, NH₂, scambiabile); 6.92-8.44 (insieme di segnali, 7H, protoni aromatici); 11.43 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 31.34 (CH₂), 40.02 (CH₂), 56.13 (OCH₃), 56.50 (OCH₃), 104.16 (CH_{Ar}), 109.50 (C_{Ar}), 109.98 (CH_{Ar}), 126.21 (CH_{Ar}), 128.34 (2XCH_{Ar}), 128.53 (2XCH_{Ar}), 136.38 (C_{Ar}), 140.65 (CH_{Ar}), 143.93 (C_{Ar}), 153.09 (C_{Ar}), 171.06 (CO), 171.17 (CO). Anal. (C₁₈H₂₀N₂O₄) C,H,N.

N-(2-carbamoilfenil)bifenil-4-carbossamide (17s):

resa 45.1 %; mp 225-230°C (etanolo); I.R. (KBr) CM⁻¹ 3376, 3206, 3189 (NH, NH₂), 1654, 1633 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 7.17-8.76 (insieme di segnali, 15H, protoni aromatici ed NH₂); 13.05 (s, 1H, NH; scambiabile).). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 119.04 (C_{Ar}), 104.16 (CH_{Ar}), 119.95 (CH_{Ar}), 122.55 (CH_{Ar}), 126.86 (2XCH_{Ar}), 127.05 (2XCH_{Ar}), 127.55 (2XCH_{Ar}), 128.16 (CH_{Ar}), 128.67 (CH_{Ar}), 128.98 (2XCH_{Ar}), 132.52 (CH_{Ar}), 133.27 (C_{Ar}), 138.84 (C_{Ar}), 140.06 (C_{Ar}), 143.46 (C_{Ar}), 163.96 (CO), 171.13 (CO). Anal. (C₂₀H₁₆N₂O₂) C,H,N.

N-(2-carbamoil-4-clorofenil)bifenil-4-carbossamide (17t):

resa 47.2 %; mp 210-212°C (etanolo); I.R. (KBr) CM⁻¹ 3384-3215 (NH, NH₂), 1668, 1651 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 7.43-8.77 (insieme di segnali, 14H, protoni aromatici ed NH₂); 12.95 (s, 1H, NH; scambiabile).). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 120.72 (C_{Ar}), 121.75 (CH_{Ar}), 126.43 (C_{Ar}), 126.93 (2XCH_{Ar}), 127.14 (2XCH_{Ar}), 127.64 (2XCH_{Ar}), 128.27 (CH_{Ar}), 128.35 (CH_{Ar}), 129.05 (2XCH_{Ar}), 132.25 (CH_{Ar}), 133.01 (C_{Ar}), 138.84 (C_{Ar}), 138.97 (C_{Ar}), 143.66 (C_{Ar}), 164.09 (CO), 169.85 (CO). Anal. (C₂₀H₁₅ClN₂O₂) C,H,N.

N-(2-carbamoil-4-metilfenil)bifenil-4-carbossamide (17u):

resa 43.3 %; mp 220-222°C (etanolo); I.R. (KBr) CM^{-1} 3424, 3320, 3113 (NH, NH₂), 1656, 1645 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 2.32 (s, 3H, CH₃) 7.40-8.66 (insieme di segnali, 14H, protoni aromatici ed NH₂); 12.95 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (DMSO) 20.85 (OCH₃), 119.52 (C_{Ar}), 120.44 (CH_{Ar}), 127.37 (2XCH_{Ar}), 127.54 (2XCH_{Ar}), 128.03 (2XCH_{Ar}), 128.66 (CH_{Ar}), 129.50 (3XCH_{Ar}), 132.14 (C_{Ar}), 133.47 (CH_{Ar}), 133.89 (C_{Ar}), 138.17 (C_{Ar}), 139.39 (C_{Ar}), 143.87 (C_{Ar}), 164.25 (CO), 171.72 (CO). Anal. (C₂₁H₁₅N₂O₃) C,H,N.

N-(2-carbamoil-4-iodofenil)bifenil-4-carbossamide (17v)

resa 46.0 %; mp 250-255°C (etanolo); I.R. (KBr) CM^{-1} 3384, 3273, 3210 (NH, NH₂), 1668, 1655 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 7.44-8.56 (insieme di segnali, 14H, protoni aromatici ed NH₂); 12.95 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 86.27 (C_{Ar}), 121.18 (C_{Ar}), 122.21 (CH_{Ar}), 126.93 (2XCH_{Ar}), 127.14 (2XCH_{Ar}), 127.64 (2XCH_{Ar}), 128.26 (CH_{Ar}), 129.05 (2XCH_{Ar}), 133.07 (C_{Ar}), 136.77 (CH_{Ar}), 138.85 (C_{Ar}), 139.74 (C_{Ar}), 140.94 (CH_{Ar}), 143.65 (C_{Ar}), 164.07 (CO), 169.77 (CO). Anal. (C₂₀H₁₅IN₂O₂) C,H,N.

N-(2-carbamoil-4-metossifenil)bifenil-4-carbossamide (17w)

resa 55.1 %; mp 242-244°C (etanolo); I.R. (KBr) CM^{-1} 3356, 3245, 3186 (NH, NH₂), 1655 (allargata, 2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.21-8.69 (insieme di segnali, 14H, protoni aromatici ed NH₂); 12.74 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (CDCl₃) 55.51 (OCH₃), 113.58 (CH_{Ar}), 118.09 (CH_{Ar}), 120.59 (C_{Ar}), 121.65 (CH_{Ar}), 126.89 (2XCH_{Ar}), 127.05 (2XCH_{Ar}), 127.50 (2XCH_{Ar}), 128.17 (CH_{Ar}), 129.03 (2XCH_{Ar}), 133.34 (C_{Ar}), 133.48 (C_{Ar}), 138.94 (C_{Ar}), 143.30 (C_{Ar}), 154.32 (C_{Ar}), 163.56 (CO), 170.83 (CO). Anal. (C₂₁H₁₈N₂O₃) C,H,N.

N-(2-carbamoil-4,5-dimetossifenil)bifenil-4-carbossamide (17x)

resa 53.1 %; mp 230-232°C (etanolo); I.R. (KBr) CM^{-1} 3346, 3289, 3185 (NH, NH₂), 1671, 1644 (2XCO); ¹H-NMR (DMSO) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃);

3.87 (s, 3H, OCH₃); 7.43-8.57 (insieme di segnali, 14H, protoni aromatici ed NH₂); 13.43 (s, 1H, NH; scambiabile). ¹³C-NMR(δ) (DMSO) 55.45 (OCH₃), 55.98 (OCH₃), 103.93 (CH_{Ar}), 110.06 (CH_{Ar}), 111.76 (C_{Ar}), 126.90 (2XCH_{Ar}), 127.08 (2XCH_{Ar}), 127.52 (2XCH_{Ar}), 128.19 (CH_{Ar}), 129.03 (2XCH_{Ar}), 133.51 (C_{Ar}), 135.87 (CH_{Ar}), 138.92 (C_{Ar}), 143.37 (C_{Ar}), 143.60 (C_{Ar}), 151.65 (C_{Ar}), 163.76 (CO), 171.01 (CO). Anal. (C₂₂H₂₀N₂O₄) C,H,N.

4.2 BIOLOGIA

SAGGI DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Le cellule K562 sono state fatte crescere in micro piastre da 24 pozzetti aggiungendo 1 mL 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 (100 μ L). Il numero delle cellule è stato determinato con un emocitometro (camera di Bürker) e la vitalità è stata stimata mediante incorporazione del trypan blu.

Le cellule di epatocarcinoma HEPG2, ad una concentrazione di 10^5 /pozzetto sono state incubate per 72 ore in assenza e in presenza di inibitori in fiaschette a 24 pozzetti nel mezzo VITO 143, con l'aggiunta di ITG (insulina, transferrina, e glucagone), rosso fenolo, pen/strep (penicillina e streptomicina). Dopo 72 ore le cellule sono raccolte con EDTA, lavate 2 volte con PBS per 5 minuti a 200 x g e risospesi in 100 μ L di PBS nella provetta per l'analisi citofluorimetrica.

CITOMETRIA A FLUSSO (FACS o Fluorescence Activated Cell Sorting)

Per analizzare le fasi del ciclo cellulare e l'apoptosi della popolazione di cellule risultante linea di cellule HEPG2 causata dai composti dopo 72 ore di incubazione è stata usata la citofluorimetria a flusso (FACS). Per la colorazione degli anticorpi sono state impiegate un milione di cellule, utilizzando isotiocianato di fluorescina (FITC), anticorpi coniugati per annessina V, ioduro di propidio (PI) e controlli isotipico. Anticorpi controllo isotipico sono stati usati come controllo negativo per la misurazione del legame aspecifico degli anticorpi specifici. Cancelli scatter in avanti e laterale sono stati fissati per includere tutte le cellule vitali. I detriti sono stati esclusi dalla popolazione delle cellule applicando un gate in FSC (scatter frontale) versus SSC (scatter laterale). I dati sono stati acquisiti su uno strumento FACS BD Aria II e analizzati da FACSDiva software 6.1.2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

ANALISI DELL' APOPTOSI PER MEZZO DELL' ANNESSINA V

Il buffer di incubazione è una soluzione contenente 10 mM di HEPES/NaOH, pH 7,4 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ mentre la soluzione di ioduro di propidio è stata preparata da una soluzione stock di 50 g/mL. 20 µL di annessina-V-Fluos è stata prediluita in 1 mL di tampone di incubazione e addizionata di 20µL di soluzione di ioduro di propidio. Una quantità di 10⁶ di cellule sono state lavate con PBS e centrifugate a 200 ×g per 5 min. Il pellet è stato risospeso in 100 mL di annessina-V-FLUOS quindi incubato per 10-15 minuti a 15 e 25 °C. Sono stati quindi aggiunti 0,4-0,8 ml di tampone di incubazione.

L'analisi è stata condotta con un citofluorimetro usando un laser blu con una lunghezza d'onda di 488 nm e di un filtro passa banda a 515 nm per il rilevamento della fluoresceina e un filtro a 600 nm per la rilevazione di ioduro di propidio. E' necessaria una compensazione manuale dello strumento per escludere la sovrapposizione dei due spettri di emissione.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Nogales E., Sharon G. W., Kenneth H., *Nature* 391, 191-203 (1998).
- [2] David-Pfeuty T., Simon C., Pantaloni D., *Nature* 272, 282-283 (1978).
- [3] Timasheff S. N., Grisham L. M., *Annu. Rev. Biochem.* 4a, 565-591 (1981).
- [4] Medade M., Ramos A., Caballeos E., Palaez Lamamiè De Clairac R., Lopez J. L., Grandos D. G., Saufehciamott, *Eus. J. Red. Chem.* 33, 71-77 (1998).
- [5] D. Raffa, G. Daidone, B. Maggio, S. Cascioferro, F. Plescia, D. Schillaci, *Il Farmaco*, 141(2004), 215-221.
- [6] D. Raffa, M.C. Edler, G. Daidone, B. Maggio, M. Merickech, S. Plescia, D. Schillaci, R. Bai, E. Hamel, *Eur. J. Med. Chem.*, 39 (2004), 299-304.
- [7] D. Raffa, G. Daidone, B. Maggio, S. Cascioferro, F. Plescia, D. Schillaci, *Il Farmaco*, 59 (2004), 451-455.
- [8] H. Ogita, Y. Isobe, H. Takaku, R. Sekine, Y. Goto, S. Misawa, H. Hayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11 (2001) 549-551.
- [9] S.J. Williams, D. Stapleton, S. Zammit, D.J. Kelly, R.E. Gilbert, H., Krum., *Patent WO2008003141* (2008); *Chem. Abst.* 148:144415 (2008).
- [10] Y. Bo, P.P. Chakrabarti, N. Chen, E.M. Doherty, C.H. Fotsch, N. Han, M.G. Kelly, Q. Liu, M.H. Norman, X. Wang, J. Zhu, Ognynanov, V., *Patent WO03049702* (2003); *Chem. Abst.* 139:53025 (2003).
- [11] H. Harada, M. Isaji, H. Miyata, H. Kusama, Y. Nonaka, K. Kamata, T. Yazaki, Hotei, Y., *Patent JP10330254* (1998); *Chem. Abst.* 130:105331 (1998).
- [12] H. Harada, M. Isaji, H. Kusama, Y. Taketana, Y. Nonaka, T. Kamata, Y. Futai, *Patent JP10259129* (1998); *Chem. Abst.* 129:321163 (1998).
- [13] H. Harada, H. Kusama, Y. Nonaka, K. Kamata, Y. Hotei, A. Iyobe, H. Fujikura, F. Satoh, *Patent WO9709301* (1997); *Chem. Abst.* 126:250990 (1997).

- [14] D. Raffa, B. Maggio, F. Plescia, S. Cascioferro, S. Plescia, M.V. Raimondi, G. Daidone, M. Tolomeo, S. Grimaudo, A. Di Cristina, R.M. Pipitone, R. Bai, E. Hamel, *Eur. J. Med. Chem.* 46(2011), 2786-2796.
- [15] A.T. Babalan, A.M. Duffield, *Revue Roumanie de Chimie*, 16 (1971), 1095-1098
- [16] T. Sardon, T. Cotting, J. Xu, A. Giannis, I. Vernos, *ChemBioChem* 10 (2009), 464-478.
- [17] A.V. Dolzhenco-Podchezertseva, L.M.Korkodinova, M.V. Vaslyuc, V.P. Koteyov, *Pharm. Chem. J* (2002), 36, 647-648.
- [18] S. Chimichi, F. De Sio, D. Donati, G. Fina, R. Pepino, P. Sarti-Fantoni, *Heterocycles*, 20 (1983) 263-267.