
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze del Farmaco
Dottorato di ricerca in Scienze Farmaceutiche – XXVI Ciclo

MARIA GIULIA VARRICA

SINTESI DI ISOSSAZOLIDINIL-IPA AD ATTIVITÀ ANTINEOPLASTICA

Coordinatore:

Chiar.^{mo} Prof. Agostino Marrazzo

Relatori:

Chiar.^{mo} Prof. UGO CHIACCHIO

Chiar.^{mo} Prof. ANTONIO RESCIFINA

Triennio 2010–2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. IL CANCRO	3
3. CHEMIOTERAPIA ANTINEOPLASTICA	5
3.1 Agenti alchilanti	5
3.2 Nitrosouree	5
3.3 Antimetaboliti	6
3.4 Antimitotici	6
3.5 Ormoni ed antagonisti	6
3.6 Miscellanea di principi attivi	7
3.6.1 Complessi di coordinazione del platino	7
3.6.2 Inibitori delle tirosin chinasi	7
3.6.3 Modificatori della risposta biologica	7
3.6.4 Glucocorticosteroidi	7
3.7 Agenti intercalanti	8
4. CICLOADDIZIONI 1,3 DIPOLARI	11
4.1 Il meccanismo	11
4.2 I nitroni	17
5. SCOPO DEL LAVORO	19
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	22
7 VALUTAZIONE BIOLOGICA	30
8. CONCLUSIONI	36
9. PARTE SPERIMENTALE	37
9.1. Materiali e metodi impiegati nelle procedure sintetiche	37
9.2 Materiali e metodi impiegati ai fini della valutazione biologica	47
9.3 Docking e modellistica molecolare	49
10. SPETTRI NMR	54
BIBLIOGRAFIA	105

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, la ricerca inerente lo sviluppo di chemioterapici antineoplastici, dotati di attività intercalante nei confronti del DNA, è stata intensa.¹ Diverse sostanze sintetiche e naturali quali le antracicline, daunomicina ed adriamicina,² le ellipticine, camptotecina ed acetato di elliptinio^{3,4} e le acridine come l'amsacrina,⁵ realizzano l'inserzione in seno al duplex di DNA, esibendo selettività di sequenza e mostrando un'eccellente attività antitumorale (Figura 1).

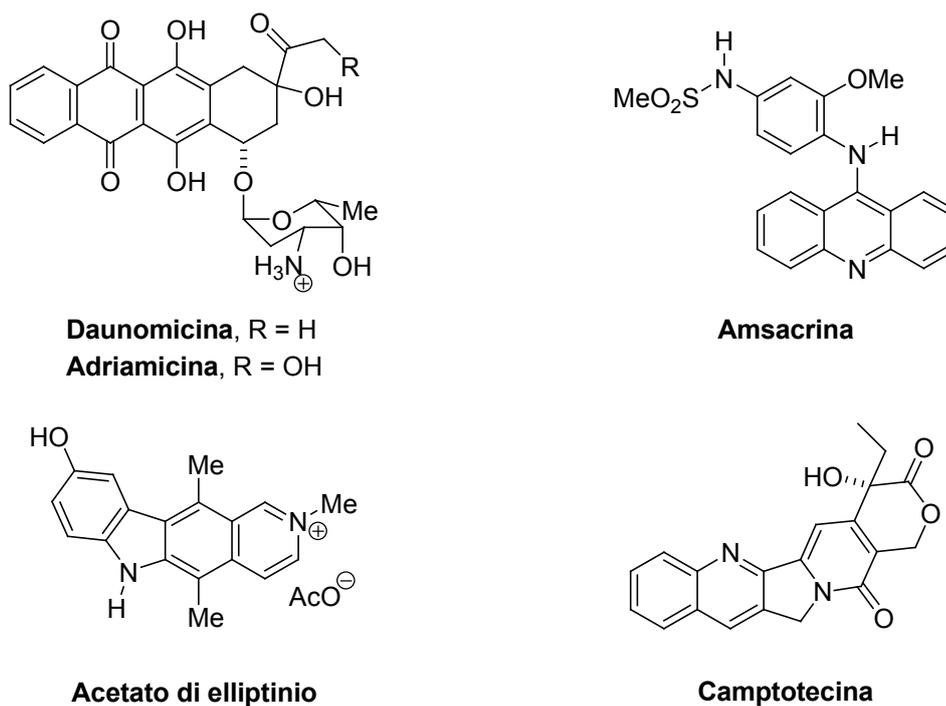


Figura 1

I fattori che giocano un importante ruolo nel consolidamento del complesso farmaco-DNA sono da ascrivere alla formazione di legami idrogeno ed alle inte-

razioni idrofobe di tipo π - π che si instaurano con opportune regioni presenti nel bersaglio biologico.

Un'ampia varietà di sistemi ciclici planari può intercalarsi nel DNA e trovare impiego nei protocolli terapeutici usati nel trattamento delle neoplasie.⁶

2. IL CANCRO

Il cancro è una malattia contraddistinta dall'abnorme ed incontrollata proliferazione cellulare. Esso è caratterizzato dalla presenza di cellule atipiche e da un accrescimento autonomo, afinalistico e progressivo. Una delle principali caratteristiche delle cellule tumorali è la perdita della capacità di differenziazione. Tale aspetto è assai importante ai fini della prognosi che risulta tanto più infausta quanto maggiore è la dedifferenziazione cellulare. La diffusione geografica della malattia si può dire ubiquitaria, anche se esistono differenze fra regione e regione, sia nell'incidenza complessiva dei tumori, sia nella frequenza di alcune forme particolari di essi. Le nazioni più evolute sono quelle nelle quali il cancro figura maggiormente fra le cause di morte.⁷

Il trattamento dell'affezione prevede tre differenti approcci: l'*asportazione chirurgica*, la *terapia radiante* e la *chemioterapia* ed il loro ruolo dipende dal tipo di tumore, dalla sua localizzazione e dallo stadio della malattia.

La chemioterapia può essere impiegata da sola o come parte di un approccio multimodale nel trattamento delle neoplasie.

Il cancro insorge come risultato di una serie di mutazioni genetiche o epigenetiche in seno alla cellula. Le principali alterazioni genetiche sono rappresentate dall'inattivazione degli oncosoppressori, come la p53, e dall'attivazione dei protooncogeni; queste alterazioni coinvolgono geni che presiedono l'ordinaria e controllata divisione cellulare. I farmaci antineoplastici interagiscono per lo più con il

DNA o con i suoi precursori, inibendo la sintesi di nuovo materiale genetico o causando danni irreparabili al DNA stesso.⁶

Il DNA è un biopolimero, le cui unità monomeriche sono rappresentate da nucleotidi, formati a loro volta da basi azotate legate al 2-desossiribosio, congiunti mediante unità fosfato.

Le basi azotate sono molecole planari ed aromatiche a struttura pirimidinica e purinica. Le basi pirimidiniche che figurano nel DNA sono la citosina (C) e la timina (T), mentre quelle puriniche sono l'adenina (A) e la guanina (G).

La struttura del DNA è nota dal 1953 grazie agli studi di Watson e Crick, i quali avanzarono l'ipotesi che esso fosse una doppia elica, costituita da due catene antiparallele di polinucleotidi, tenute insieme dalla formazione di legami idrogeno fra specifiche coppie di basi complementari fra loro ed avvolte con andamento destrorso. Le basi occupano la porzione interna dell'elica di DNA, mentre lo scheletro zucchero-fosfato si avvolge all'esterno formando due solchi, uno maggiore ed uno minore. I due solchi sono rivestiti perciò da donatori ed accettori di legami idrogeno e ciò consente ad una varietà di molecole aromatiche policicliche planari di inserirsi tra le coppie di basi impilate le une sulle altre. L'azione di molti agenti cancerogeni e di alcuni chemioterapici antitumorali si esplica proprio mediante tale meccanismo.

3. CHEMIOTERAPIA ANTINEOPLASTICA

I farmaci antineoplastici sono agenti per lo più antiproliferativi capaci di interferire sulla divisione cellulare. Essi mancano di effetti specifici sull'invasività e sulla dedifferenziazione cellulare e sono, inoltre, privi di selettività, poiché incapaci di discriminare tra tessuti malati e tessuti sani ad elevato indice proliferativo. La loro somministrazione si accompagna, infatti, alla comparsa di effetti tossici quali: mielosoppressione, alopecia, emesi, nausea, sterilità e teratogenicità.

3.1 *Agenti alchilanti*

Gli agenti alchilanti sono sostanze elettrofile capaci di realizzare con il loro bersaglio biologico, rappresentato dai gruppi nucleofili presenti nel DNA, legami covalenti. L'alchilazione, così realizzata, esercita numerosi effetti di notevole importanza biologica che possono risolversi nell'erroneo accoppiamento delle basi, nella depurinazione delle stesse e nella formazione di legami crociati tra due catene di DNA. Questi meccanismi arrecano grave danno al DNA.

3.2 *Nitrosouree*

I chemioterapici appartenenti a questa classe agiscono con un meccanismo simile agli alchilanti ed hanno suscitato un notevole interesse a causa della loro lipofilia. La carmustina e la lomustina, infatti, sono capaci di attraversare la barriera ematoencefalica e ciò ne consente l'impiego nel trattamento dei tumori cerebrali.

Sfortunatamente, le nitrosouree causano grave mielosoppressione che ne diminuisce il valore terapeutico.

3.3 Antimetaboliti

Gli antimetaboliti possono agire interferendo con le reazioni cruciali coinvolte nella biosintesi *de novo* dei nucleotidi purinici e pirimidinici o mimare tali metaboliti naturali e la loro azione si risolve nel blocco della sintesi del DNA. Sono antimetaboliti gli analoghi dell'acido folico, gli analoghi delle basi puriniche e gli analoghi delle basi pirimidiniche.

3.4 Antimitotici

Gli agenti antimitotici sono farmaci capaci di interferire con la mitosi cellulare. Si annoverano fra questi gli *alcaloidi della vinca*, sostanze derivate dalla pervinca, capaci di prevenire la formazione del fuso mitotico per dissoluzione dei microtubuli nelle cellule in divisione ed il *paclitaxel*, isolato dalla corteccia del frassino, che agisce con un meccanismo opposto a quello mostrato dagli alcaloidi della vinca, favorendo la formazione di microtubuli.

3.5 Ormoni ed antagonisti

Gli ormoni progestinici, gli estrogeni, gli androgeni, gli analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine ed i loro antagonisti trovano impiego nel trattamento dei tumori ormonosensibili quali quelli del carcinoma della mammella e

della prostata.

3.6 Miscellanea di principi attivi

3.6.1 Complessi di coordinazione del platino

I complessi di coordinazione del platino sono sostanze citotossiche responsabili della formazione di legami crociati, intra- ed intercatena, con il DNA che si traducono nell'inibizione della replicazione e della trascrizione. La formazione di tali complessi evolve nella rottura del DNA e produce errori di codifica dello stesso.

3.6.2 Inibitori delle tirosin chinasi

Gli inibitori delle tirosin chinasi sono piccole molecole capaci di esercitare azione inibitoria a carico di enzimi sovraespressi a livello delle cellule tumorali.

3.6.3 Modificatori della risposta biologica

I modificatori della risposta biologica comprendono composti quali l'interleuchina-2, capace di aumentare la risposta citolitica dei linfociti T verso le cellule tumorali, e l'interferone- α dotato di attività immunomodulatrice ed anti-proliferativa.

3.6.4 Glucocorticosteroidi

I glucocorticosteroidi posseggono effetti linfoletici ed in ragione di tale attività sono impiegati nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta e nel linfoma

maligno. La loro somministrazione produce effetti immediati e sebbene di breve durata remissione ematologica obiettiva nel 30% dei soggetti trattati.

3.7 Agenti intercalanti

Gli agenti intercalanti il DNA⁸ rientrano nel novero dei farmaci antineoplastici e ne rappresentano una delle classi principali. Alcuni di essi sono di origine naturale e sono stati isolati da colture di miceti, altri invece sono di derivazione sintetica.

Un agente intercalante è una molecola tipicamente planare capace di realizzare un'inserzione trasversale in seno al duplex di DNA mediante un meccanismo noto come intercalazione ed osservato per la prima volta da Leonard Lerman.⁹

L'inserzione dell'intercalante si traduce in una serie di variazioni strutturali e funzionali tali da alterare profondamente il genoma cellulare. Queste alterazioni possono non essere letali e produrre mutazioni che la cellula trasmetterà alla sua progenie o essere letali ed indurre l'apoptosi.

Gli intercalanti vengono distinti in intercalanti classici e veleni delle topoisomerasi¹⁰, ed entrambi interferiscono con l'attività dell'enzima topoisomerasi.

Le DNA topoisomerasi sono enzimi nucleari altamente espressi nelle cellule ad elevato indice proliferativo e rappresentano pertanto un target biologico eccellente nella terapia antitumorale. Esse riducono la tensione torsionale della doppia elica di DNA, permettendo a regioni selezionate di divenire sufficientemente plastiche e rilassate da permettere che abbiano luogo i processi cellulari essenziali di repli-

cazione e trascrizione del DNA.

Si conoscono due tipi di topoisomerasi, la I e la II, dotate ambedue di attività elicastica e ligasica e capaci, pertanto, di mediare la rottura e la riparazione del singolo e del doppio filamento di DNA. I composti noti come veleni delle topoisomerasi¹¹ inficiano l'attività dell'enzima stabilizzando la formazione del complesso topoisomerasi-DNA. Tale circostanza innesca una serie di eventi che culminano nella morte cellulare. Al contrario, gli agenti intercalanti classici non stabilizzano tale complesso, ma lo antagonizzano impedendone la formazione; in ogni caso l'attività dell'enzima viene inibita.

Da un punto di vista chimico gli intercalanti del DNA sono sistemi policiclici aromatici, costituiti da 3–6 anelli planari. Il sistema poliaromatico è il *cromoforo* della molecola ed è responsabile della colorazione di tali sostanze. La natura dei sostituenti legati al cromoforo regola l'affinità esibita dal farmaco nei confronti del *locus* di inserzione e la geometria del complesso ligando-DNA. Essi possono essere semplici gruppi metilici, metossilici o amminici oppure lunghe catene laterali rappresentate da zuccheri, oligopeptidi e gruppi carbossamidici. Tali sostituenti giocano un importante ruolo nel consolidamento del complesso farmaco-DNA grazie alla capacità di stabilire interazioni di natura elettrostatica o idrofobica con opportune porzioni dello stesso. La selettività di sequenza va ascritta proprio ai legami che intervengono tra farmaco e DNA.¹²

Durante il processo di intercalazione la doppia elica di DNA si svolge per creare uno spazio in cui verrà alloggiato il sistema aromatico planare tipico degli in-

tercalanti. L'inserzione del farmaco tra le coppie di basi ed il suo mantenimento è consentito dall'istaurarsi di adeguate interazioni (di tipo π - π). Le coppie di basi al di sopra ed al di sotto del farmaco assumono una conformazione inarcata che si traduce in una distorsione dell'elica; tale modifica conformazionale interferisce con l'ordinaria attività di enzimi, quali l'elicasi, le topoisomerasi e le polimerasi, coinvolti nel processo di replicazione e trascrizione del DNA.¹³

4. CICLOADDIZIONI 1,3 DIPOLARI

Specie dipolari caratterizzate da quattro elettroni π distribuiti su 3 atomi dei quali almeno uno diverso dal carbonio (1,3-dipoli), sono in grado nelle opportune condizioni, di addizionarsi a sistemi insaturi 2π (dipolarofili), per dare origine a cicli pentatomici, attraverso un processo concertato del tipo $(4\pi + 2\pi)$.

Il particolare meccanismo che è alla base ne determina la regio- e stereoselettività, nonché la stereospecificità che le contraddistingue e permette, quindi, non solo di prevedere gli isomeri che si formeranno, ma anche di determinarli, attraverso la scelta degli opportuni reagenti.¹⁴

Queste peculiarità sono esaltate nei processi intramolecolari, dove le inevitabili restrizioni geometrico-conformazionali impongono ulteriori limitazioni al numero dei possibili stati di transizione, mentre la maggiore velocità di reazione impedisce fenomeni di isomerizzazione che limiterebbero la stereoselettività.¹⁵

Per questi motivi, negli ultimi due decenni, tali reazioni sono state intensamente studiate¹⁶ e le loro applicazioni attentamente valutate, specialmente nella sintesi di sistemi policiclici naturali.¹⁷

4.1 *Il meccanismo*

Gli 1,3-dipoli sono delle strutture del tipo *a-b-c* (Figura 2), che possono essere divisi in anioni allilico simili ed in anioni propargilico-allenico simili, come mostrato nella tabella 1 che riporta le classificazione elaborata da Huisgen.¹⁸ Gli

anioni di tipo allilico (in cui l'atomo centrale può essere l'ossigeno, l'azoto o lo zolfo), presentano quattro elettroni π distribuiti su tre orbitali p_z ortogonali al piano individuato dai tre atomi. Essi danno vita a quattro strutture di risonanza, due in cui i tre centri hanno l'ottetto completo e due in cui a o c hanno solo sei elettroni esterni.

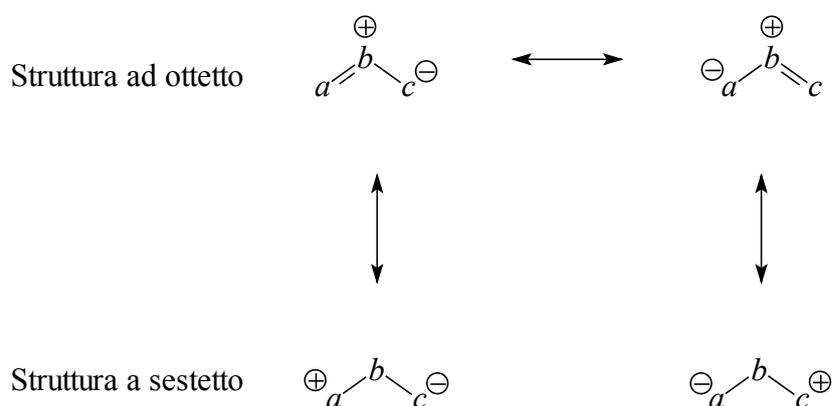


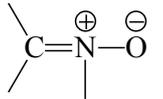
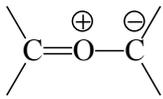
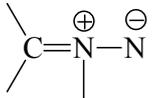
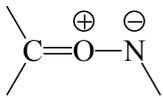
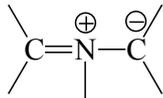
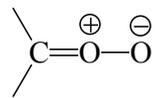
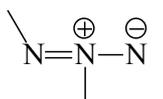
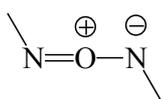
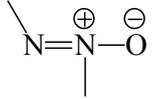
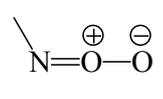
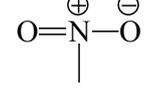
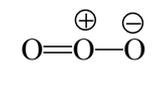
Figura 2

Negli anioni propargilico-allenico, invece, l'atomo centrale è in genere l'azoto ed è presente un ulteriore legame π che non partecipa direttamente alla cicloaddizione, ma che conferisce al dipolo una struttura lineare (Figura 3).

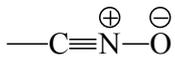
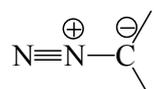
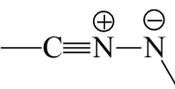
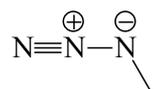
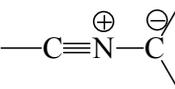
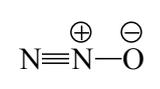


Figura 3

Tabella 1. Classificazione degli 1,3-dipoli
Anioni tipo allilico

Con l'azoto centrale		Con l'ossigeno centrale	
	Nitroni		Carbonil ilidi
	Azometin immine		Carbonil immine
	Azometin ilidi		Carbonil ossidi
	Azimmine		Nitrosimmine
	Azossi composti		Nitroso ossidi
	Nitro composti		Ozono

Anioni tipo propargilico/allenico

Betaine nitrilio		Betaine diazonio	
	Nitrilossidi		Diazoalcani
	Nitrilimmine		Azidi
	Nitrililidi		Ossido nitroso

La cicloaddizione prevede la formazione concertata e sincrona¹⁹ (da cui dipende la stereospecificità della reazione) di legami tra gli atomi esterni del dipolo e quelli 1 e 2 del dipolarofilo disposti su piani paralleli in modo da permettere la sovrapposizione ideale degli orbitali di frontiera (HOMO e LUMO) che sfocia nella formazione dei nuovi legami (Figura 4).²⁰

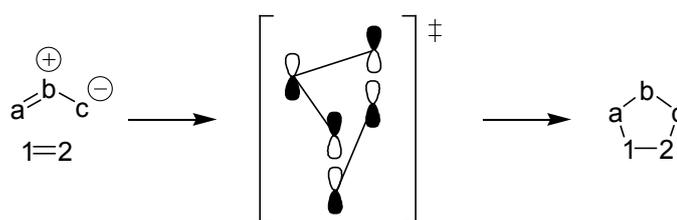


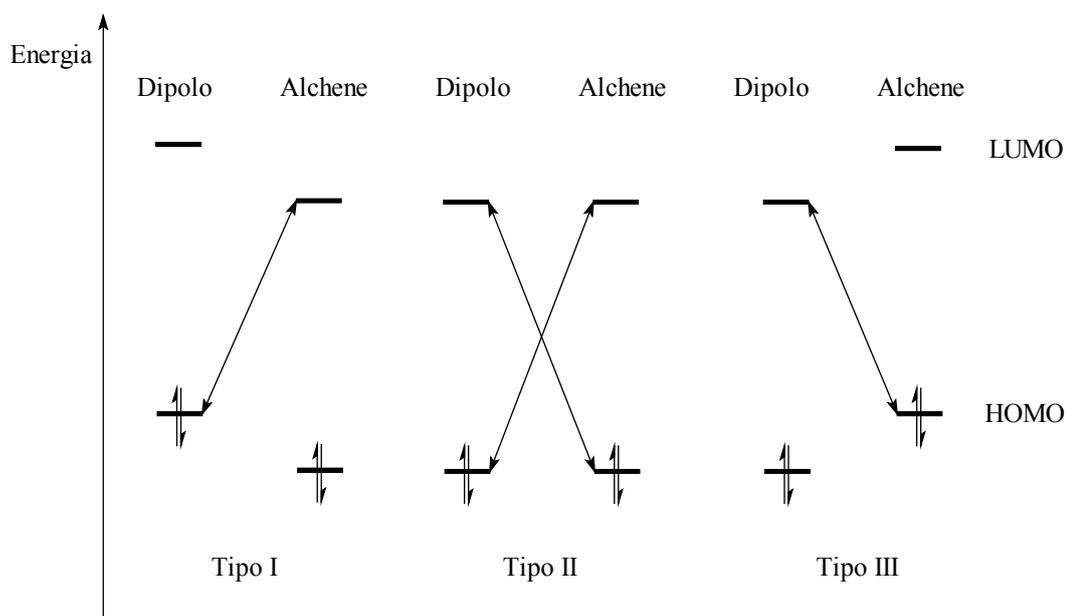
Figura 4

L'energia di attivazione del processo decresce al diminuire del gap energetico tra gli orbitali molecolari di frontiera, condizione che ne permette una rapida ed efficace sovrapposizione.

La stabilizzazione del sistema, conseguente alla formazione dei legami durante una cicloaddizione, è interpretata dall'equazione 1 secondo la quale la variazione energetica è direttamente proporzionale al prodotto fra i coefficienti orbitalici della coppia di atomi interessati ed inversamente proporzionale alla differenza energetica tra gli orbitali molecolari di frontiera che si sovrappongono.²¹

$$\Delta E \propto \frac{c_{HOMO}c_{LUMO}}{E_{HOMO} - E_{LUMO}} \quad \text{eq. 1}$$

Sustmann ha definito tre classi di reazioni in base al tipo ed all'appartenenza degli orbitali coinvolti (Figura 5).²²



Tipo I → HOMO dipolo – LUMO alchene.

Tipo II → HOMO dipolo – LUMO alchene e viceversa.

Tipo III → LUMO dipolo – HOMO alchene.

Figura 5

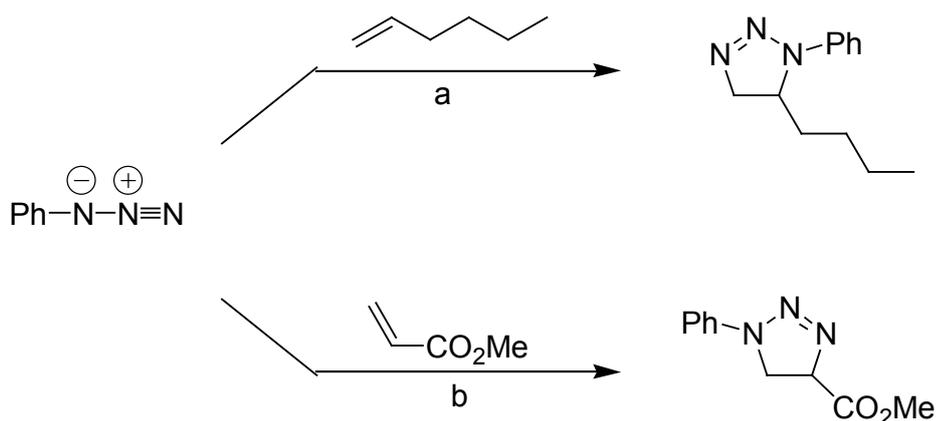
L'orbitale di frontiera impegnato dal dipolo o dal dipolarofilo è ogni volta determinato dalla configurazione elettronica del partner, perché interagiscono sempre gli orbitali energeticamente più vicini.

Nella seconda classe di reazioni, i livelli energetici dei quattro orbitali sono così vicini da non permettere di individuare i due effettivi protagonisti e minime variazioni strutturali possono far variare gli equilibri.

I sostituenti dei reagenti sono, infatti, fondamentali per il decorso della reazione in quanto contribuiscono a determinare l'energia degli orbitali molecolari di

frontiera. Le reazioni del primo tipo, ad esempio, sono accelerate da sostituenti elettron-donatori posti sul dipolo e da sostituenti elettron-attrattori sul dipolarofilo in quanto i primi fanno aumentare l'energia degli orbitali HOMO mentre i secondi abbassano quella dei LUMO, complessivamente si genera un avvicinamento reciproco dei due orbitali che velocizza la cicloaddizione.

Se non intervengono fattori sterici particolarmente importanti, anche la regiochimica della reazione è sotto il controllo degli orbitali molecolari di frontiera ed altamente selettiva perché a legarsi sono gli atomi che hanno i coefficienti orbitalici (espressione della loro densità elettronica) più grandi e questi (gli atomi) cambiano in funzione degli orbitali considerati. Lo schema 1 mostra come la fenil azide formi due regioisomeri diversi reagendo con 1-esene (a) e con acrilato di metile (b), rispettivamente un HOMO e un LUMO dipolarofilo per i quali gli atomi con i coefficienti maggiori sono diversi.



Schema 1

La stereoselettività delle cicloaddizioni è, invece, meno elevata dato che in genere nelle reazioni bimolecolari si assiste alla formazione di miscele stereoisomeriche derivanti dai due possibili competitivi stati di transizione *endo* ed *exo*. Il primo è favorito da interazioni attrattive di tipo π che si realizzano tra i sostituenti insaturi dei reagenti, il secondo, invece, dalle repulsioni steriche (Figura 6).²³

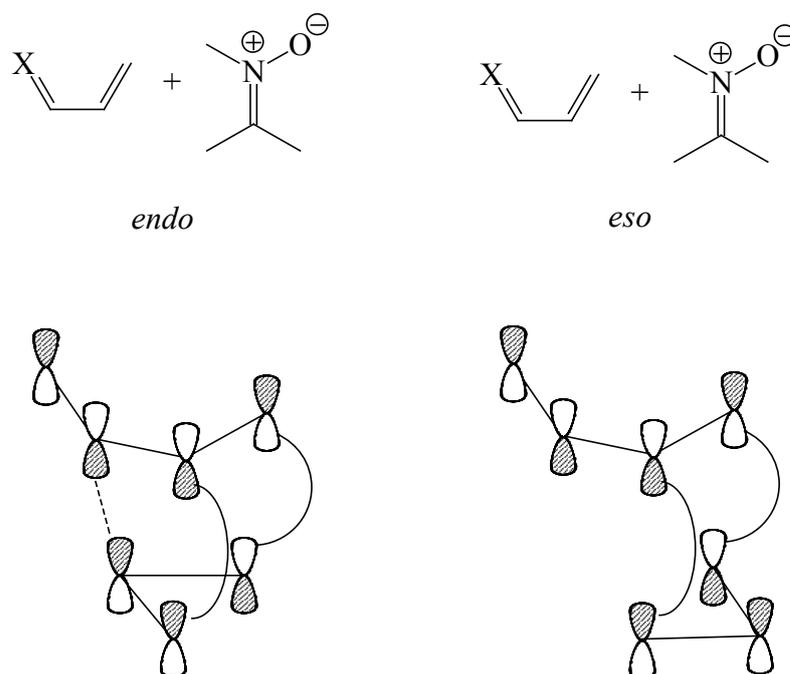
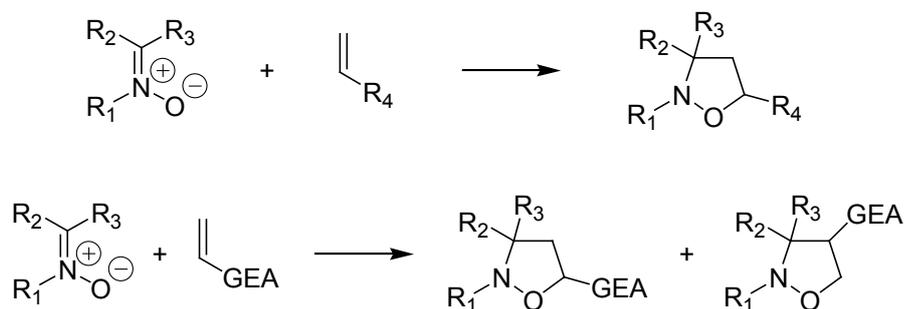


Figura 6

4.2 I nitroni

I nitroni sono degli 1,3-dipoli tipo anione allilico che permettono di ottenere interessanti nuclei isossazolidinici e Δ^4 -isossazolinici per reazione con dipolarofili, rispettivamente olefinici e acetilenici. Con alcheni monosostituiti formano generalmente solo il derivato 5-sostituito mentre, in presenza di gruppi elettron-attrattori, si formano miscele 4-5 regioisomeriche (Schema 2).



GEA = Gruppo Elettron-Attrattore

Schema 2

La presenza sull'atomo di carbonio nitronico di gruppi elettron-donatori, invece, favorisce la formazione di isossazolidine 4-sostituite.

La capacità di gruppi elettronicamente eterogenei di influenzare in modo specifico il decorso di queste reazioni conferma la presenza del doppio controllo orbitale HOMO dipolo LUMO dipolarofilo e viceversa.

La regia da parte del LUMO del dipolo permette la formazione dei derivati 5-sostituiti; nel caso in cui la presenza di gruppi elettron-attrattori trasferisce agli HOMO la responsabilità della regiochimica, vedremo allora formarsi principalmente prodotti 4 sostituiti.²⁴

5. SCOPO DEL LAVORO

Recentemente abbiamo messo a punto la sintesi di una serie di idrocarburi policiclici aromatici isossazolidinici **1–4** (Figura 7),²⁵ dotati di moderata attività intercalante e di discreta citotossicità.

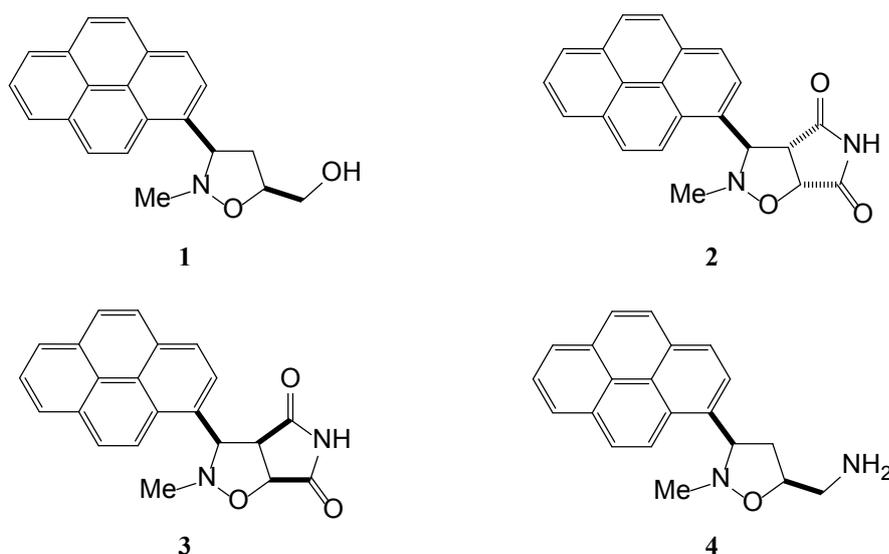


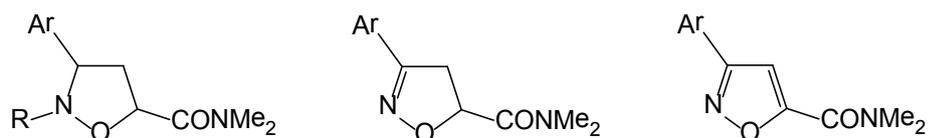
Figura 7

In particolare, il derivato pirenil-isossazolidinico **1** presenta proprietà citotossiche ed esibisce una IC_{50} pari a 112 μ M sulla linea cellulare Molt-3 della leucemia linfoblastica acuta. Sulla base dei risultati ottenuti sono state apportate modifiche strutturali per migliorarne l'affinità. Si sono quindi preparati i derivati isossazolidinici **2–4**, recanti gruppi amminici o immidici ed il sistema pirenilico. La presenza dei sostituenti amminici ed immidici favorisce la formazione di legami idrogeno con specifiche porzioni di DNA.

Si è così osservato che il derivato **4** (Figura 7) predilige, quale *locus* di inser-

zione, le coppie A–T, penetrando dal solco minore, ed ha mostrato, *in vitro*, una buona citotossicità su tutte le linee cellulari testate; le isossazolidine **2** e **3**, invece, prediligono le coppie di basi G–C, inserendosi lungo il solco minore (Figura 7).

La presente trattazione riporta la progettazione, la sintesi e lo studio di una nuova classe di agenti intercalanti il DNA a *core* isossazolidinico, isossazolinico ed isossazolico, recanti i sistemi policiclici aromatici planari del fenantrene, del pirene e della 1,10 fenantrolina, in posizione 3, ed un gruppo carbossamidico o idrossimetilico in posizione 5 (Figure 8 e 9).



Ar: 9-fenantrile, 1-pirenile
R: benzile, metile

Figura 8. Isossazolidinil-, isossazolinil- ed isossazolil-IPA.

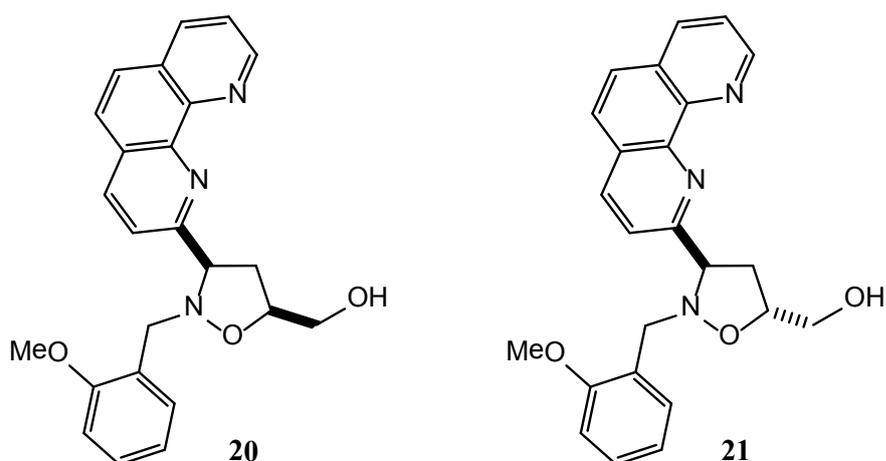
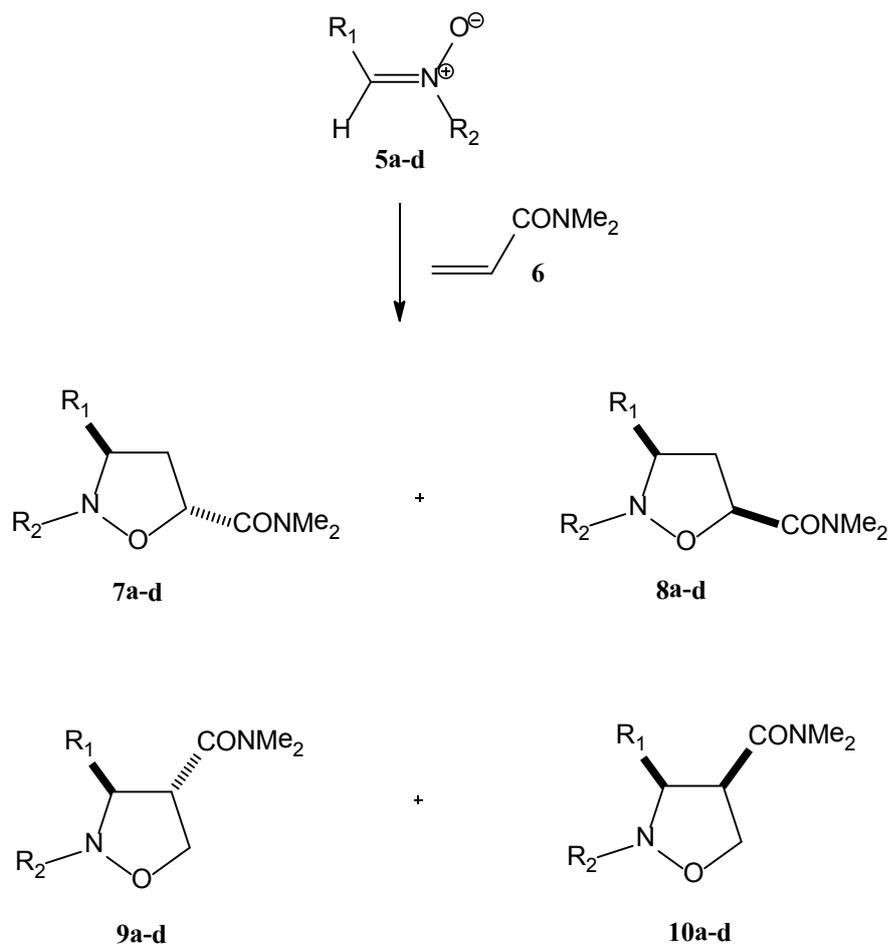


Figura 9

La *ratio* del progetto trova giustificazione nel fatto che i derivati sintetizzati recano requisiti strutturali tali da conferire loro l'affinità e l'attività intercalante desiderata.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti **7–10** sono stati preparati per cicloadizione 1,3-dipolare^{26–28} dei nitroni **5a–d** con la *N,N*-dimetilacrilammide **6** (Schema 3).



NITRONE	R ₁	R ₂
5a	9-fenatrile	Me
5b	9-fenantrile	Bn
5c	1-pirenile	Me
5d	1-pirenile	Bn

Schema 3

I nitroni **5a–d** sono stati sintetizzati per trattamento della 9-fenantrilcarbaldeide o dell'1-pirenilcarbaldeide con la metil- e la benzil-idrossilammina, rispettivamente, con rese dell'89–96%. La configurazione *E/Z* dei nitroni è stata assegnata mediante gli spettri di NOE; in tutti i casi il nitrone in configurazione *Z* è risultato quello predominante. Successivamente, i nitroni **5a–d** sono stati fatti reagire con la *N,N*-dimetilacrilammide, in fiala chiusa a 120 °C, per dare le corrispondenti isossazolidine **7–10** attraverso una reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare. Le rese ed i rapporti tra i diversi stereoisomeri sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Rese e rapporti delle isossazolidine **7–10**.

Nitrone	R ¹	R ²	Rese%	Rapporto 7:8:9:10
5a	9-fenantril	Me	67	1:0:0:0
5b	9-fenantril	Bn	78	1:0:0:0
5c	1-pirenil	Me	71	2:1:1,4:0
5d	1-pirenil	Bn	88	1,4:0:0:1

Dall'analisi della tabella si evince che nel caso della reazione con il fenantrene il processo di cicloaddizione è risultato altamente regio- e stereoselettivo, con l'ottenimento di un'unica isossazolidina 5-sostituita.

Nel caso delle reazioni condotte con i nitroni pirenilici, invece, si sono ottenute miscele stereoisomeriche delle corrispondenti isossazolidine.

In particolare, la cicloaddizione con il nitrone **5c** ha portato ad una miscela di

regioisomeri 4- e 5-sostituiti in cui l'isomero *trans* 5-sostituito è quello prevalente. Infine, dalla reazione con il nitrone **5d** si sono ottenuti solamente due regioisomeri, il 5 *trans* ed il 4 *cis*, in rapporto di 1,4:1.

Tutte le isossazolidine sono state caratterizzate mediante i corrispondenti dati analitici e spettroscopici ^1H e ^{13}C NMR.

I segnali di tutti i protoni sono stati correttamente assegnati con l'ausilio dei dati di spettroscopia bidimensionale omonucleare (COSY).

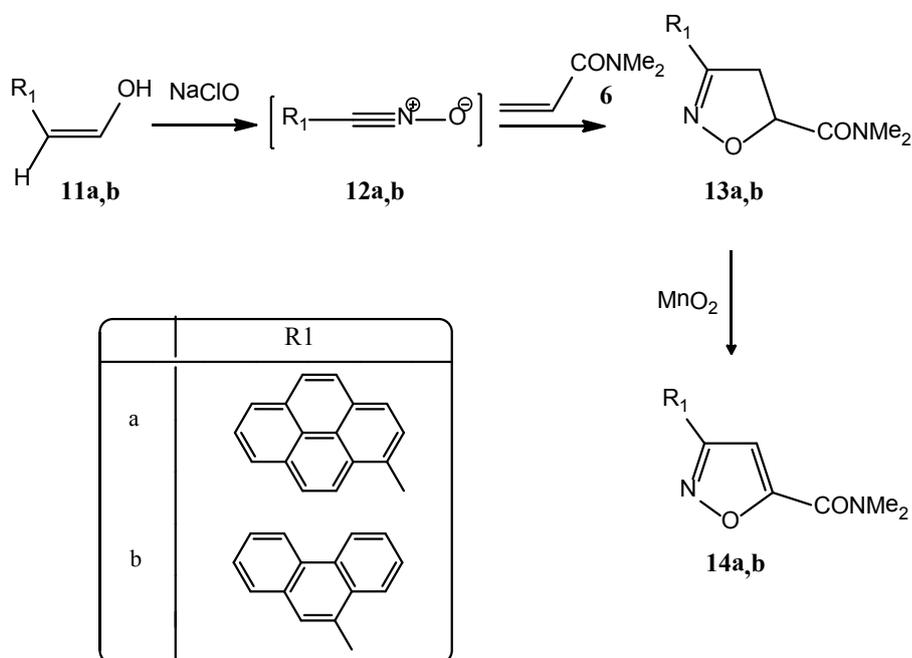
L'assegnazione della stereochimica relativa è stata ricavata dall'analisi degli spettri di differenza NOE.

In particolare, nel composto **7c** l'irraggiamento di H_3 produce NOE positivo su H_{4b} (5,4%), mentre l'irraggiamento di H_5 dà un innalzamento del segnale corrispondente ad H_{4a} (4,8%). Per contro, irradiando H_{4b} si ottiene un NOE positivo per H_3 (5,8%) ed H_5 (0,8%) ed irradiando H_{4a} si ha invece un NOE su H_5 (8,8%). Sia i NOE riscontrati che la loro intensità ci permettono di dedurre che i protoni H_3 ed H_5 si trovano arrangiati in una disposizione di tipo *trans*.

Per contro, nel composto **8c** l'irraggiamento di H_3 , a 4,67 ppm, produce un NOE positivo dell'1,1% con il protone in H_5 , indicando direttamente una disposizione stereotopica in *cis*.

Infine, per il 4-regioisomero **9c** quando viene irradiato il segnale a 5,01 ppm, corrispondente ad H_3 , si ha un innalzamento delle risonanze ad 8,46 ppm (H_9) e 2,85 ppm (CONMe_2) pari al 12,7 ed al 3,7%, rispettivamente, che indica che l'anello pirenilico e la funzionalità carbossamidica sono in *trans*.

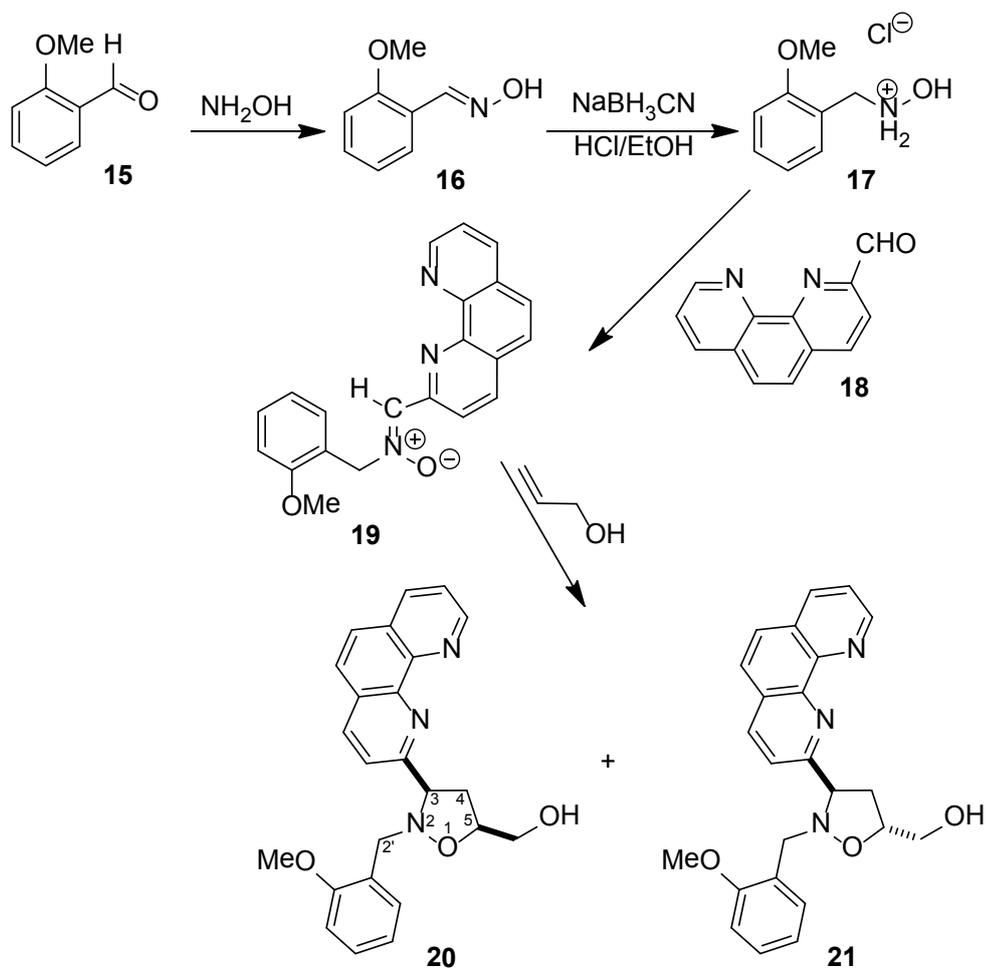
I cicloaddotti **13a–b** sono stati sintetizzati per reazione dei nitrilossidi **12a–b**, preparati per ossidazione delle corrispondenti ossime **11a,b**, con l'ammide **6**. Contrariamente ai nitroni, la maggior parte dei nitrilossidi non presenta una stabilità tale da permetterne l'isolamento e la caratterizzazione e quindi vengono generalmente preparati *in situ*. I derivati isossazolicici **14a,b** sono stati ottenuti per ossidazione delle corrispondenti isossazoline con biossido di manganese (Schema 4).



Schema 4

In entrambi i casi, come noto, si ottengono esclusivamente i regioisomeri 5-sostituiti, in accordo a reazioni simili.¹⁸

I derivati sintetici **20** e **21** sono stati anch'essi preparati per cicloaddizione 1,3-dipolare²⁵⁻²⁸ del nitrone **19** con l'alcool allilico (Schema 5). In particolare, il nitrone **19** è stato preparato in tre stadi a partire dalla 2-metossibenzaldeide **15** che, per trattamento con idrossilammina, è stata convertita nell'aldossima **16**, quest'ultima, per riduzione con sodio cianoboridruro, ha fornito la corrispondente idrossilammina **17** che per reazione con l'1,10-fenantrolina-2-carbaldeide **18**, ottenuta per ossidazione della corrispondente 2-metil-1,10-fenantrolina commercialmente disponibile, ha portato al composto **19**.



Schema 5

Il nitrone **19**, ottenuto con una resa totale del 45,7%, è stato caratterizzato attraverso i dati analitici e spettroscopici ^1H e ^{13}C NMR. In particolare, lo spettro NMR protonico mostra tre singoletti; il primo a 3,87 ppm dovuto al metossile, il secondo a 5,24 ppm inerente il metilene benzilico e l'ultimo a 8,32 ppm attribuito al protone nitronico.

Gli spettri di differenza NOE hanno permesso di stabilire che lo stereoisomero predominante del nitrone è quello *Z*, sebbene sia presente anche una piccola percentuale di isomero *E* ($Z/E \cong 99:1$); nello specifico, l'irraggiamento della risonanza a 5,24 ppm produce un effetto NOE positivo del 7,77% sul protone nitronico indicando che esiste una relazione di tipo *cis*. Successivamente, il nitrone **19** è stato fatto reagire con l'alcool allilico per ottenere le isossazolidine **20** e **21** con le rese indicate nella Tabella 3.

Tabella 3. Rese e rapporti delle isossazolidine **20** e **21**.

Resa %	Resa % di 20	Resa % di 21	Rapporto 20:21
78,0	43,5	34,5	1,26:1

La reazione di cicloaddizione procede esibendo elevata regioselettività ma scarsa stereoselettività, fornendo esclusivamente i regioisomeri 5-sostituiti ed i relativi stereoisomeri *cis* e *trans* nel rapporto di circa 1:1.

La regiochimica del processo di cicloaddizione è stata facilmente dedotta dai dati ^1H NMR.

In ogni caso, per i cicloaddotti **20** e **21** si è registrato esclusivamente un solo segnale protonico a 4,75 e 4,81 ppm, rispettivamente corrispondente al protone

H₃.

È noto, infatti, che gli isomeri 4-sostituiti non mostrano una risonanza a questo valore di spostamento chimico. I segnali di tutti i protoni sono stati correttamente assegnati con l'ausilio dei dati di spettroscopia bidimensionale omonucleare (CO-SY).

L'assegnazione della stereochimica relativa è stata ricavata dall'analisi degli spettri di differenza NOE. In particolare, per il composto **20** l'irraggiamento di H₅, a 4,55 ppm, produce un NOE positivo del 6,4% con il protone metilenico H_{4b} centrato a 3,10 ppm ed un altro dello 0,9% con il protone H₃ centrato a 4,75 ppm. Per contro, quando viene irradiato il protone H_{4a} si produce una debole risposta NOE su H₅ e nulla su H₃. Questi dati sono perfettamente in accordo con una disposizione stereotopica in *cis* dei protoni H₃ ed H₅.

Viceversa, nel composto **21**, mentre l'irraggiamento di H₅ produce NOE positivo su H_{4a} (4,8%), l'irraggiamento di H₃ dà un innalzamento del solo segnale corrispondente ad H_{4b} (6,9%). Per contro, irradiando H_{4b} si ottiene un NOE positivo per H₅ (3,9%) ed H₃ (9,2%) ed irradiando H_{4a} si ha invece un NOE solo su H₅ (6,9%). Ancora una volta, sia i NOE riscontrati che la loro intensità ci permettono di dedurre che i protoni H₃ ed H₅ si trovano arrangiati in una disposizione di tipo *trans*.

I risultati degli studi spettroscopici ¹H NMR e degli esperimenti NOE sono stati confermati dai calcoli semiempirici riportati in tabella 4. Da tali calcoli si desume che le isossazolidine provengono da un approccio *eso* ed *endo* del dipolarofilo

con il nitrone in configurazione *E*, in quanto sono proprio questi gli stati di transizione a più bassa energia. Quindi, sebbene il nitrone esista prevalentemente come isomero *Z*, quello *E* risulta più reattivo.

Tabella 4. Entalpie di formazione AM1 per gli stati di transizione.

ΔH_f <i>Z-eso</i>	ΔH_f <i>Z-endo</i>	ΔH_f <i>E-eso</i>	ΔH_f <i>E-endo</i>	Rapporto calcolato 20:21	Rapporto sperimentale 20:21
81,17 ^a	81,52	79,69	79,52	1,35:1	1,26:1

^aTutti i valori sono in kcal/mol.

Gli stati di transizione più stabili che portano alla formazione dei composti **20** e **21** sono riportati in figura 10.

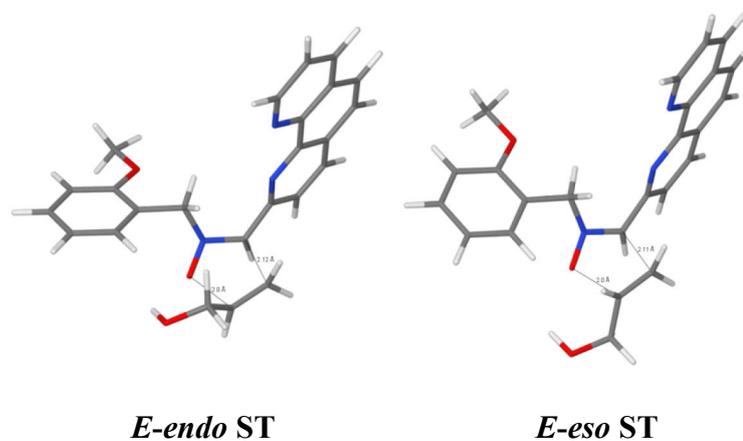


Figura 10

7. VALUTAZIONE BIOLOGICA

L'attività biologica dei composti *de novo* sintetizzati è stata indagata mediante saggi colorimetrici con i sali di tetrazolio (MTS) e la sulforodamina B (SRB) sulle linee cellulari isolate dal tumore del collo dell'utero (HeLa), dall'adenocarcinoma polmonare (A-549), dalla leucemia linfoblastica acuta (Molt-3), dalla leucemia monocitica acuta (TPH-1), dal linfoma istiocitico (U-937) e su una linea di cellule epiteliali isolate dal rene di una scimmia africana (Vero). L'esecuzione di tali saggi *in vitro* ha consentito di valutare la citotossicità dei composti **7–10**, **13** e **14**.²⁶

Tutte le linee cellulari impiegate, fatta eccezione per le cellule Vero, sono linee cellulari tumorali scelte in ragione della loro spiccata dedifferenziazione, resistenza ed aggressività.

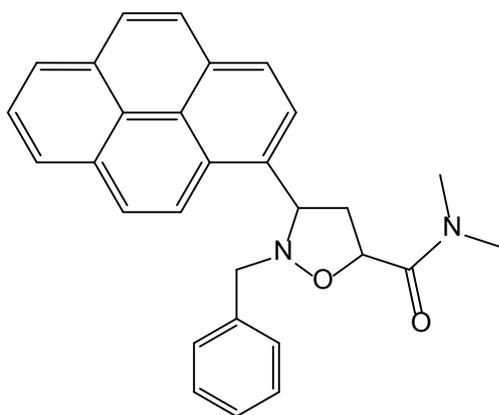
Le cellule Vero, invece, sono caratterizzate dall'essere cellule continue e non senescenti. Esse, infatti, sono estremamente prolifiche e, se sottoposte a cicli replicativi successivi, non invecchiano.

I risultati ottenuti e riportati in tabella 5 mostrano che il derivato pirenil-isossazolidinico **7d** (Figura 11) risulta essere il più attivo della serie, esibendo sulla linea cellulare A-549 un valore di IC₅₀ pari a 4 µM.

Tabella 5. Citotossicità dei composti **7–10**, **13** e **14** mediante saggi con MTS o SRB.

Composto	IC ₅₀ (μM)					
	HeLa	A-549	Molt-3	THP-1	U-937	Vero
7a	86	68	105	95	98	160
7b	14	10	15	17	100	115
7c	63	41	52	60	165	141
7d	5	4	6	6	37	42
8c	75	55	69	75	199	163
9c	65	44	59	61	185	143
10d	79	63	100	93	102	151
13a	401	435	>500	>500	>500	>500
13b	69	49	65	69	194	160
14a	290	335	420	403	>500	>500
14b	71	60	73	78	202	165

^aCiascun valore è stato determinato per tre volte impiegando un'analisi di regressione non lineare.

**7d****Figura 11**

Al fine di confermare e razionalizzare i risultati biologici ed avere un quadro più chiaro rispetto alla modalità di intercalazione, i complessi dei composti **7–10**, **13** e **14** con il DNA sono stati indagati mediante studi di modellistica molecolare che si sono avvalsi del programma Autodock 4.²⁹

I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli isossazolidinil-IPA mostrano le migliori proprietà intercalanti. In particolare, come riportato in tabella 6, il composto **7d** si lega al DNA penetrando lungo il solco minore e mostra una netta preferenza per le coppie A–T. Mediante studi di binding per titolazione con i polinucleotidi poli-d(AT)₂ e poli-d(GC)₂ è stato osservato che il composto **7d** si lega al DNA del timo di vitello con una costante di legame di $1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ per inserzione preferenziale tra le coppie A–T. L'affinità del composto **7d** per le basi azotate A–T è rispettivamente 46,9 e 3,3 volte maggiore di quella dei composti **1** e **4**.

Tabella 6. Energie di legame calcolate per i composti **7–10**, **13** e **14** intercalati con i poli-nucleotidi Poli d(AT)₂ e Poli d(GC)₂.

Poli-AT		
Composto	SOLCO MAGGIORE	SOLCO MINORE
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7a (<i>trans</i>)	-8,79	-9,81
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7b (<i>trans</i>)	-9,35	-11,35
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7c (<i>trans</i>)	-9,40	-10,57
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7d (<i>trans</i>)	-9,78	-12,06
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 8c (<i>cis</i>)	-9,21	-10,17
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 9c (<i>trans</i>)	-9,74	-10,30
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 10d (<i>cis</i>)	-9,31	-9,87
(5 <i>S</i>)- 13a	-8,84	-8,97
(5 <i>S</i>)- 13b	-9,15	-10,20
14a	-9,20	-9,26
14b	-9,59	-10,17

Poli-GC		
Composto	SOLCO MAGGIORE	SOLCO MINORE
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7a (<i>trans</i>)	-8,12	-8,80
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7b (<i>trans</i>)	-9,16	-9,99
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7c (<i>trans</i>)	-9,35	-9,83
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 7d (<i>trans</i>)	-9,67	-10,57
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 8c (<i>cis</i>)	-9,43	-10,15
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 9c (<i>trans</i>)	-9,21	-9,74
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 10d (<i>cis</i>)	-9,22	-10,00
(5 <i>S</i>)- 13a	-7,78	-8,39
(5 <i>S</i>)- 13b	-9,21	-9,96
14a	-7,72	-8,56
14b	-8,66	-9,11

^aTutti i valori sono espressi in kcal/mol.

È stata poi valutata anche la citotossicità degli isossazolidinil-IPA **20** e **21** (Figura 12), mediante il già citato saggio colorimetrico che impiega i sali di tetrazolio (Tabella 7), sulle linee cellulari HeLa, HN6 ed HN13. Queste due ultime linee cellulari, isolate dai tumori a cellule squamose di testa e collo, sono caratterizzate da un elevato grado di dedifferenziazione ed aggressività. In tabella 7 sono riportati i valori di IC₅₀ dei due derivati e quelli relativi al cisplatino, farmaco la cui somministrazione si accompagna alla comparsa di effetti tossici assai poco tollerabili e che trova impiego nei protocolli terapeutici delle neoplasie a cellule squamose di testa e collo. Dall'osservazione dei risultati del saggio si può desumere che il cicloaddotto **20** è più attivo del **21**. Va inoltre sottolineato che, se paragonato al cisplatino, il composto **20** mostra valori di IC₅₀ confrontabili con esso sulle linee cellulari HeLa e HN6 ed una migliore attività citotossica sulla linea HN13.

Tabella 7. Citotossicità dei composti **20** e **21** mediante saggio con MTS.

Composto	IC ₅₀ (μM)		
	HeLa	HN6	HN13
20	13	6	4,5
21	40	24	25
cisplatino	13	6,5	12,5

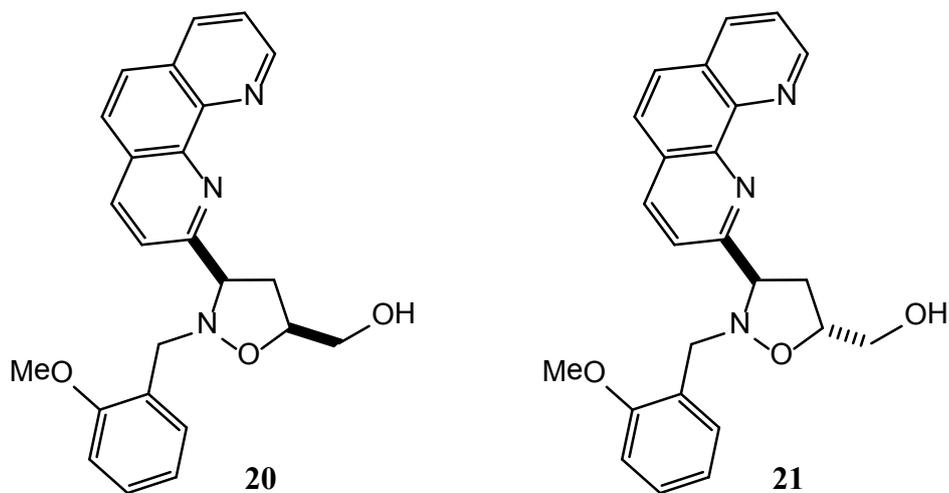


Figura 12

Infine, è stata indagata, mediante elettroforesi su gel di agarosio, la capacità inibente dei derivati **20** e **21** nei confronti di uno dei presunti bersagli biologici (Figura 13). Il saggio si è sviluppato mediante la comparazione delle corse elettroforetiche del DNA plasmidico superavvolto, dello stesso incubato con sola topoisomerasi I ed ancora del DNA incubato e con l'enzima e con i composti testati. I risultati ottenuti dimostrano che entrambi i derivati esercitano azione inibitoria sull'attività catalitica della topoisomerasi I.

Elettroforesi su gel di agarosio

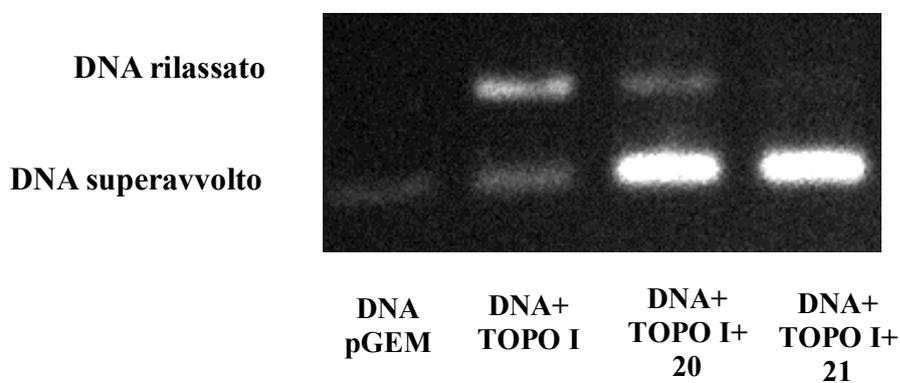


Figura 13

8. CONCLUSIONI

Il lavoro effettuato ha portato, sfruttando le potenzialità della reazione di cicloaddizione 1,3-dipolare, alla sintesi di isossazol-, isossazolinil- ed isossazolidinil-IPA. I risultati ottenuti hanno mostrato che della serie suddetta le migliori proprietà intercalanti sono possedute dai derivati a *core* isossazolidinico. In particolare, il composto **20**, dotato di buona citotossicità su tutte le linee cellulari testate, presenta una IC_{50} pari a 4,5 μ M sulla linea cellulare HN13 isolata dai tumori a cellule squamose di testa e collo. È stato, inoltre, dimostrato che tale composto è capace di inibire la topoisomerasi I.

9. PARTE SPERIMENTALE

9.1 *Materiali e metodi impiegati nelle procedure sintetiche*

Procedure generali. I punti di fusione, determinati con l'ausilio di un apparecchio Kofler, non sono stati corretti. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UNITY Inova operante a 500 MHz per il protone ed a 125 MHz per il carbonio 13 e sono stati riportati in ppm rispetto al TMS o al solvente. La cromatografia su strato sottile è stata eseguita con lastre Merck 60 F₂₅₄. La flash cromatografia ha impiegato il gel di silice della Merck (0.040–0.063 mm). Tutte le reazioni che coinvolgono agenti sensibili all'aria, sono state condotte sotto atmosfera d'azoto. Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Aldrich o dalla Acros Chimica e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi per cromatografia sono stati distillati sotto pressione atmosferica prima di essere utilizzati ed anidrificati con le procedure standard.

Sintesi dei nitroni 5 a–d

Procedura generale. Ad una soluzione di acetato di sodio (528 mg, 6.4 mmol) in diclorometano (150 mL) si aggiunge alla temperatura di 0 °C, l'alchilidrossilammina cloridrato (534 mg, 6.4 mmol) e successivamente la corrispondente aldeide (1 g, 4.3 mmol). La reazione procede per un'ora sempre a 0 °C, per poi continuare a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela di reazione è filtrata ed evaporata a pressione ridotta e fornisce un solido.

(Z)-C-(9-fenantril)-N-metil nitrone (5a). Resa 94%, solido bianco: p.f. 200–202

°C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.05 (s, 3H, *N*-Me), 7.61–8.05 (m, 6H), 8.15 (s, 1H, HC=N), 8.63 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H_4), 8.74 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H_5), 9.93 (s, 1H, H_{10}). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 55.36, 122.19, 122.29, 123.55, 123.61, 126.56, 126.95, 127.06, 128.14, 128.76, 129.00, 130.34, 130.44, 130.75, 131.00, 131.12. Anal. Calc per $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}$: C, 81.68; H, 5.95; N, 6.80%. Trovato: C, 81.83; H, 5.94; N, 6.79%.

(*Z*)-C-(9-fenantril)-*N*-benzil nitrone (5b). Resa 90%, solido bianco: p.f. 164–166 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 5.25, (s, 2H), 7.35–7.69 (m, 9H), 7.91 (dd, 1H, $J=7.0$ e 8.5 Hz, H_1), 7.97 (dd, 1H, $J=1.3$ e 8.1 Hz, H_8) 8.21 (s, 1H, HC=N), 8.63 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H_4), 8.74 (dd, 1H, $J=1.3$ e 8.1 Hz, H_5), 9.98 (s, 1H, H_{10}). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 72.05, 122.08, 122.24, 123.46, 123.50, 126.47, 126.90, 127.02, 128.11, 128.85, 129.04, 129.09, 129.25, 129.92, 130.32, 130.40, 130.98, 131.10, 133.29. Anal. Calc per $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}$: C, 84.86; H, 5.50; N, 4.50%. Trovato: C, 85.06; H, 5.48; N, 4.47%.

***Z*-C-(1-pirenil)-*N*-metil nitrone (5c).** Rapporto *Z/E* = 15:1. Resa 89%, solido giallo: p.f. 177–181 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.05 (s, 3H, *N*-Me), 7.95–8.23 (m, 8H), 8.25 (s, 1H, HC=N), 9.79 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H_9). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 55.27, 121.16, 123.22, 124.82, 125.36, 125.69, 126.06, 126.12, 127.15, 127.32, 128.44, 128.49, 129.90, 130.36, 131.17, 131.50, 132.64. Anal. Calc per $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}$: C, 83.37; H, 5.05; N, 5.40%. Trovato: C, 83.12; H, 5.08; N, 5.43%.

(*Z*)-C-(1-pirenil)-*N*-benzil nitrone (5d). Rapporto *Z/E* = 10:1. Resa 96%, solido

giallo: p.f. 128–130 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 5.25 (s, 2H), 7.42–8.15 (m, 13H), 8.35 (s, 1H, HC=N), 9.82 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, H₉). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 71.95, 121.01, 123.07, 124.92, 125.46, 126.00, 126.03, 127.49, 128.43, 129.04, 129.32, 130.26, 130.73, 131.08, 132.63, 133.42, 134.38, 135.21, 135.36. Anal. Calc per $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{NO}$: C, 85.94; H, 5.11; N, 4.18%. Trovato: C, 85.76; H, 5.13; N, 4.21%.

Sintesi delle isossazolidine 7–10

Procedura generale. Ad una soluzione del nitrone **5** (7,6 mmol), in toluene anidro (20 mL), si addiziona la *N,N*-dimetilacrilammide (1,84g, 11,4 mmol). Si riscalda sino ad una temperatura pari a 120 °C e si mantiene la reazione a tale temperatura per 12 ore. Si allontanano i solventi a pressione ridotta e si purifica il residuo mediante flash-cromatografia (cicloesano/acetato di etile, 80:20).

(3*RS*,5*RS*)-*N,N*-2-Trimetil-3-(fenantren-1-il)isossazolidina-5-carbossammide

(7a). Resa 67%, solido giallo amorfo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.42 (m, 1H, H_{4a}), 2.84 (s, 3H, *N*-Me), 3.03 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 3.53 (m, 1H, H_{4b}), 4.55 (m, 1H, H₃), 4.92 (m, 1H, $J=5.7$ e 7.5 Hz, H₅), 7.57–8.75 (m, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 35.9, 37.0, 37.1, 69.0, 69.6, 74.6, 122.4, 123.2, 124.1, 124.3, 126.4, 126.5, 126.8, 126.9, 128.7, 128.8, 129.9, 130.2, 131.5, 169.0. Anal. Calc per $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 75.42; H, 6.63; N, 8.38%. Trovato: C, 75.26; H, 6.62; N, 8.41%.

(3*RS*,5*RS*)-2-Benzil-*N,N*-dimetil-3-(fenantren-1-il)isossazolidina-5-

carbossammide (7b). Resa 78%, solido giallo amorfo. ^1H NMR (C_6D_6 , 500 MHz): 2.30 (m, 1H, $J=6.8$, 8.3 e 12.4 Hz, H_{4a}), 2.36 (s, 3H), 2.62 (s, 3H), 3.86 (m,

1H, $J=5.9$, 8.1 e 12.4 Hz, H_{4b}), 3.9 (s, 2H, CH₂Ph), 4.24 (dd, 1H, $J=5.9$ e 8.3 Hz, H₅), 4.77 (t, 1H, $J=6.8$ e 8.1 Hz, H₃), 7.09–7.22 (m, 5H), 7.34–8.50 (m, 9H). ¹³C NMR (C₆D₆, 125 MHz): 27.2, 30.2, 30.4, 39.4, 61.5, 67.4, 75.3, 122.8, 123.7, 124.7, 124.9, 126.5, 127.2, 129.2, 130.5, 130.8, 131.4, 132.3, 135.3, 138.9, 168.6. Anal. Calc per C₂₇H₂₆N₂O₂: C, 79.00; H, 6.38; N, 6.82%. Trovato: C, 79.16; H, 6.33; N, 6.81%.

(3SR,5RS)-N,N-2-Trimetil-3-(piren-1-il)isossazolidina-5-carbossammide (7c).

Resa 32%, solido giallo amorfo. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 2.58 (m, 1H, $J=8.4$ e 12.3 Hz, H_{4a}), 2.79 (s, 3H, N-Me), 3.05 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.56 (m, 1H, $J=5.1$, 7.6 e 12.3 Hz, H_{4b}), 4.82 (m, 1H, H₃), 5.02 (ddd, 1H, $J=5.1$ e 8.4 Hz, H₅), 8.01–8.46 (m, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 26.9, 29.7, 35.9, 37.1, 69.1, 74.6, 113.9, 122.6, 124, 124.8, 124.9, 125.1, 125.14, 125.2, 126.0, 127.3, 127.8, 128.7, 130.6, 131.3, 168.9. Anal. Calc per C₂₃H₂₂N₂O₂: C, 77.07; H, 6.19; N, 7.82%. Trovato: C, 76.84; H, 6.20; N, 7.84%.

(3RS,5SR)-N,N-2-Trimetil-3-(piren-1-il)isossazolidina-5-carbossammide (8c).

Resa 16%, solido amorfo brunastro. ¹H NMR (CDCl₃, 500MHz): 2.76 (s, 3H, N-Me), 3.06 (s, 3H), 3.30 (m, 1H, H_{4b}), 4.67 (m, 1H, H₃), 5.02 (dd, 1H, $J=5.6$ e 8.4 Hz, H₅), 8.01–8.46 (m, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 27.3, 29.7, 36.4, 37.2, 68.6, 74.7, 113.9, 124.0, 124.8, 125.0, 125.1, 125.2, 125.3, 125.9, 126.0, 127.4, 127.5, 127.7, 127.8, 130.6, 131.3, 170.3. Anal. Calc per C₂₃H₂₂N₂O₂: C, 77.07; H, 6.19; N, 7.82%. Trovato: C, 77.23; H, 6.18; N, 7.81%.

(3RS,4SR)-N,N-2-Trimetil-3-(piren-1-il)isossazolidina-4-carbossammide (9c).

Resa 23%, solido giallo amorfo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.31 (s, 3H, *N*-Me), 2.76 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 3.97 (m, 1H, H_4), 4.42 (m, 2H, H_5), 5.01 (d, 1H, $J=5.6$ Hz, H_3), 8.00–8.46 (m, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 19.0, 19.2, 26.7, 26.8, 36.4, 52.2, 53.0, 62.7, 127.6, 127.8, 129.6, 129.9, 132.7, 133.5, 135.5. Anal. Calc per $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 77.07; H, 6.19; N, 7.82%. Trovato: C, 76.89; H, 6.21; N, 7.82%.

(3*SR*,5*SR*)-2-Benzil-*N,N*-dimetil-3-(piren-1-il)isossazolidina-5-carbossammide (7d). Resa 52%, solido giallo amorfo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.62 (ddd, 1H, $J=7.7$, 8.3 e 12.5 Hz, H_{4a}), 3.04 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.62 (m, 1H, $J=4.9$, 7.7 e 12.5 Hz, H_{4b}), 4.056 (dd, 2H, $J=14.3$ Hz, CH_2Ph), 4.98 (dd, 1H, $J=4.9$ e 8.3 Hz, H_5), 5.14 (t, 1H, $J=7.7$ Hz, H_3), 7.21–7.38 (m, 5H), 8.00–8.47 (m, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 33.28, 35.9, 37.1, 52.0, 61.1, 66.9, 75.0, 122.7, 124.2, 124.8, 125.0, 125.1, 125.3, 126.0, 127.1, 127.3, 127.4, 127.8, 128.1, 128.7, 129.0, 130.7, 131.3, 133.2, 137.8, 168.35. Anal. Calc per $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 80.16; H, 6.03; N, 6.45%. Trovato: C, 80.31; H, 6.04; N, 6.44%.

(3*RS*,4*SR*)-2-Benzil-*N,N*-dimetil-3-(piren-1-il)isossazolidina-4-carbossammide (10d). Resa 36%, solido giallo amorfo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.20 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 3.74–4.02 (dd, 2H, $J=14.4$ Hz, CH_2Ph), 4.15 (dd, 1H, $J=9.5$ Hz, H_4), 4.32 (t, 1H, $J=8.3$ Hz, H_{5a}), 4.93 (t, 1H, $J=7.27$, 8.3 Hz, H_{5b}), 5.13 (m, 1H, $J=9.5$ Hz, H_3), 7.15–7.30 (m, 5H), 8.00–8.44 (m, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 29.7, 35.1, 37.1, 49.8, 52.0, 57.2, 59.4, 69.7, 124.4, 125.0, 125.6, 125.9, 127.1, 127.5, 127.7, 128.0, 128.1, 128.9, 129.2, 130.4, 130.9, 131.3. Anal. Calc per

C₂₉H₂₆N₂O₂: C, 80.16; H, 6.03; N, 6.45%. Trovato: C, 80.01; H, 6.02; N, 6.47%.

Sintesi delle isossazoline 13a e 13b

Procedura generale. Alla miscela che del composto **11** (10 mmol) e della *N,N*-dimetilacrilammide **6** (11,4 mmol) in diclorometano viene addizionata, goccia a goccia e sotto vigorosa agitazione, una soluzione di ipoclorito di sodio al 7% (10 mL) ad una temperatura di 0 °C. Trascorse 3 ore la miscela di reazione va rotovaporata ed il residuo, purificato mediante flash-cromatografia (cicloesano/acetato di etile, 60:40), fornisce i cicloaddotti **13**.

***N,N*-2-Trimetil-3-(fenantren-1-il)-4,5-diidroisossazolo-5-carbossammide**

(13a). Resa 92%, solido bianco, p.f. 68–70 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.07 (s, 3H), 3.3 (s, 3H), 3.64 (dd, 1H, *J*=11.0 e 16.6 Hz, H_{4a}), 4.54 (dd, 1H, *J*=7.4 e 16.6 Hz, H_{4b}), 5.45 (dd, 1H, *J*=7.4 e 11.0 Hz, H₅), 7.25–8.90 (m, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 35.7, 36.2, 40.0, 52.0, 120.5, 122.6, 122.8, 124.2, 125.0, 127.0, 127.4, 127.7, 128.1, 129.1, 129.9, 130.6, 130.7, 131.1, 158.0. Anal. Calc per C₂₁H₂₀N₂O: C, 79.72; H, 6.37; N, 8.85%. Trovato: C, 79.58; H, 6.34; N, 8.87%.

***N,N*-2-Dimetil-3-(piren-1-il)-4,5-diidroisossazolo-5-carbossammide (13b).** Re-

sa 62%, solido giallo, p.f. 182–184 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.07 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 3.69 (m, 1H, *J*=10.9 e 16.2 Hz, H_{4b}), 4.58 (m, 1H, *J*=7.5 e 16.2 Hz, H_{4a}), 5.48 (m, 1H, *J*=7.5 e 10.9 Hz, H₅), 8.00–9.15 (m, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 36.2, 37.4, 40.3, 122.7, 124.5, 125.7, 125.9, 126.3, 126.8, 128.8, 129.0, 129.3, 130.7, 131.2, 132.5, 158.42, 167.5. Anal. Calc per C₂₂H₁₈N₂O₂: C,

77.17; H, 5.30; N, 8.18%. Trovato: C, 77.31; H, 5.31; N, 8.16%.

Sintesi degli isossazoli 14a e 14b

Procedura generale. Alla soluzione di **13a** e **13b** (2 mmol) in toluene (40 mL), a temperatura ambiente e sotto agitazione, viene addizionato l'ossido di manganese attivato (2,0 g). La sospensione che ne risulta è lasciata a riflusso per 12 ore. La miscela di reazione va filtrata ed il solido risultante viene lavato con diclorometano e purificato mediante cromatografia radiale (cicloesano/acetato di etile, 85:15) per fornire, rispettivamente, i composti **14a** e **14b**.

***N,N*-dimetil-3-(fenantren-9-il)isossazolo-5-carbossammide (14a)**. Resa 79%, solido giallo, p.f. 41–44 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.27 (s, 3 H), 3.46 (s, 3 H), 7.25 (s, 1 H), 7.69–7.85 (m, 4 H), 8.02 (dd, *J*=1.4, 7.8 Hz, 1 H), 8.09 (s, 1 H), 8.42 (dd, *J*=1.8, 7.8 Hz, 1 H), 8.77–8.81 (m, 2 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 36.3, 38.2, 109.7, 122.6, 122.8, 123.1, 124.6, 125.4, 126.1, 127.1, 127.2, 127.9, 129.2, 129.3, 129.6, 130.7, 130.9, 158.2, 162.5, 164.4. Anal. Calc per C₂₀H₁₆N₂O₂: C, 75.93; H, 5.10; N 8.86%. Trovato C, 75.83; H, 5.20; N 8.80%.

***N,N*-dimetil-3-(piren-1-il)isossazolo-5-carbossammide (14b)** Resa 75%, solido giallo, p.f. 174–176 °C ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.22 (s, 3 H), 3.43 (s, 3 H), 7.29 (s, 1 H, 4 H), 8.03–8.29 (m, 8 H), 8.67 (d, 1 H, *J*=9.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 36.4, 38.2, 110.0, 122.5, 124.4, 124.7, 125.7, 125.9, 126.3, 127.2, 127.5, 128.7, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 130.7, 131.2, 132.5, 158.3, 163.0, 164.6. Anal. Calc per C₂₂H₁₆N₂O₂: C, 77.63; H, 4.74; N 8.23%. Trovato C, 77.7; H, 5.1; N 8.10%.

Sintesi della 2-anisaldossima 16

Ad una soluzione di acetato di sodio (3,69 g, 0,05 mol) in acqua ed etanolo (50 mL, 1:5) si aggiunge l'idrossilammina cloridrato (2,08 g, 0,015 mol) e successivamente la 2-anisaldehyde **15** (1,8 mL, 2 g, 0,015 mol) a 0 °C. La miscela di reazione va lasciata sotto agitazione a t.a. per 2h. Si allontana il solvente a pressione ridotta e si estrae il composto con diclorometano (2 × 50 mL). Si ottiene un solido bianco. Resa 98%; p.f. 88–90 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3.86 (s, 3H), 6.91–7.68 (m, 4H), 8.40 (bs, 1H, OH), 8.48 (s, 1H). Anal. Calc per C₈H₉NO₂: C, 63.56; H, 6.00; N, 9.27%. Trovato: C, 63.68; H, 5.99; N, 9.29%.

Sintesi della 2-anisolidrossilammina 17

Ad una soluzione di 2-anisaldossima **16** (2,15 g, 0,014 mol) in MeOH anidro (30 mL), contenente tracce di metilarancio, si addiziona NaBH₃CN (1,76 g, 0,028 mol). Successivamente si aggiunge, goccia a goccia, HCl-EtOH 2,5M fino ad ottenere una colorazione rosa persistente. La reazione procede sotto agitazione per 4h. Il metanolo viene rimosso a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto è un solido cristallino di aspetto lattiginoso. Resa 98%, p.f. 136–139 °C. ¹H NMR (DMSO, 500 MHz): 3.81 (s, 3H, CH₃), 4.27 (s, 2H, CH₂), 6.96–7.43 (m, 4H), 10.98 (bs, 2H, NH₂), 11.46 (bs, 1H, OH). ¹³C NMR (DMSO, 500 MHz): 48.96, 55.52, 110.95, 117.61, 120.08, 130.80, 132.07, 157.66. Anal. Calc per C₈H₁₁NO₂•HCl: C, 50.67; H, 6.38; N, 7.39%. Trovato: C, 50.78; H, 6.37; N, 7.37%.

Sintesi della 1,10-fenantrolin-2-carbaldeide 18

Ad una soluzione di 2-metil-1,10-fenantrolina (0,98 g, 0,005 mol) si aggiunge il diossido di selenio (1,66 g, 0,015 mol) in diossano anidro (50 mL). La soluzione è riflussata per 2h. Il solvente è rimosso a pressione ridotta ed il residuo filtrato su celite con metanolo. Dopo evaporazione del solvente si ottiene un solido giallo. Resa 95,6%, p.f. 153–155 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 7.72–9.31 (m, 7H), 10.53 (s, 1H). Anal. Calc per $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$: C, 74.99, H, 3.87, N, 13.45%. Trovato: C, 74.75; H, 3.87; N, 13.48%.

Sintesi del nitrone 19

Ad una soluzione di acetato di sodio (0,79g, 0,0096 mol) in diclorometano anidro (50 mL) si addiziona l'anisolidrossilammina cloridrato **17** (1,33 g, 0,0096 mol) a 0 °C e di seguito la 1,10-fenantrolina-2-carbaldeide **18** (0,67 g, 0,0032 mol). La reazione procede a 0 °C per 30 minuti e a t.a. per tutta la notte. La miscela di reazione va quindi trattata con una soluzione satura di bicarbonato di sodio ed il composto estratto con diclorometano (3×50 mL). Si anidrifica con solfato di sodio, si filtra e si allontana il solvente a pressione ridotta. Il prodotto di reazione viene purificato mediante flash cromatografia impiegando come eluente una miscela di cloroformio saturato con idrossido di ammonio e cicloesano nel rapporto 40:60. Rapporto *Z/E* = 99:1. Resa 49,8%; p.f. 198–204 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 3.87 (s, 3H, OCH_3), 5.24 (s, 2H, CH_2), 6.94–8.31 (m, 10H), 8.32 (s, 1H), 9.19 (dd, 1H, $J=4.2$ e 6.5 Hz), 9.51 (d, 1H, $J=8.5$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500

MHz): 48.12, 50.27, 61.23, 62.67, 105.55, 105.81, 115.46, 115.49, 115.57, 117.89, 117.98, 121.17, 121.82, 123.60, 123.68, 125.56, 125.73, 126.85, 131.01, 131.22, 131.49, 140.66, 140.75, 144.99, 145.06, 152.66. Anal. Calc per $C_{21}H_{17}N_3O_2$: C, 73.45; H, 4.99; N, 12.24%. Trovato: C, 73.32; H, 4.97; N, 12.28%.

Sintesi isossazolidine 20 e 21

Al nitrone **19** (0,50 g, 0,012 mol) si addiziona l'alcool allilico (7 mL). La reazione è condotta in fiala chiusa ad una temperatura di 100 °C per 3h. La miscela di reazione è evaporata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è purificato mediante flash cromatografia impiegando quale eluente una miscela cloroformio/metanolo/trietilammina (98:1:1)

[(3*RS*,5*SR*)-2-(2-metossibenzil)-3-(1,10-fenantrolin-2-il)isossazolidin-5-

il]metanolo 20. Resa 43,5%, solido amorfo giallo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.66 (ddd, 1H, $J=6.8$, 7.7 e 14.3 Hz, H_{4a}), 3.10 (ddd, 1H, $J=7.1$, 7.9 e 14.3 Hz, H_{4b}), 3.31 (bs, 1H, OH), 3.67 (dd, 1H, $J=3.1$ e 12.5 Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.82 (dd, 1H, $J=4.7$ e 12.5 Hz, $\text{H}_{5'b}$), 4.06 (d, 1H, $J=13.5$ Hz, $\text{H}_{2'a}$), 4.18 (d, 1H, $J=13.5$ Hz, $\text{H}_{2'b}$), 4.55 (dddd, 1H, $J=3.1$, 4.7, 6.8 e 7.1 Hz, H_5), 4.75 (dd, 1H, $J=7.7$ e 7.9 Hz, H_3), 6.79–7.19 (m, 4H, protoni fenilici), 7.48–8.25 (m, 6H, protoni fenantrolinici), 9.22 (dd, 1H, $J=1.2$ e 4.1 Hz, H_9). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 38.58, 55.06, 55.37, 63.54, 65.81, 70.15, 110.82, 121.54, 122.68, 122.74, 125.01, 125.45, 127.59, 127.88, 128.04, 128.94, 129.32, 129.48, 136.47, 137.25, 142.14,

144.27, 151.16, 157.32, 161.64. Anal. Calc per $C_{24}H_{23}N_3O_3$: C, 71.80; H, 5.77; N, 10.47%. Trovato: C, 71.99; H, 5.76; N, 10.49%.

[(3*RS*,5*RS*)-2-(2-metossibenzil)-3-(1,10-fenantrolin-2-il)isossazolidin-5-

il]metanolo 21. Resa 34,5%, solido amorfo giallo. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.62 (ddd, 1H, $J=6.8$, 7.7 e 14.3 Hz, H_{4a}), 2.91 (ddd, 1H, $J=7.1$, 7.9 e 14.3 Hz, H_{4b}), 3.27 (bs, 1H, OH), 3.63 (dd, 1H, $J=3.1$ e 12.5 Hz, $\text{H}_{5'a}$), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.88 (dd, 1H, $J=4.7$ e 12.5 Hz, $\text{H}_{5'b}$), 4.12 (s, 2H, H_2'), 4.34 (dddd, 1H, $J=3.1$, 4.7, 6.8 e 7.1 Hz, H_5), 4.81 (dd, 1H, $J=7.7$ e 7.9 Hz, H_3), 6.79–7.19 (m, 4H, protoni fenilici), 7.48–8.25 (m, 6H, protoni fenantrolinici), 9.24 (dd, 1H, $J=1.2$ e 4.1 Hz, H_9). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 38.88, 55.46, 56.17, 63.14, 65.24, 69.65, 110.12, 121.91, 121.34, 122.99, 124.84, 125.15, 127.63, 128.05, 128.67, 128.94, 129.22, 129.62, 136.87, 137.25, 142.64, 144.07, 150.88, 157.12, 160.35. Anal. Calc per $C_{24}H_{23}N_3O_3$: C, 71.80; H, 5.77; N, 10.47%. Trovato: C, 71.66; H, 5.78; N, 10.44%.

9.2 Materiali e metodi impiegati ai fini della valutazione biologica

La citotossicità dei composti è stata valutata, in accordo con le istruzioni fornite dal produttore, mediante due saggi colorimetrici disponibili in commercio che impiegano, l'uno i sali di tetrazolio (*SAGGIO MTS*, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell proliferation Assay, Promega Co, Madison WI) e l'altro la sulforadamina B (*SAGGIO SRB*, Sigma Aldrich).

Il *saggio MTS* sfrutta la capacità, rapidamente perduta dalle cellule morte, delle deidrogenasi mitocondriali di ridurre l'anello tetrazolico della molecola del sale di tetrazolio. La misura della perdita della capacità riduttiva dell'MTS è condotta grazie all'ausilio di uno spettrofotometro ed è inversamente proporzionale alla vitalità cellulare. Le linee cellulari impiegate sono state mantenute in coltura, in condizioni ottimali per 20 ore, su di una piastra multi-pozzetto e poi sono state trattate con concentrazioni crescenti dei composti (1, 10, 100, 200, 500 μM). Il sale di tetrazolio è stato addizionato a ciascun pozzetto e dopo una incubazione di un'ora è stata registrata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm. I saggi sono eseguiti in triplicato e le IC_{50} risultanti sono espressione delle concentrazioni necessarie a provocare la riduzione del 50% dei valori di assorbanza.

Il *saggio SRB* si avvale dell'utilizzo di un colorante anionico che esibisce la proprietà di legarsi, in ambiente debolmente acido, ai residui amminoacidici basici delle proteine cellulari. Anche durante l'esecuzione di tale saggio le linee cellulari impiegate sono state mantenute in coltura, in condizioni ottimali per 20 ore, su di una piastra multi-pozzetto e trattate poi con concentrazioni crescenti dei composti (1, 10, 100, 200, 500 μM). In ciascun pozzetto si è addizionato dell'acido tricloroacetico freddo incubando la piastra multipozzetto a 4 °C per circa un'ora, trascorsa la quale, si è proceduto con dei lavaggi di acqua distillata e si è poi atteso che i pozzetti si asciugassero. Le cellule, quindi, sono state trattate con una soluzione di sulforodamina B in acido acetico per 30 minuti, trascorsi i quali si è provveduto alla rimozione del colorante mediante ripetuti lavaggi con una soluzione di acido

acetico all'1% (v/v). Si è nuovamente atteso che la piastra multi-pozzetto si asciugasse ed in ultimo si è solubilizzato il colorante residuo con un tampone, noto come Tris base (pH 10,5). La valutazione quantitativa della colorazione delle proteine cellulari è stata eseguita mediante analisi spettrofotometrica ed in ragione della quantità di sulforodamina B rilevata nel corso dell'indagine si è potuta fare una stima della vitalità cellulare. Quest'ultima, infatti, è direttamente proporzionale alla quantità di sulforodamina B riscontrata.

9.3 Docking e modellistica molecolare

Per testare le potenzialità intercalanti dei composti sintetizzati ed ottenere una stima della K_i nonché ulteriori informazioni sulla preferenza esibita dai composti, nel corso del processo di intercalazione, rispetto al solco minore o maggiore e sui fattori che la stabilizzano è stato eseguito uno studio combinato di docking e modellistica molecolare.

I calcoli sono stati eseguiti con il campo di forze Amber96, che è tra i più accurati nella modellazione di proteine e DNA, come implementato nel software Hyperchem 7.5. Studi precedenti condotti con i due polinucleotidi a doppio filamento caratterizzati dalla presenza di sequenze univoche A–T e G–C, rispettivamente, hanno messo in evidenza che questo tipo di composti hanno prediligono la sequenza di basi costituita dalle coppie A–T pari ad un fattore 10; questo risultato è in accordo con la maggiore idrofobicità di

questi residui che facilita l'inserzione del cromoforo fenantrenilico o pirenilico poco polare. Quindi per simulare il ct-DNA è stato scelto il frammento decamerico palindromo $d(\text{CGCAATTGCG})_2$, prelevato dal *Brookhaven Protein Database* (ID: 252D) e da cui sono state rimosse le molecole cristallografiche di acqua. Il frammento è stato chiuso alle estremità 3' e 5' mediante un gruppo fosfato e tutto il sistema configurato come un nucleotide completamente anionico con i cationi di sodio monovalente disposti inizialmente lungo la bisettrice dell'angolo O-P-O ad una distanza di 4.0 Å dall'atomo di fosforo. Successivamente la geometria è stata completamente minimizzata con un criterio di convergenza di 0.01 kcal/mol per Å, assegnando una costante dielettrica dipendente dalla distanza pari ad 1.0, un fattore di scala 1–4 di 0.833 per la parte elettrostatica e di 0.5 per quella di van der Waals, ed il *cutoff* di non legame su off.

La simulazione del legame dei composti al ct-DNA è stata condotta mediante la metodologia del docking. Dapprima, i composti in esame sono stati inseriti manualmente nel centro delle basi costituenti il decamero sia dal solco minore che da quello maggiore, rispettivamente. Tenendo fisse le posizioni degli atomi dei composti, il resto della molecola, i.e. il decamero, è stato minimizzato cosicché il frammento libero potesse accomodare la molecola ospite in maniera appropriata. Successivamente l'intero sistema è stato minimizzato con un criterio di convergenza di 0.05 kcal/mol per Å, senza

alcuna restrizione.

I calcoli molecolari di docking sono stati condotti utilizzando il programma Autodock 4. In un calcolo tipico il composto intercalato è stato cancellato dal complesso precedentemente ottenuto, così da lasciare una tasca libera nel frammento di ct-DNA. Quindi è stato permesso al docking molecolare di prendere luogo tra il ligando ed il frammento arrangiato; le strutture ottenute dai dieci migliori risultati sono state ulteriormente rifinite con un criterio di convergenza di 0.01 kcal/mol per Å.

Le energie di binding (E_B) dei complessi di intercalazione sono stati calcolati sottraendo all'energia del complesso ($E_{\text{complesso}}$) la somma delle energie dei composti esaminati (E_{composti}) e del frammento decamerico ($E_{\text{frammento}}$), eq. 2:

$$E_B = E_{\text{complesso}} - (E_{\text{8bb}} + E_{\text{frammento}})$$

Sebbene sia le energie di *binding* che la costante di intercalazione così calcolate non abbiano un significato quantitativo per stabilire un rapporto accurato tra i diversi tipi di complesso, esse rivelano la tipologia di approccio preferita dalle molecole durante il processo di intercalazione.

La maggiore stabilità del complesso derivante dall'approccio dal solco maggiore, è da attribuirsi alle migliori interazioni π - π tra il cromoforo pirenilico e le coppie di basi impilate, in quanto la porzione aromatica planare si inserisce con il suo asse longitudinale in modo quasi parallelo rispetto

all'asse che congiunge la coppia di basi (Figura 14). D'altra parte, nell'approccio dal solco minore, l'asse longitudinale del cromoforo è quasi ortogonale rispetto a quello che congiunge la coppia di basi e l'anello pirenico protrude nel solco maggiore, diminuendo così le interazioni π - π .

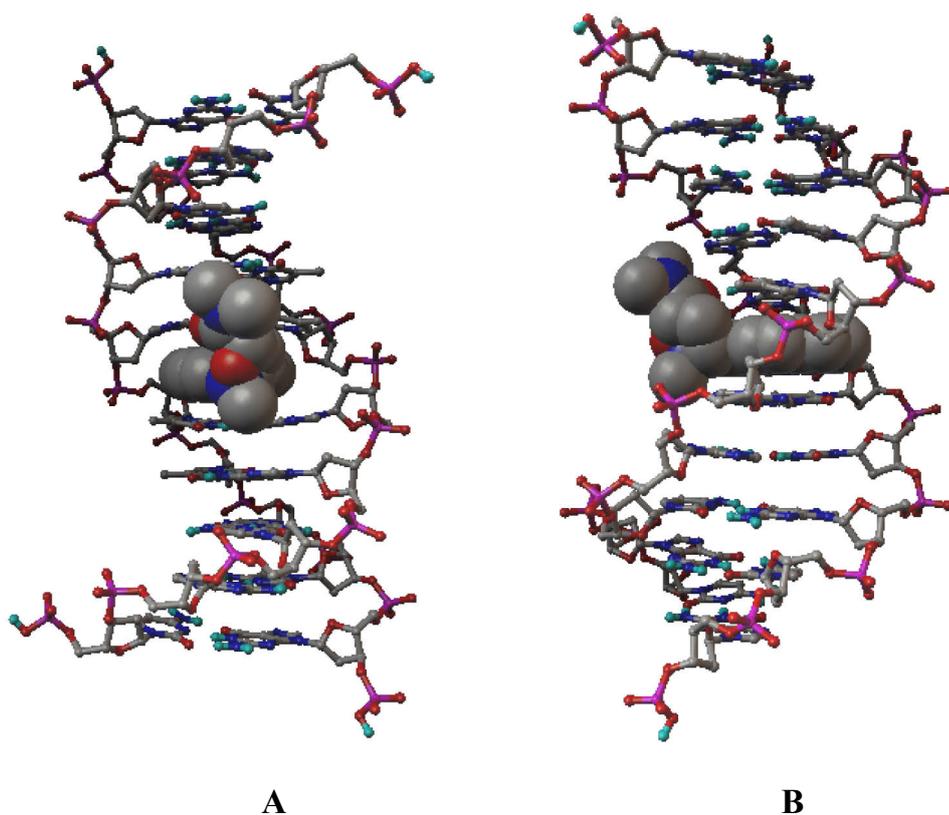


Figura 2. A) Vista frontale dal solco maggiore. B) Vista laterale dal solco maggiore.

Inoltre, il complesso intercalante è ulteriormente stabilizzato dalla formazione di un legame idrogeno, che si instaura tra l'atomo di ossigeno del gruppo carbossammidico ed un atomo di idrogeno dell'ammino gruppo

dell'adenina (Figura 15). Per quanto concerne, invece, l'inserzione dal solco minore, non si ha formazione di legame ad idrogeno.

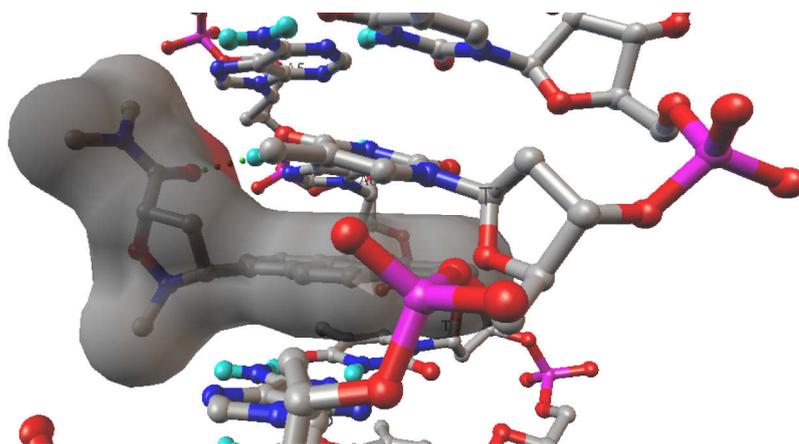
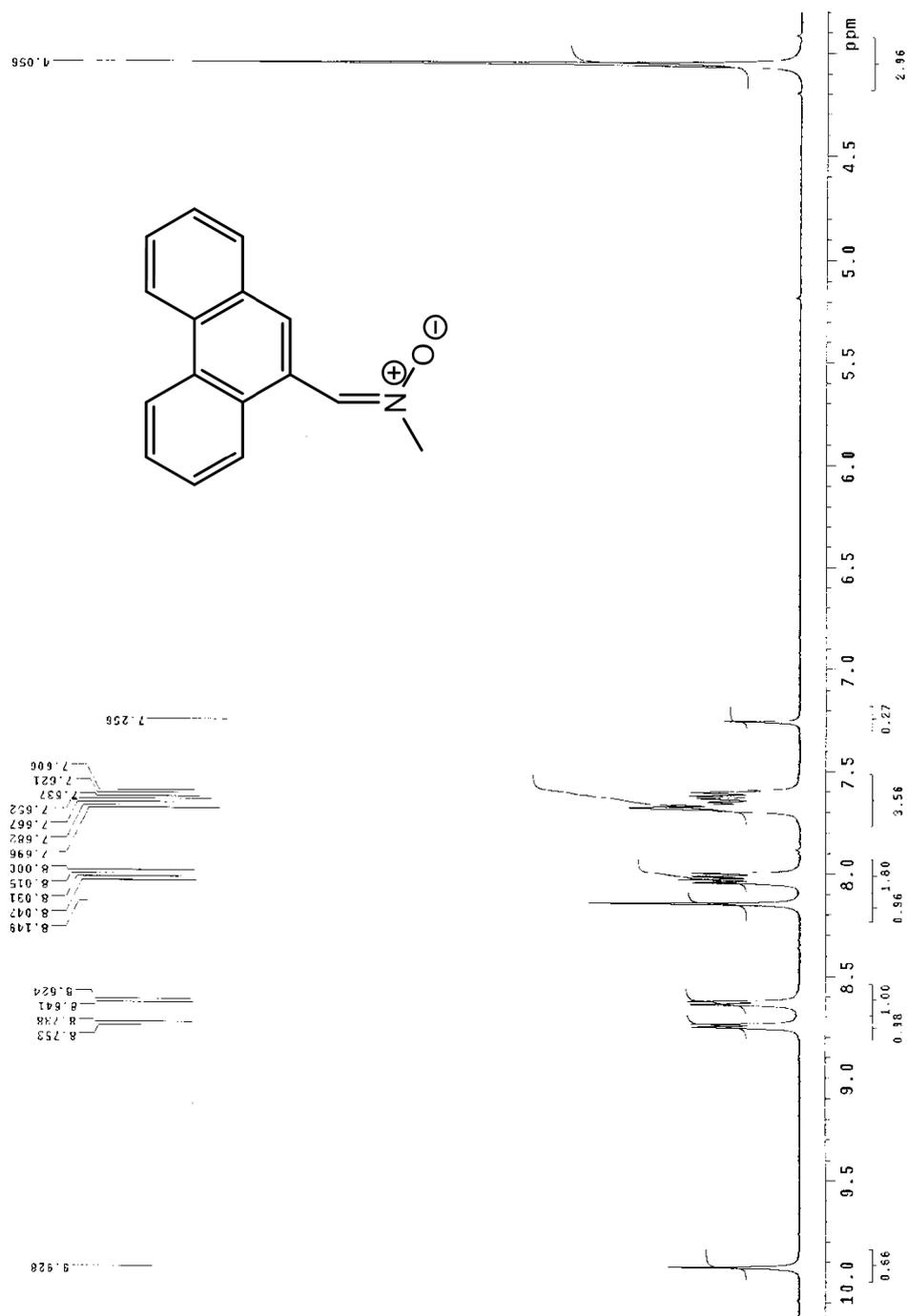
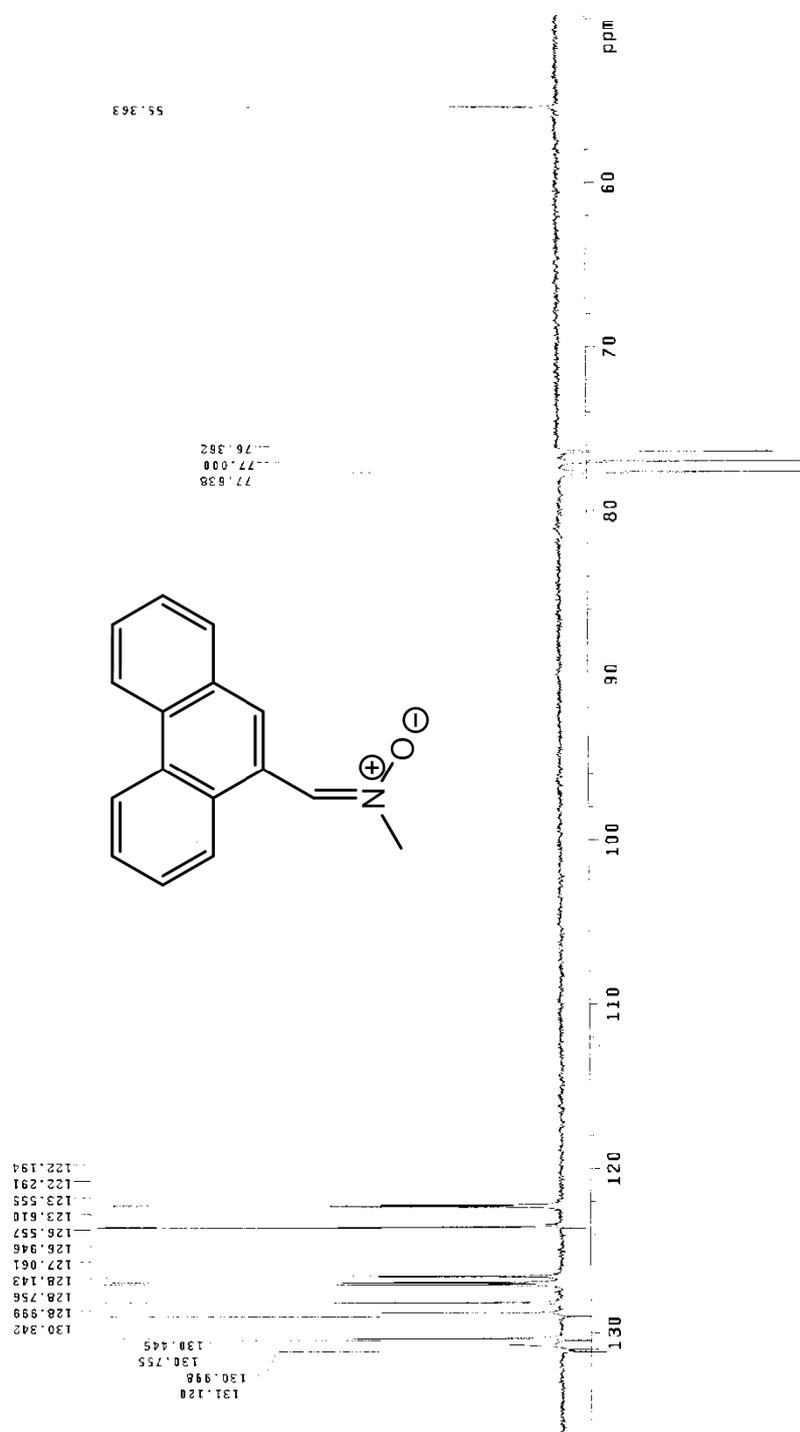
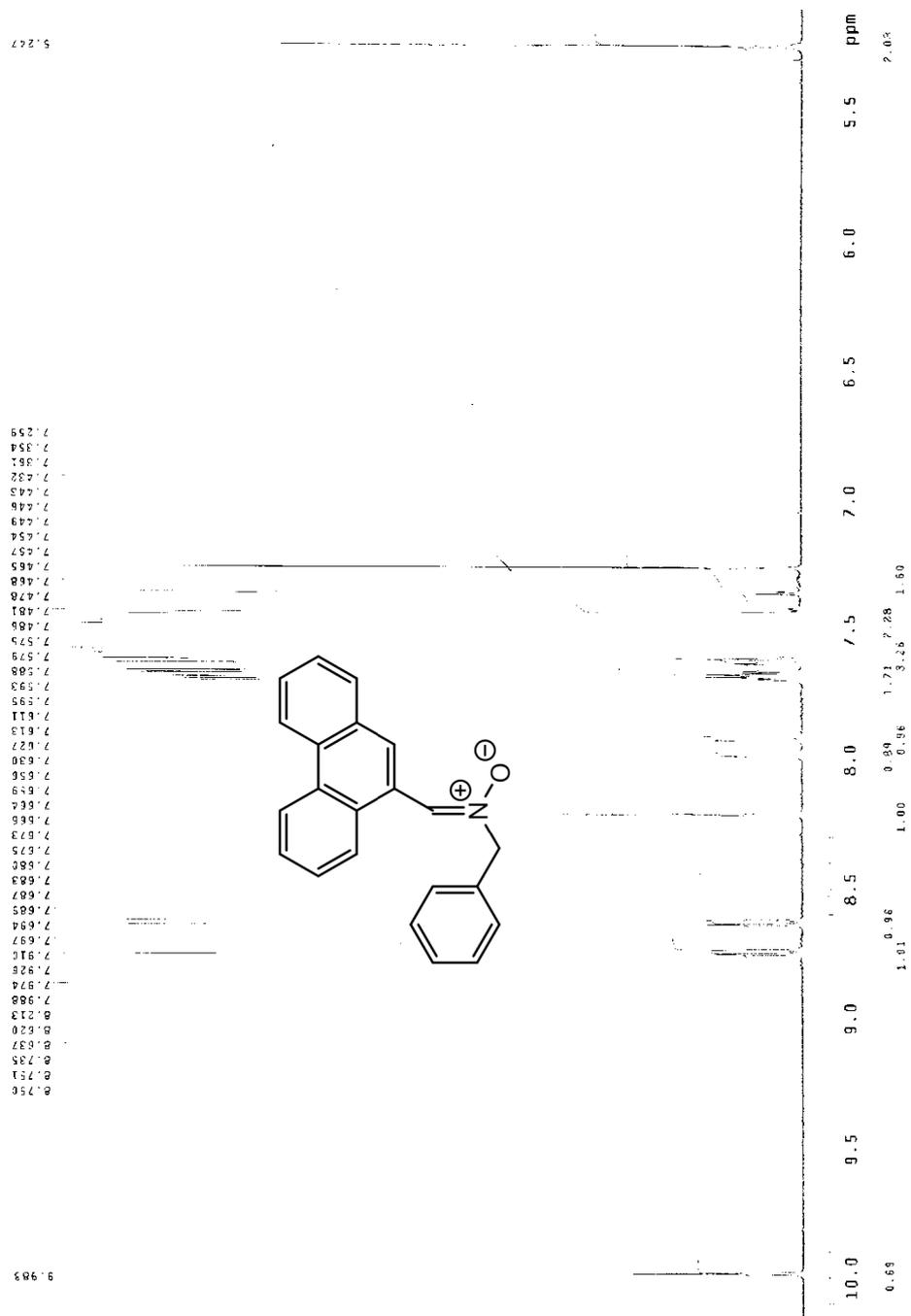


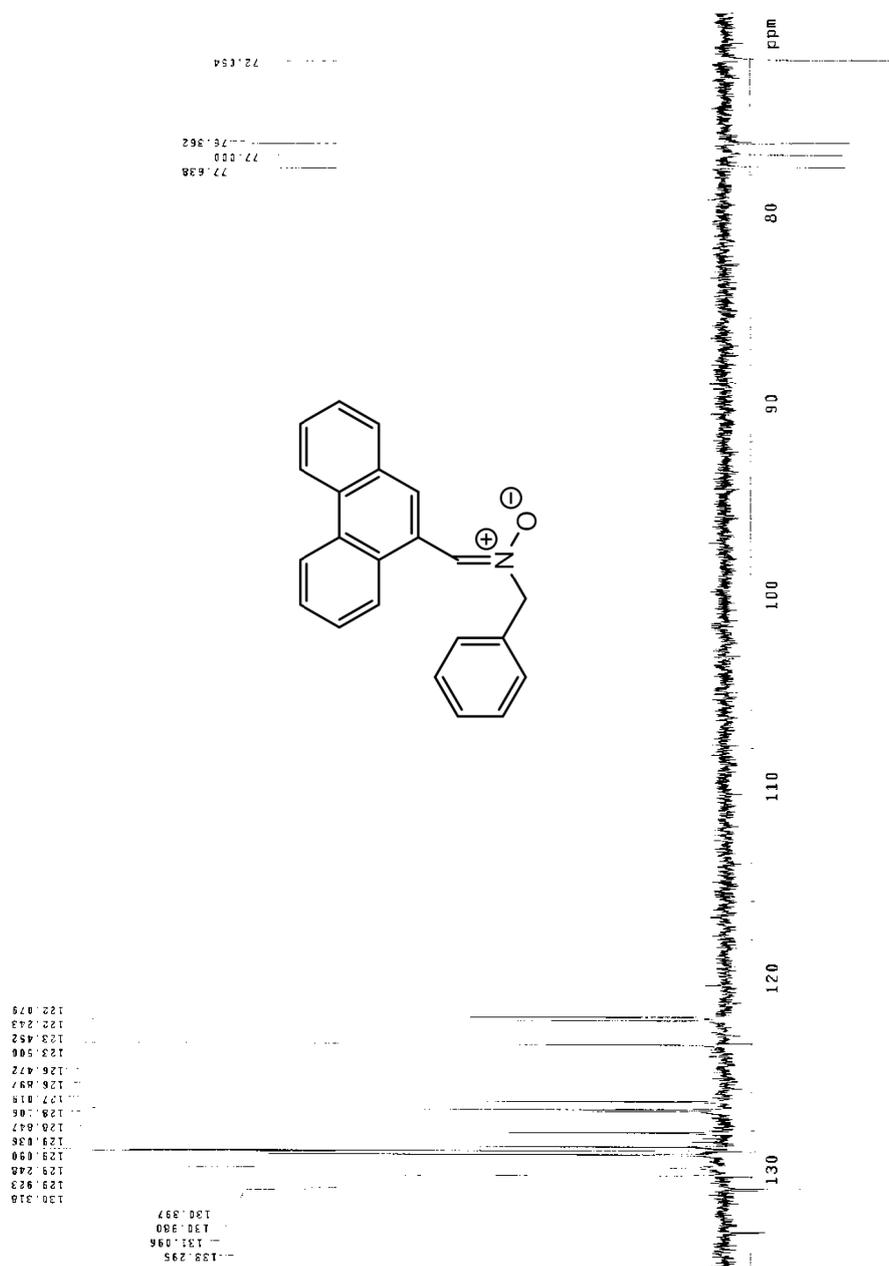
Figura 3. Particolare in cui è mostrata la formazione di un legame idrogeno.

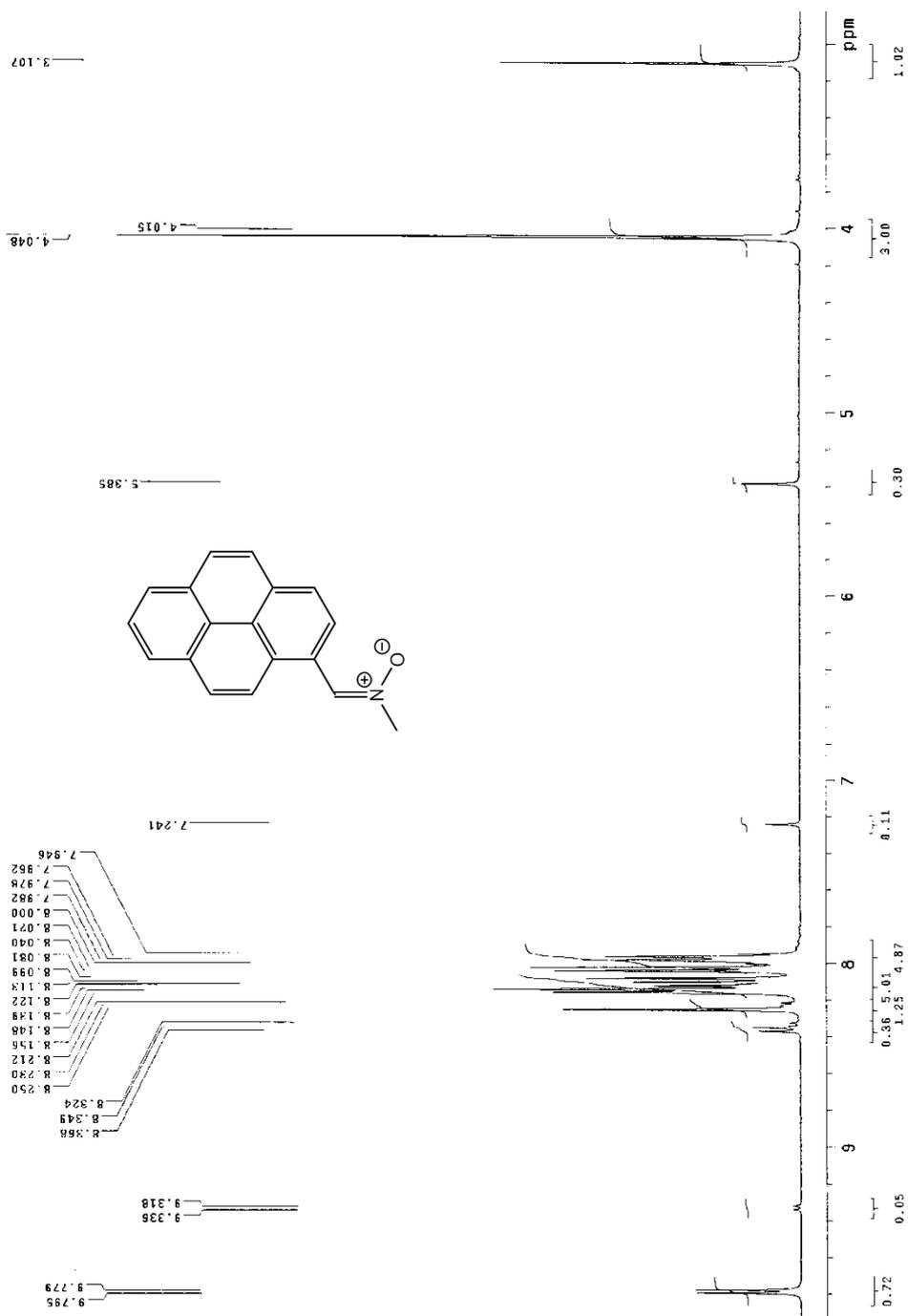
10. SPETTRI NMR

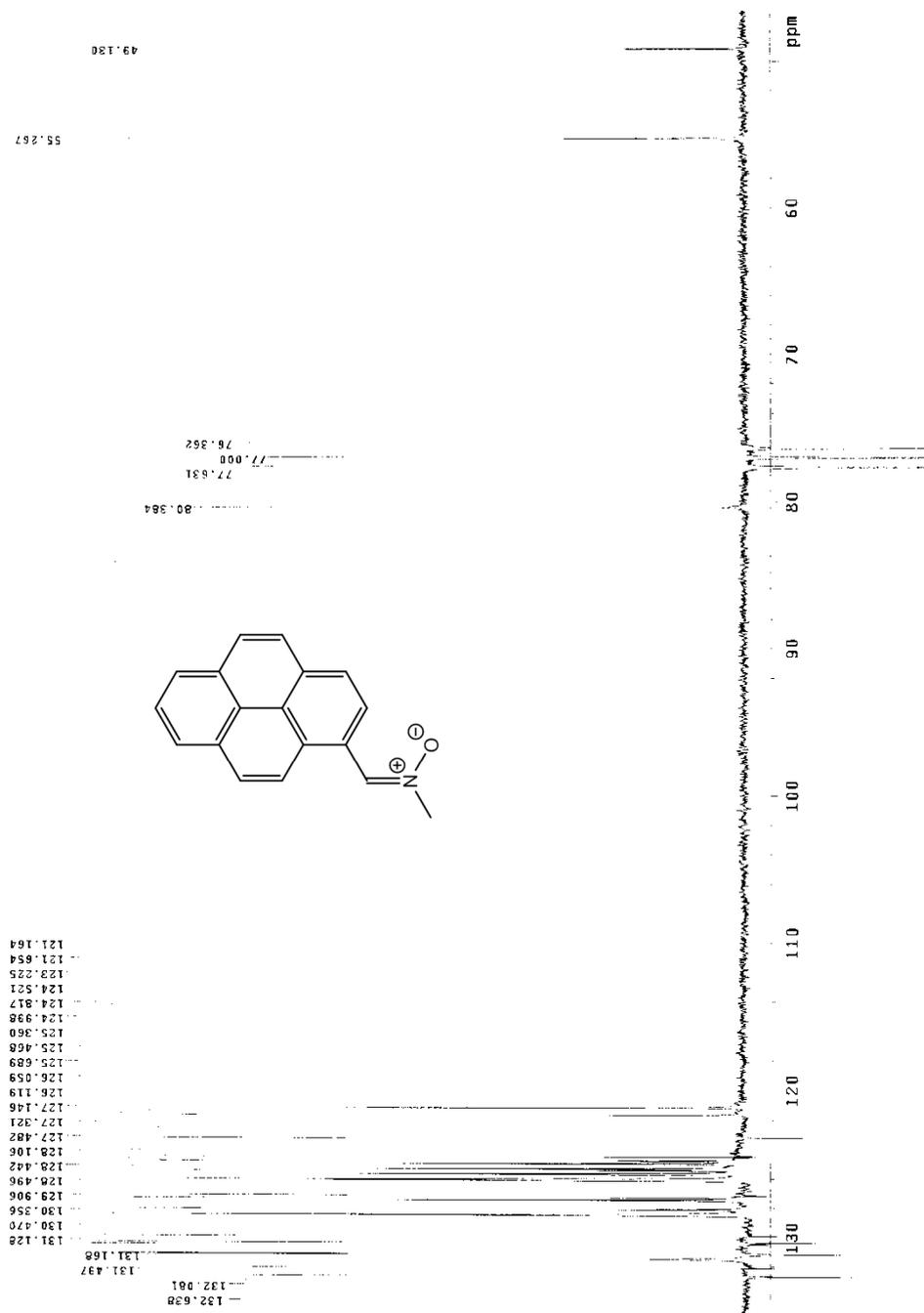
Spettro ^1H NMR del composto **5a**

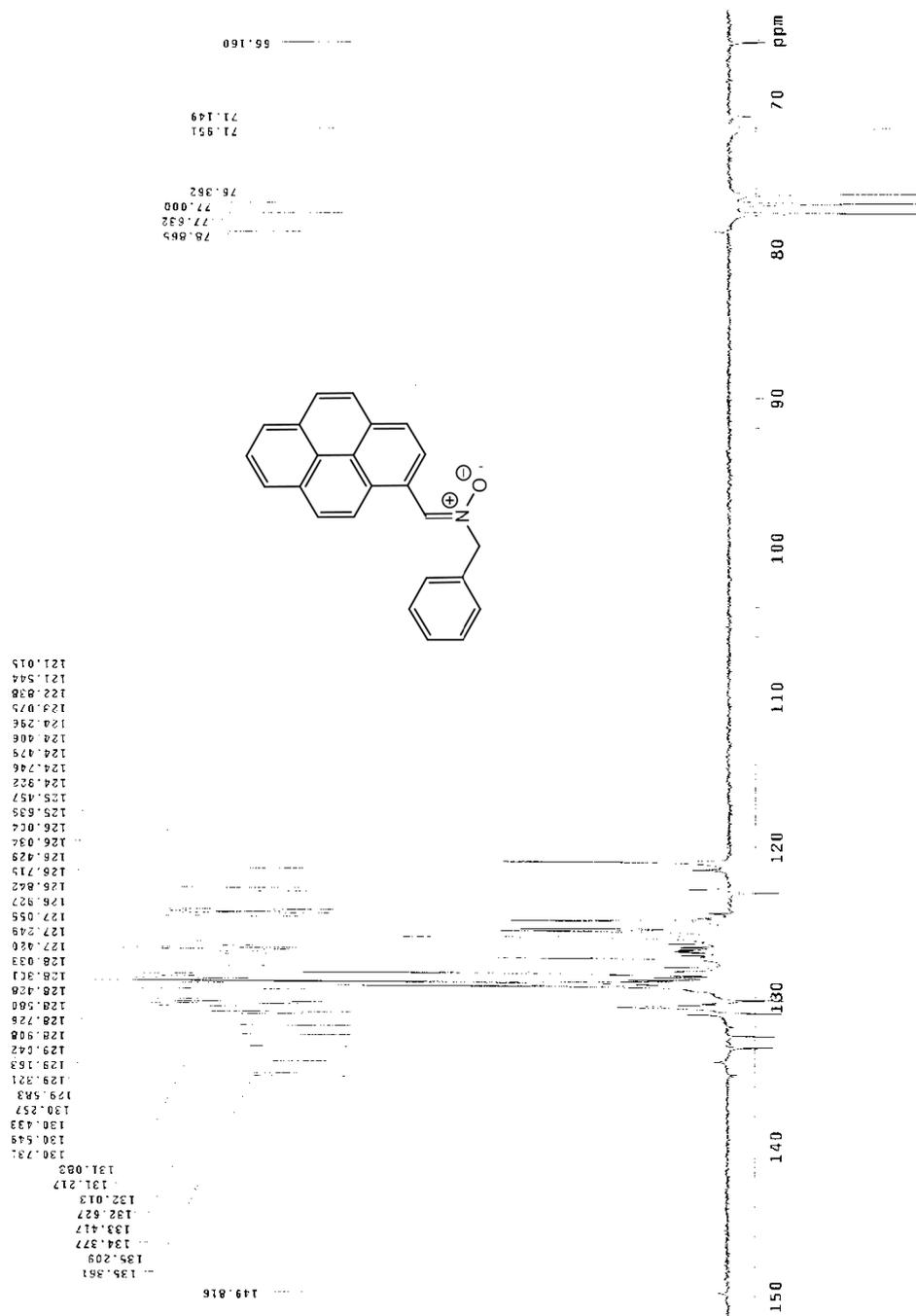
Spettro ^{13}C NMR del composto **5a**

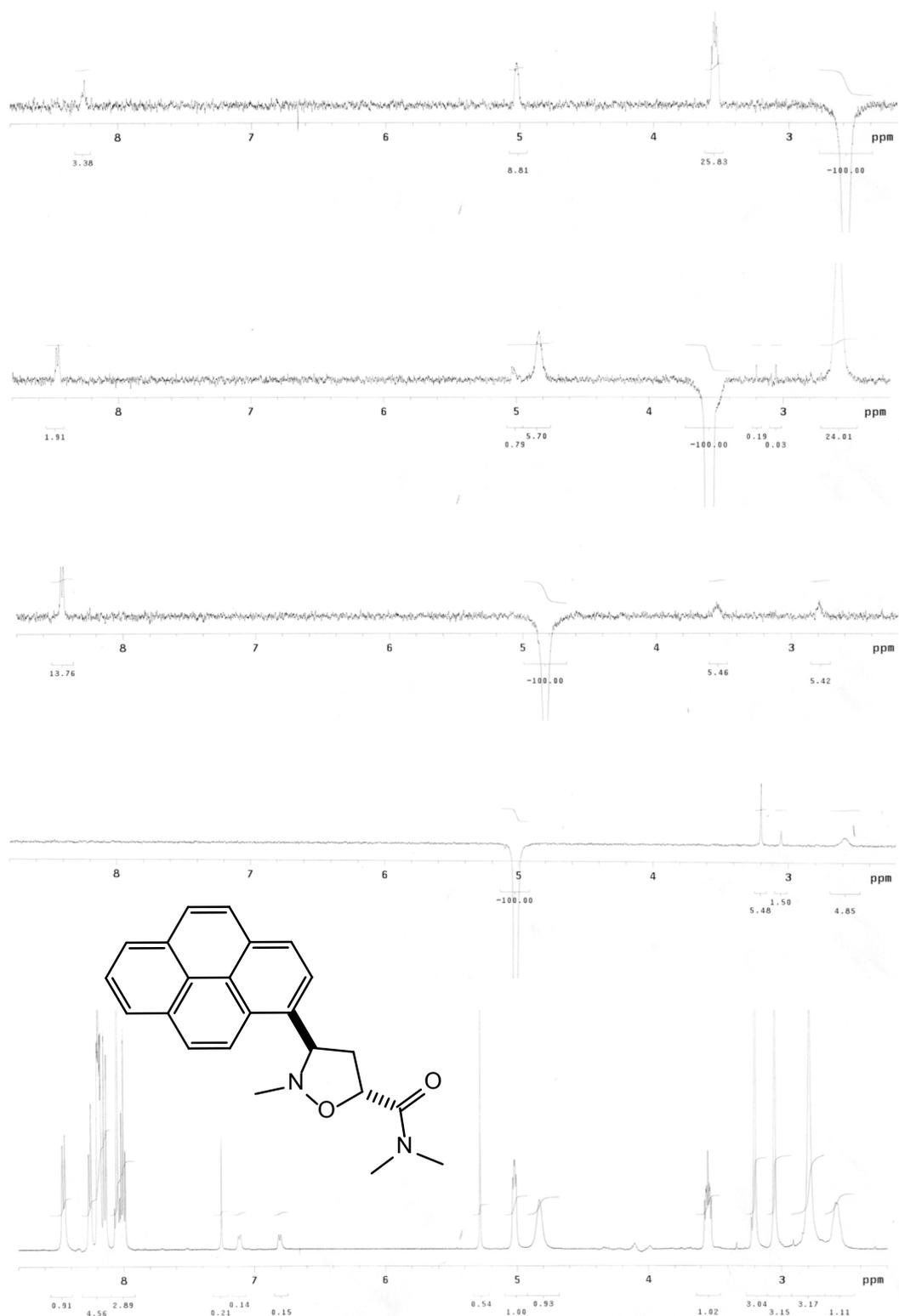
Spettro ^1H NMR del composto **5b**

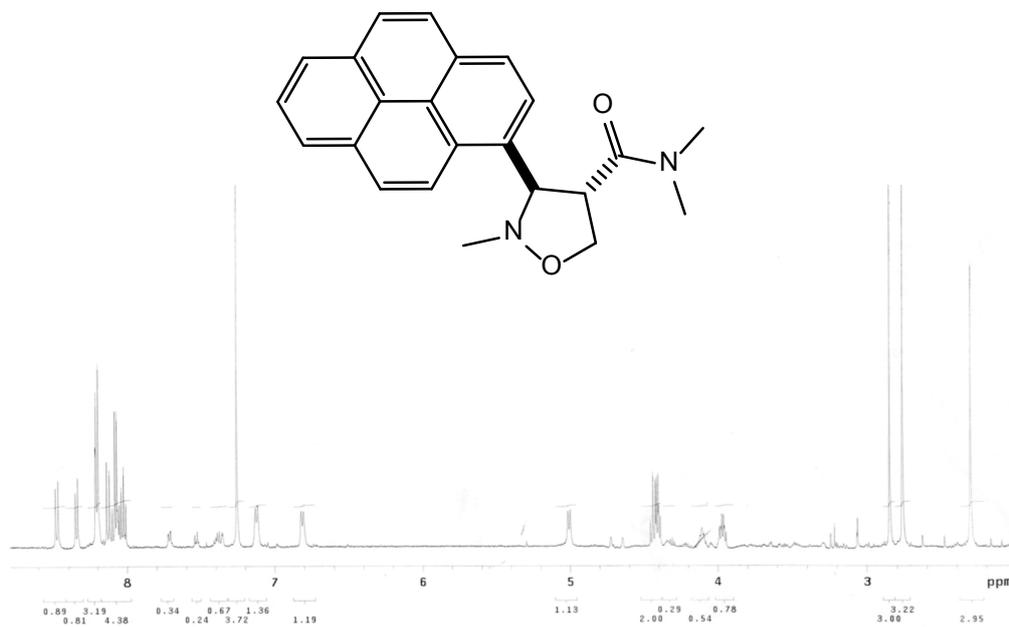
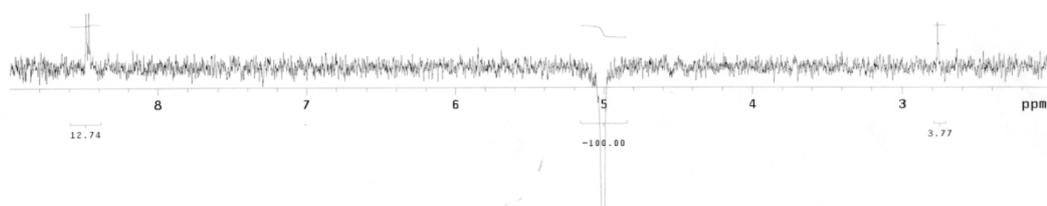
Spettro ^{13}C NMR del composto **5b**

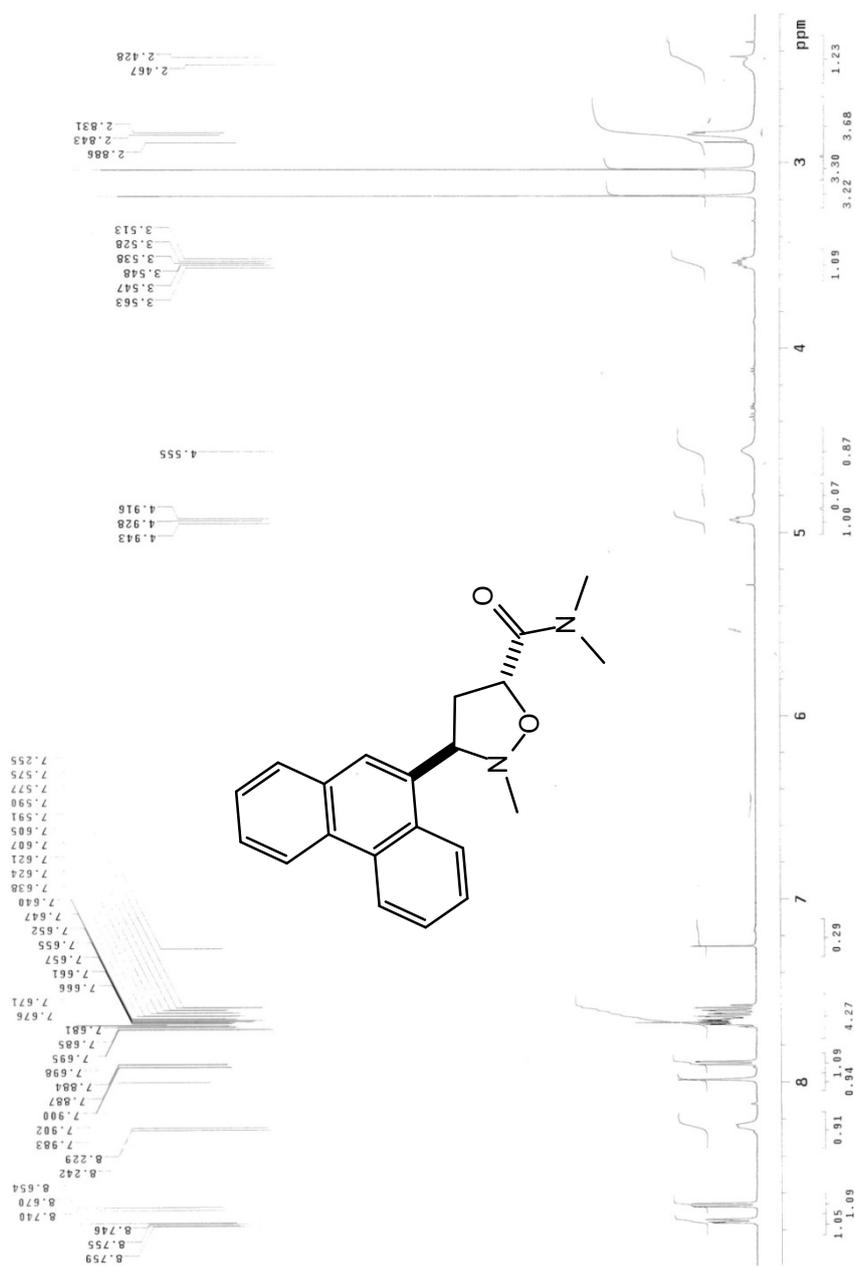
Spettro ^1H NMR del composto **5c**

Spettro ^{13}C NMR del composto **5c**

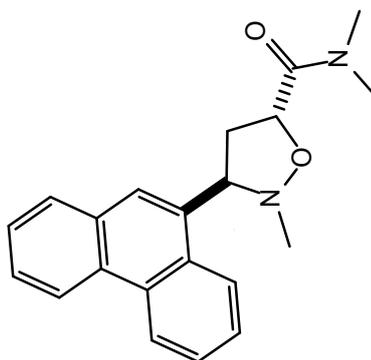
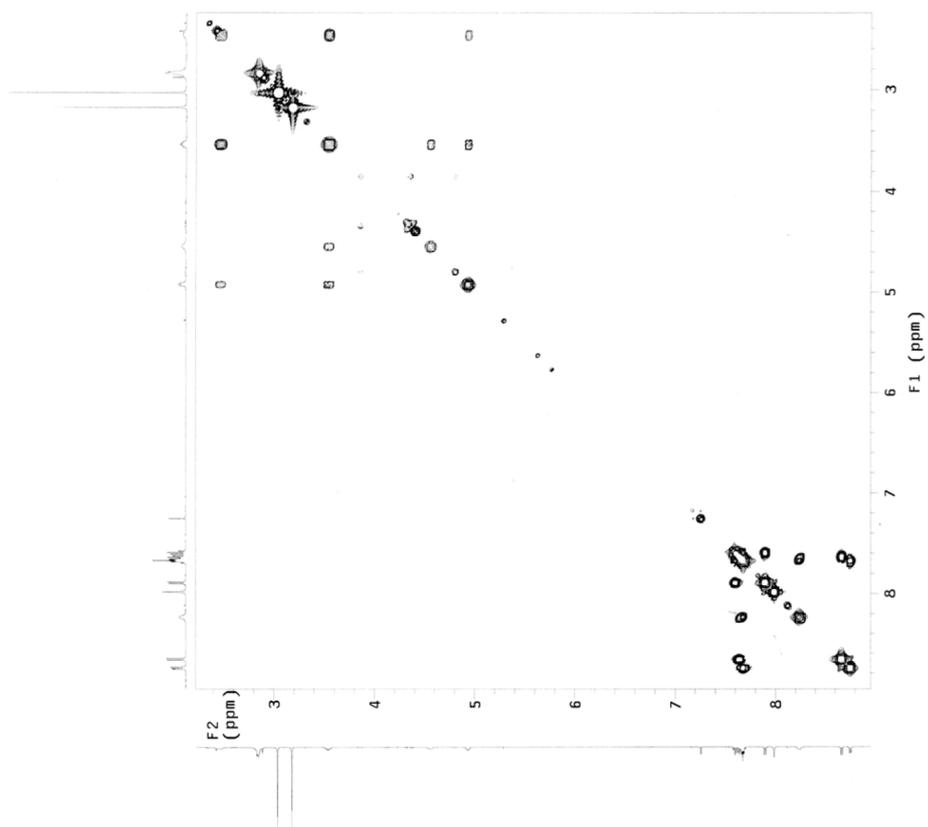
Spettro ^{13}C NMR del composto **5d**

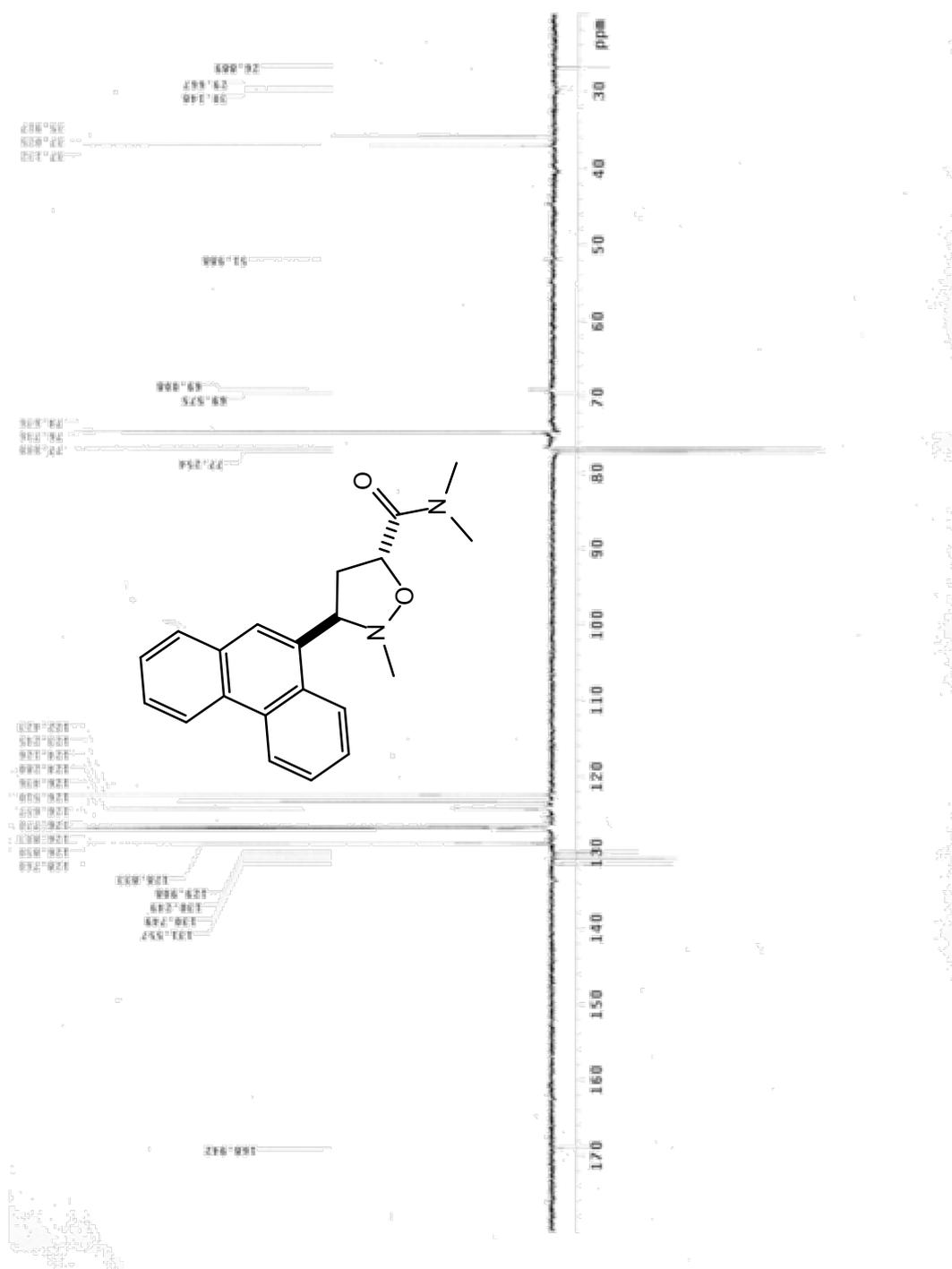
Spettri NOE del composto **7c**

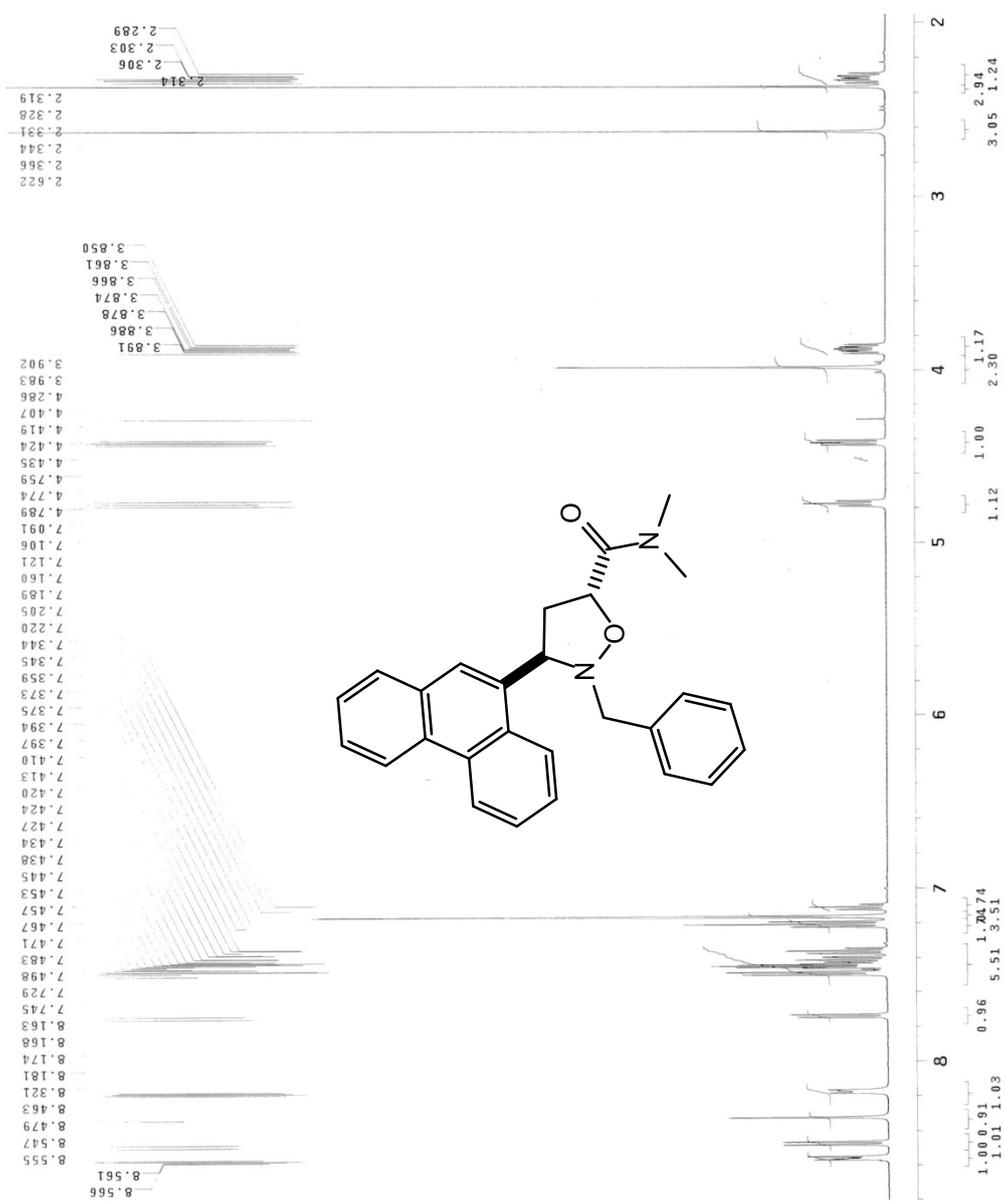
Spettri NOE del composto **9c**

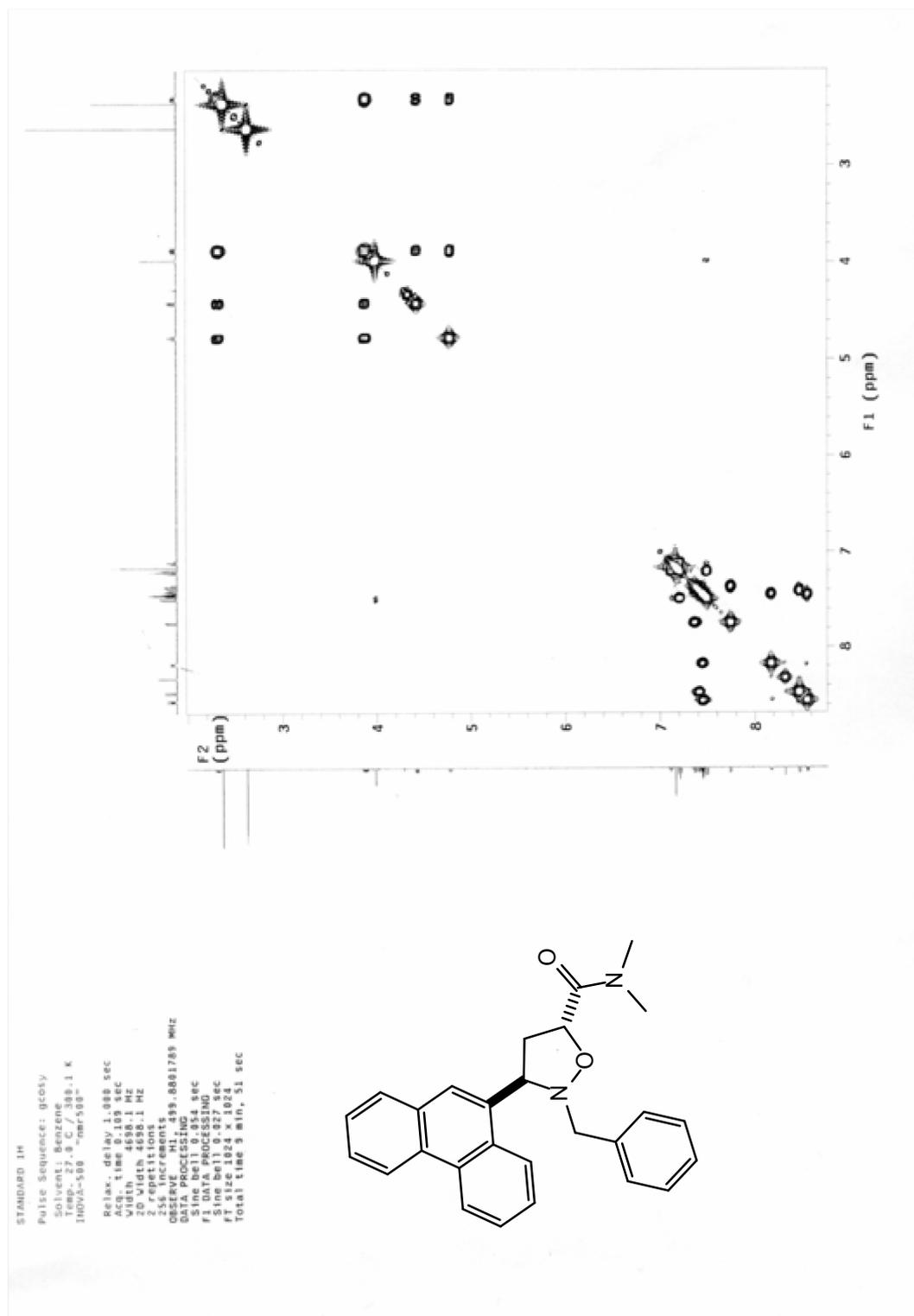
Spettro ^1H NMR del composto **7a**

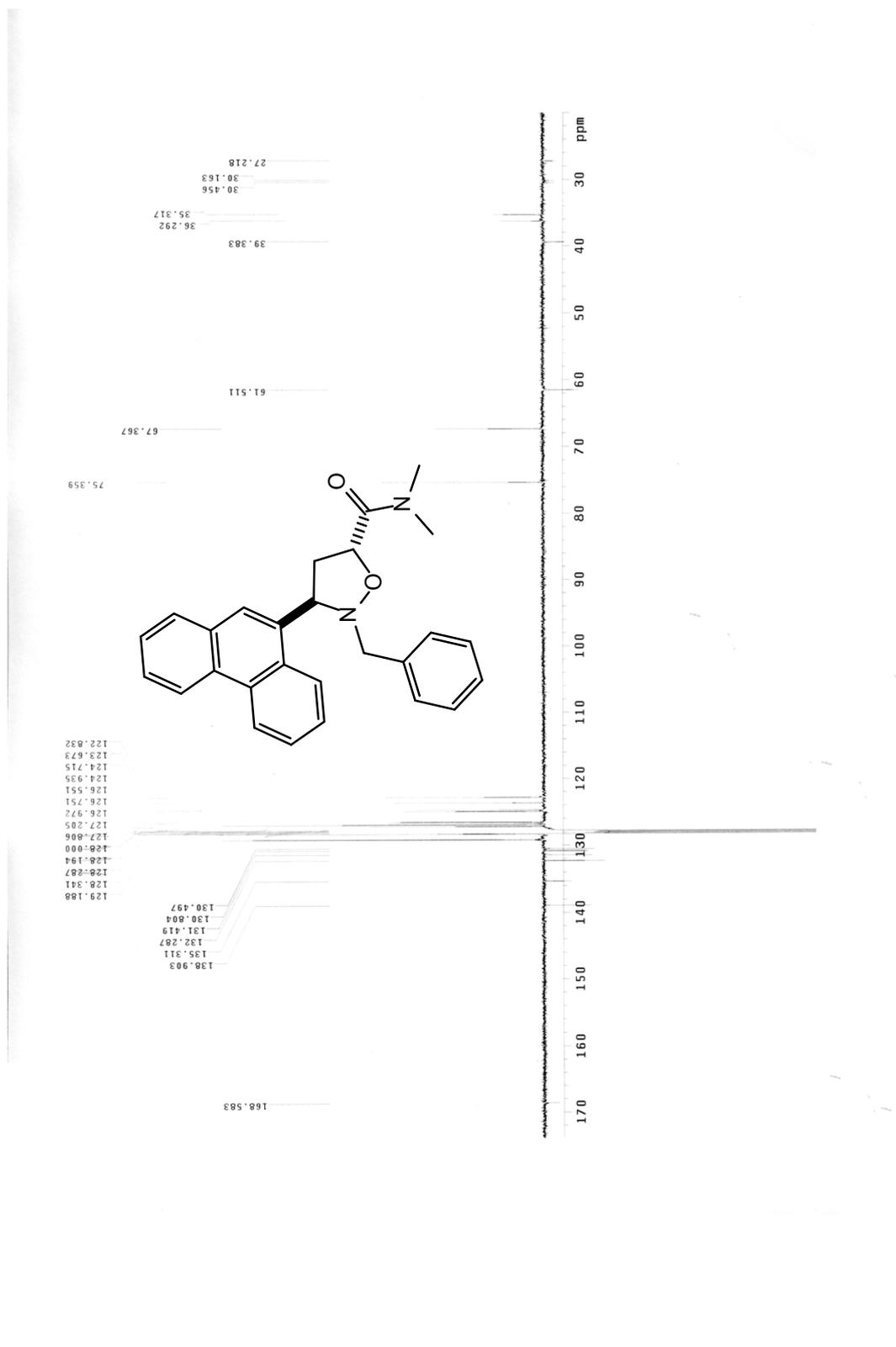
Spettro gcosy del composto 7a

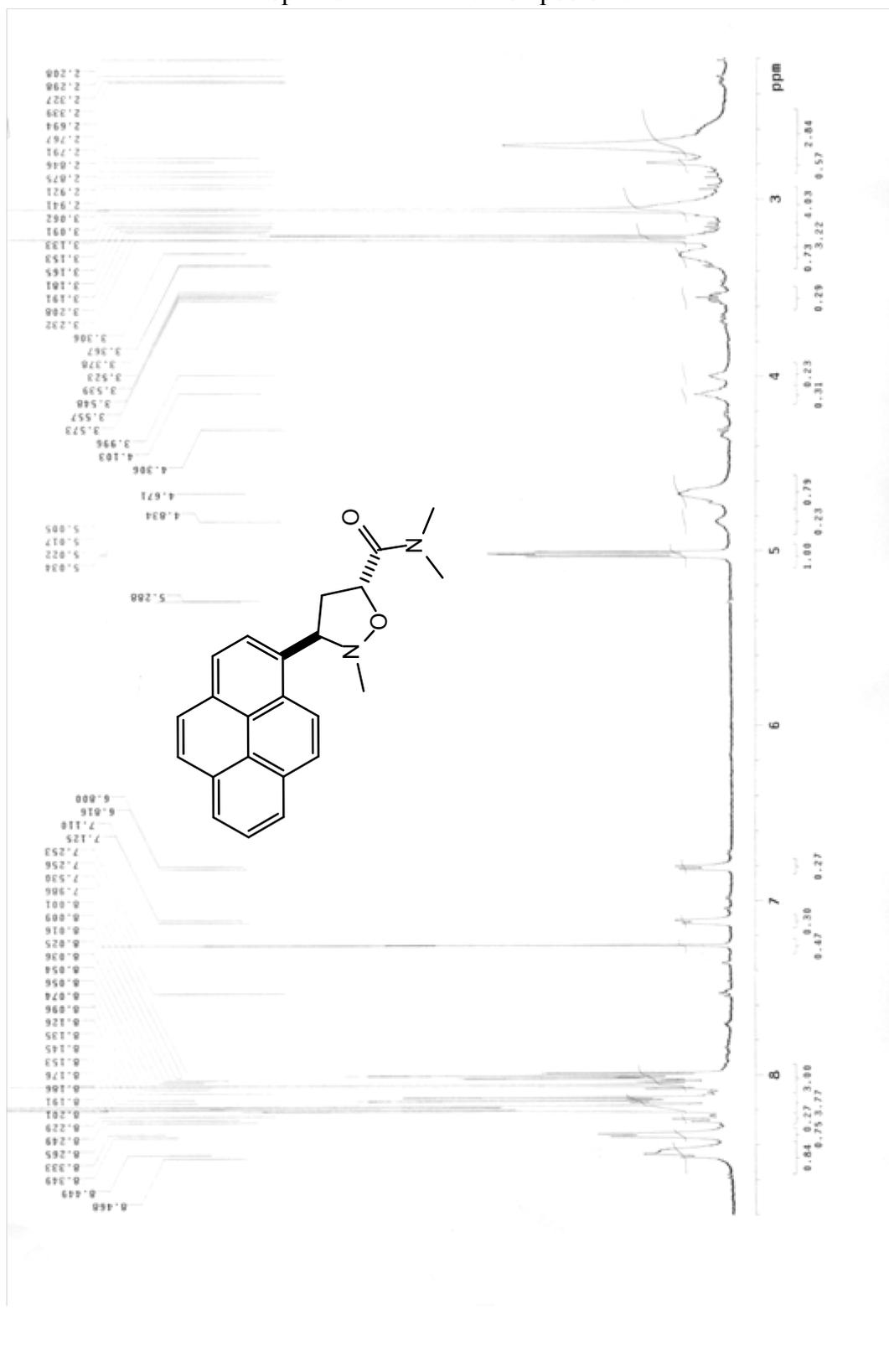


Spettro ^{13}C NMR del composto **7a**

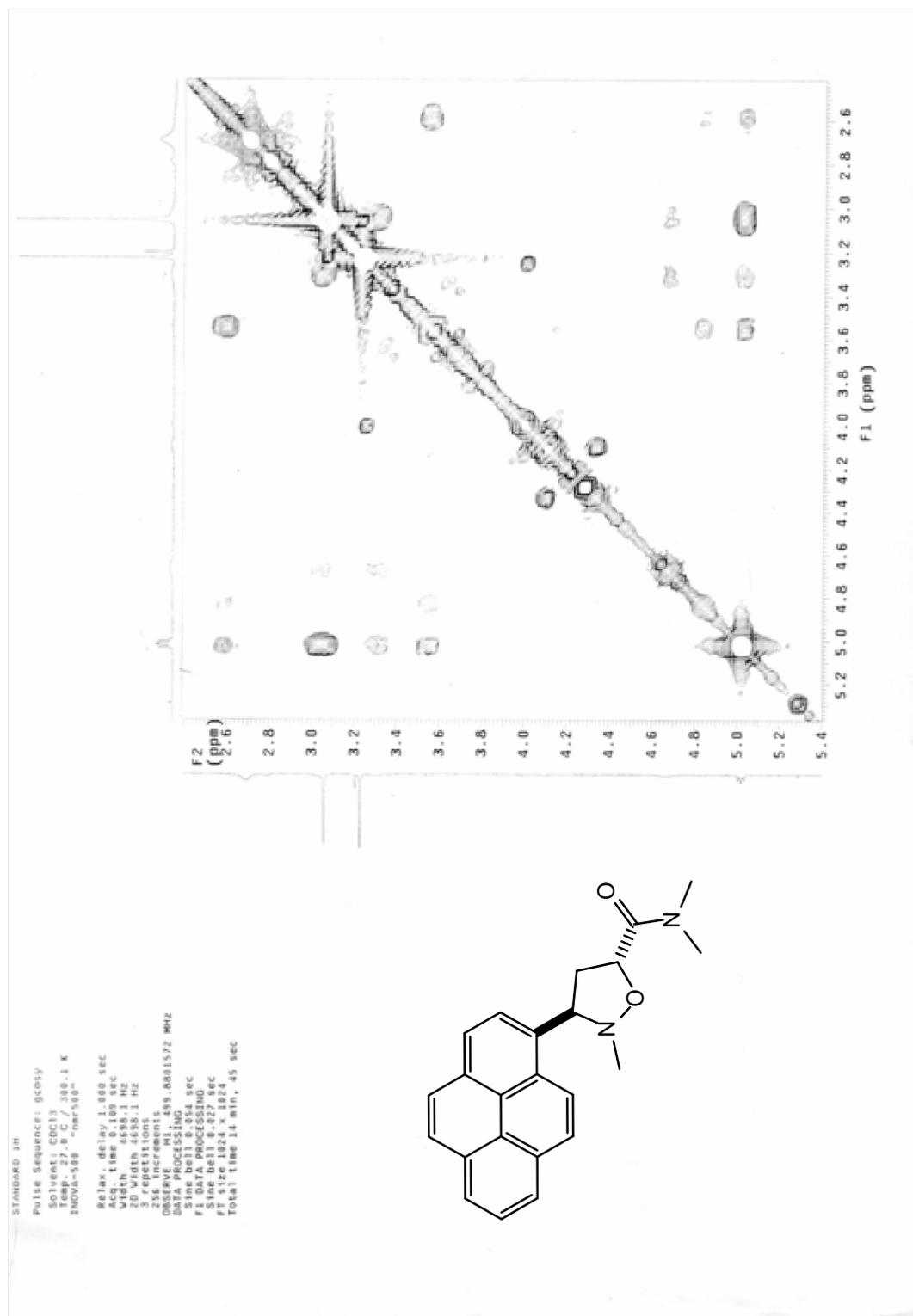
Spettro ^1H NMR del composto **7b**

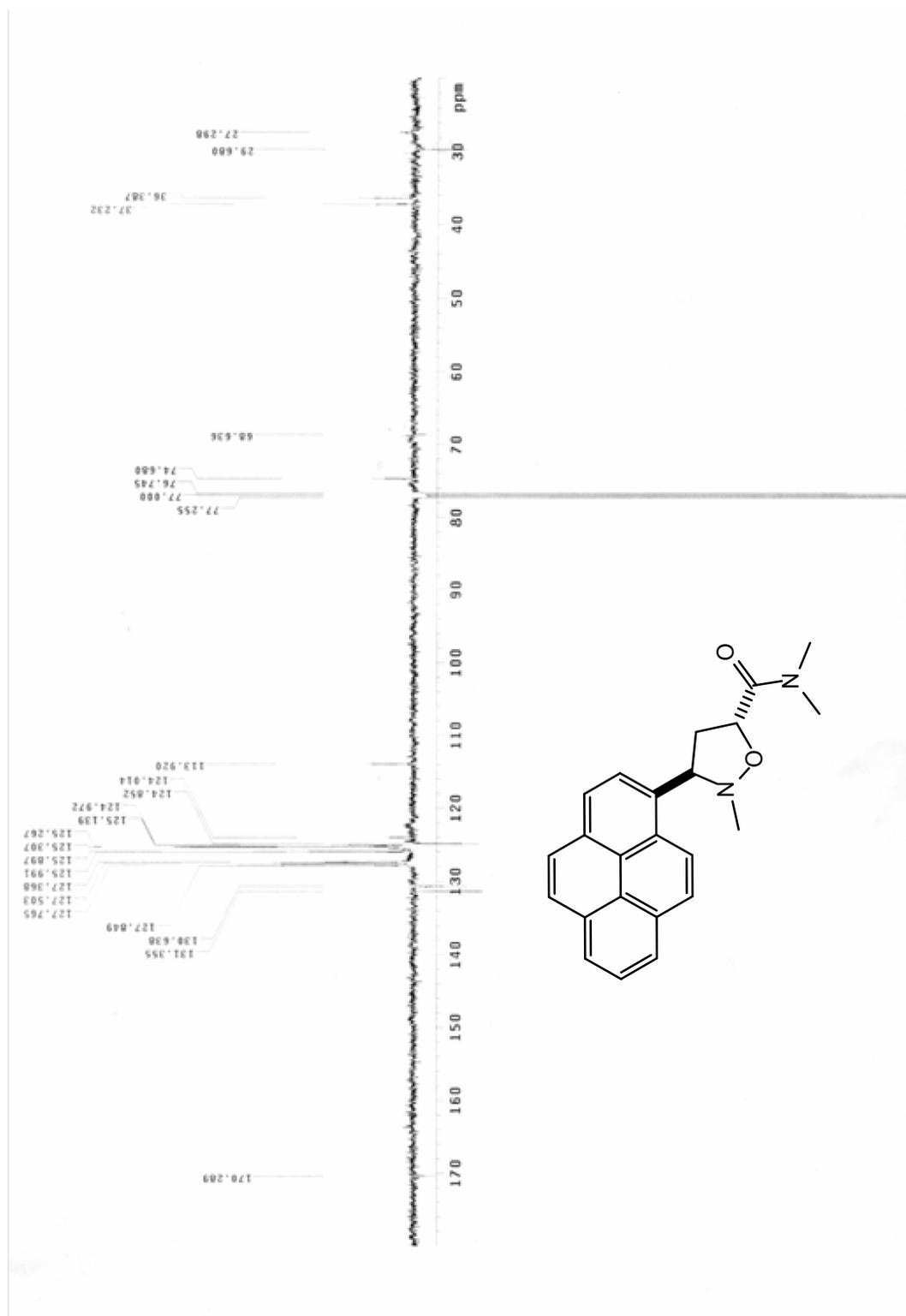
Spettro gcosy del composto **7b**

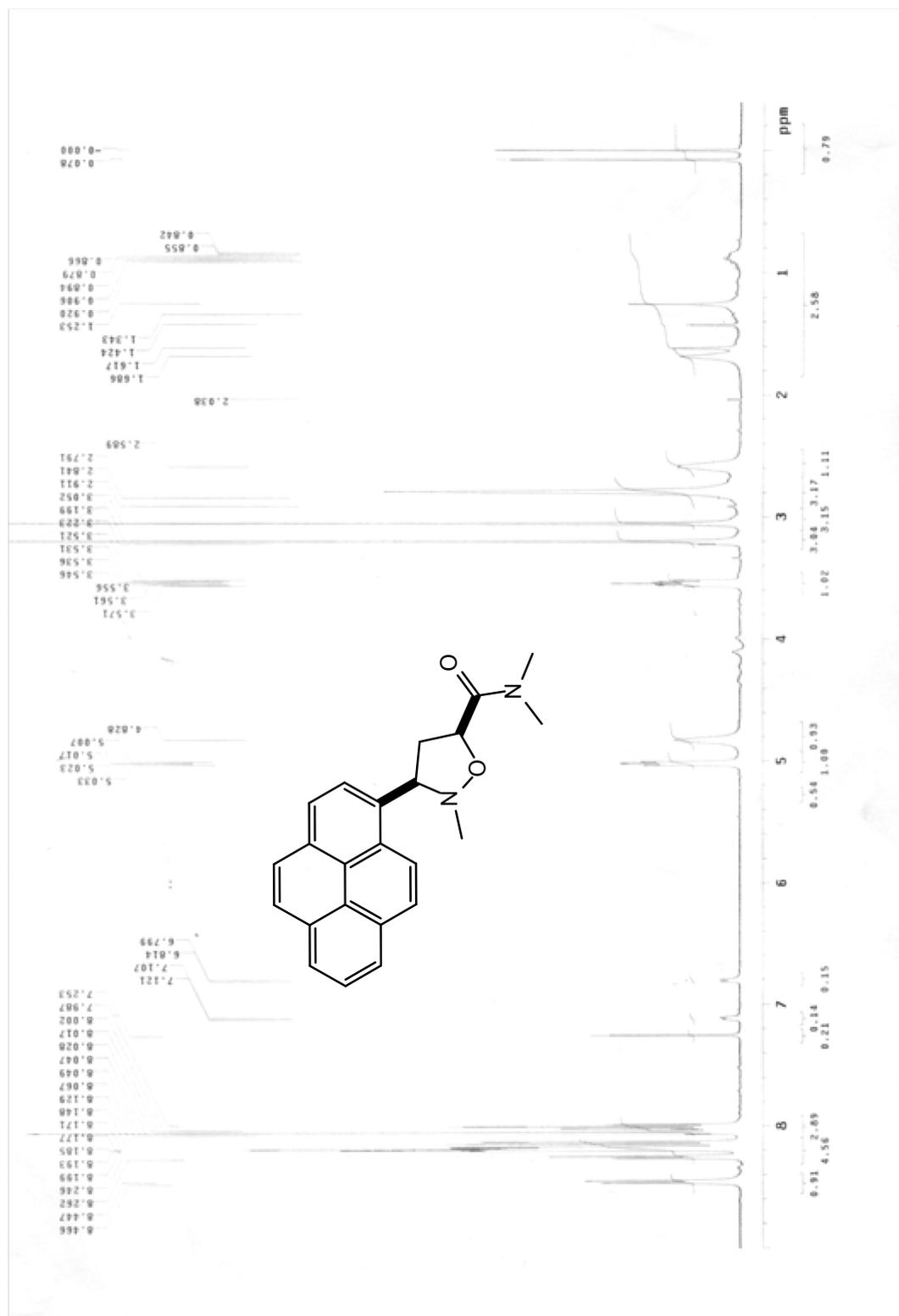
Spettro ^{13}C NMR del composto **7b**

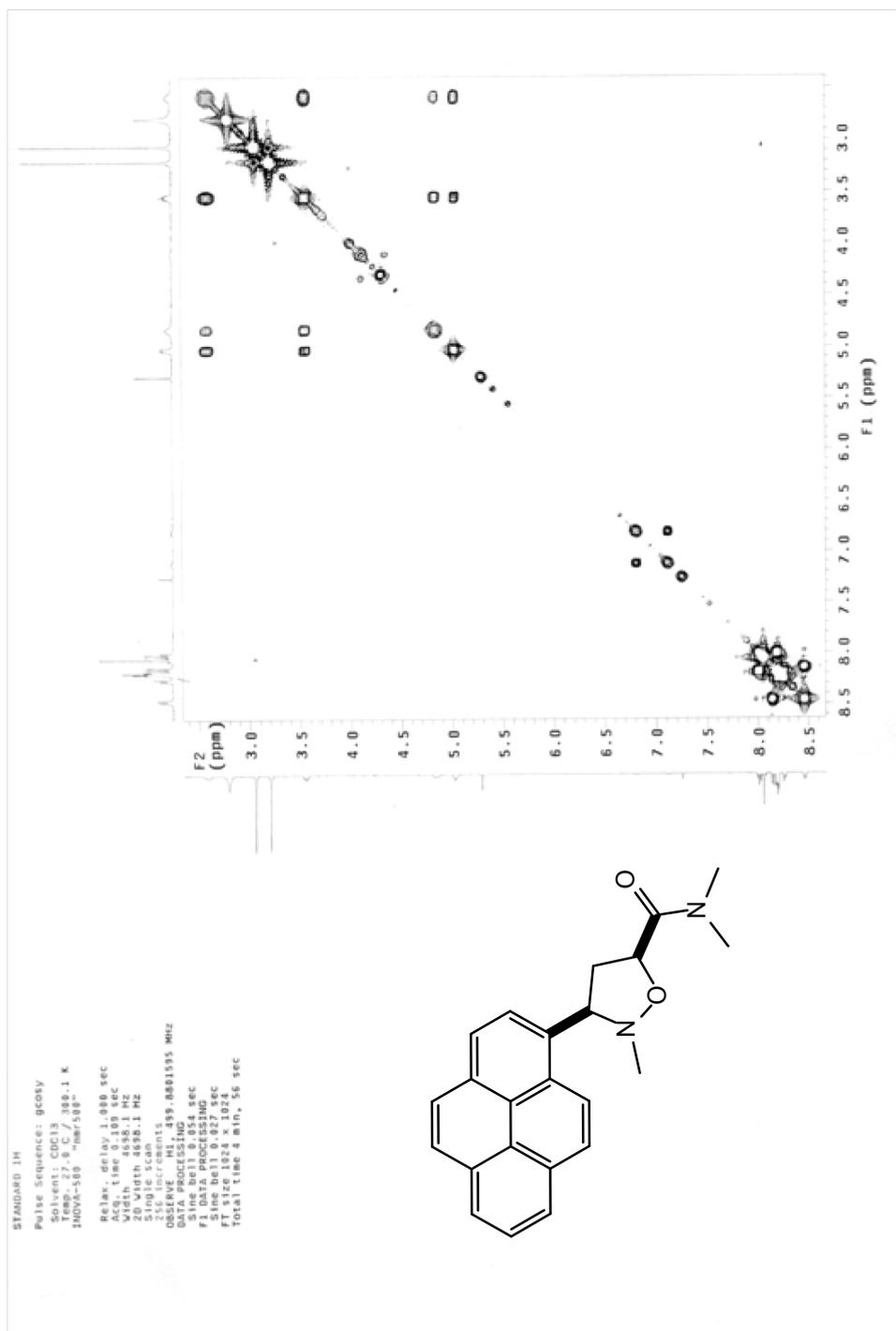
Spettro ^1H NMR del composto **7c**

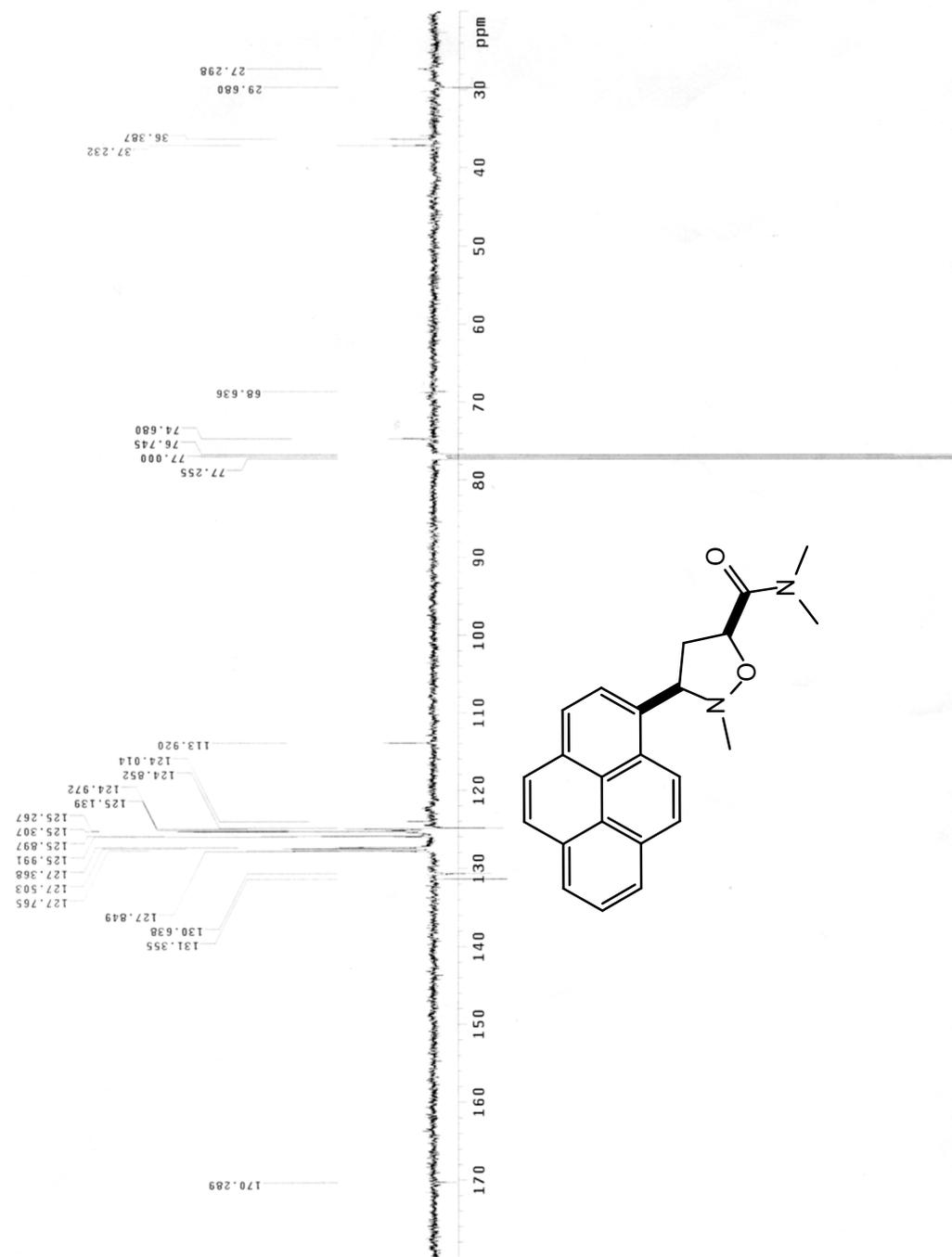
Spettro gcosy del composto 7c

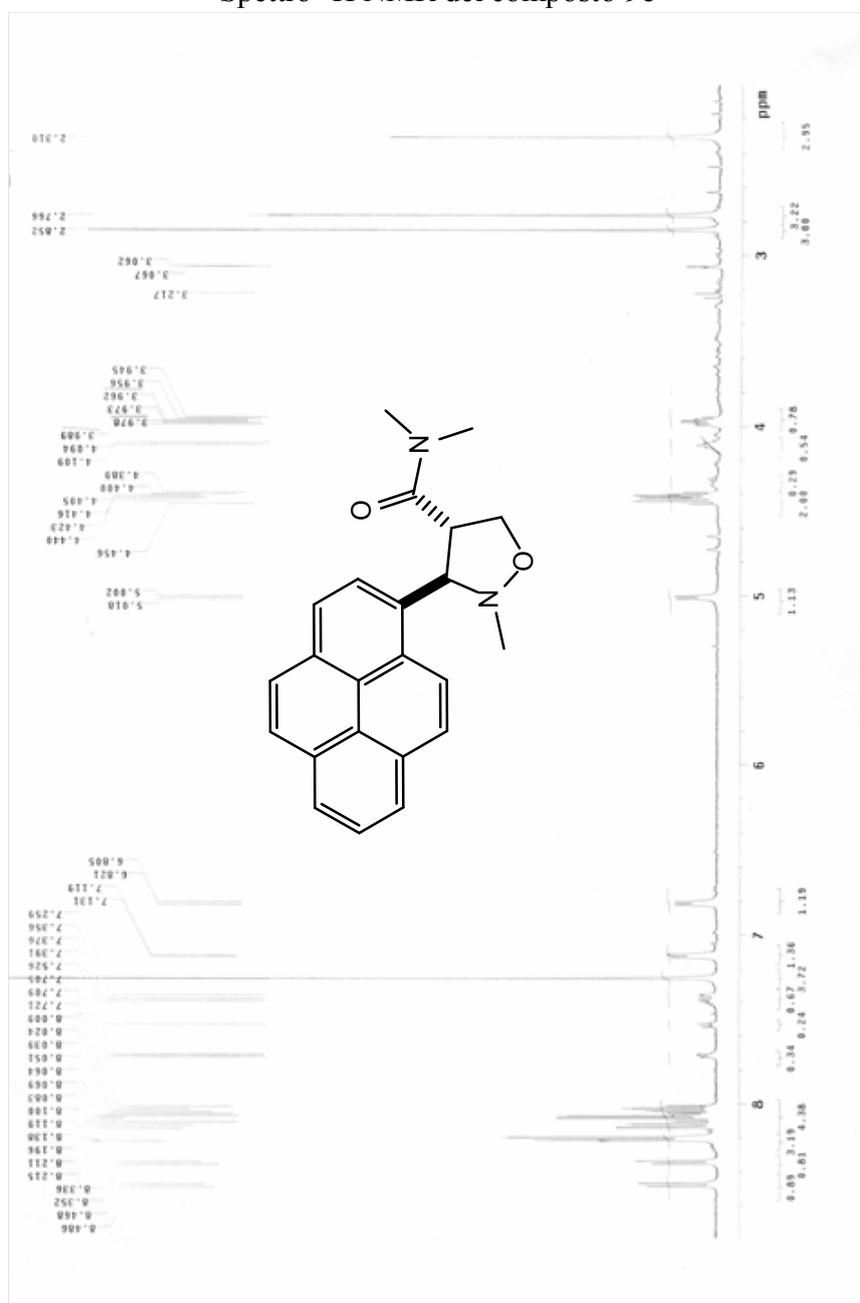


Spettro ^{13}C NMR del composto **7c**

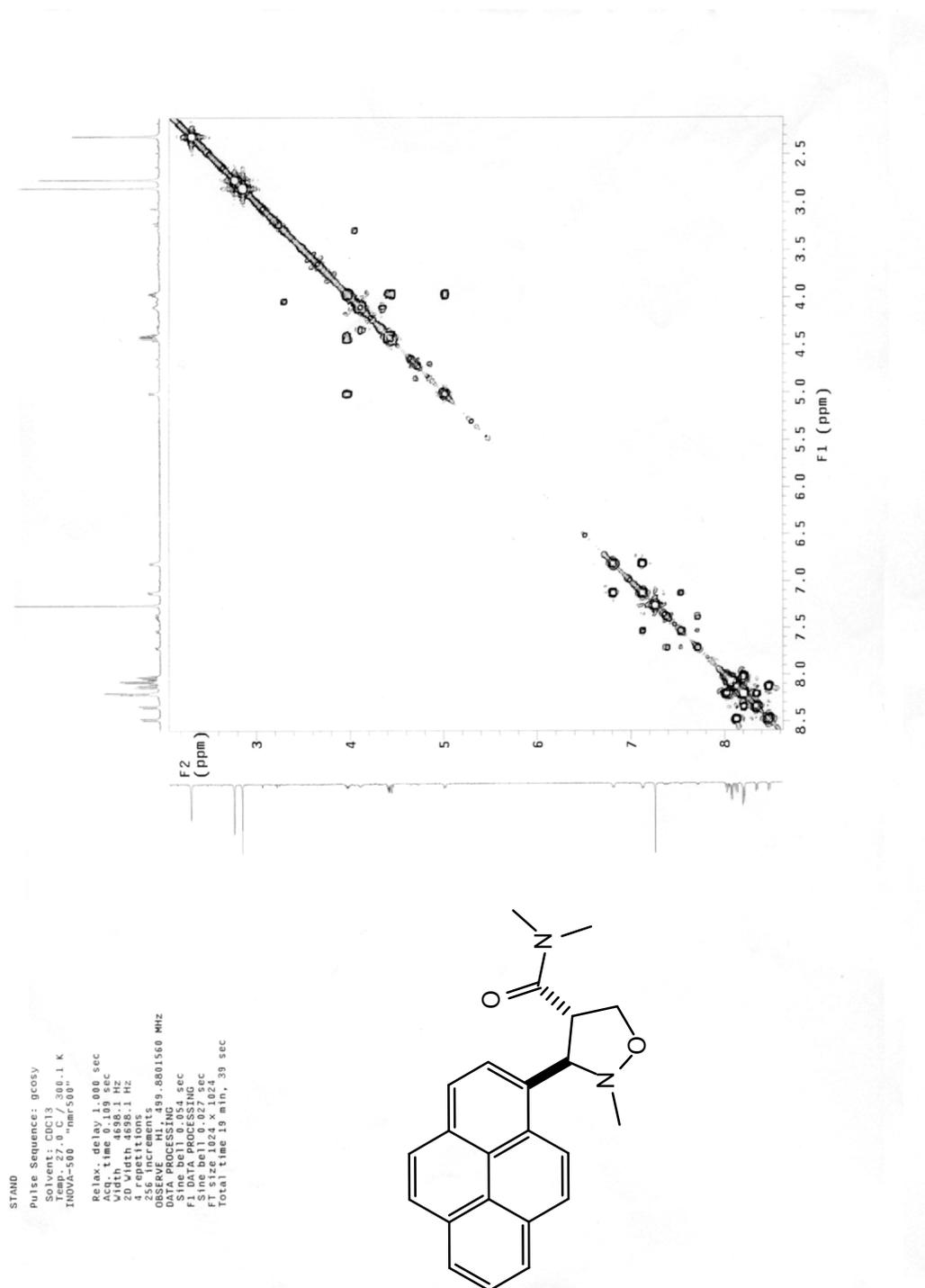
Spettro ^1H NMR del composto **8c**

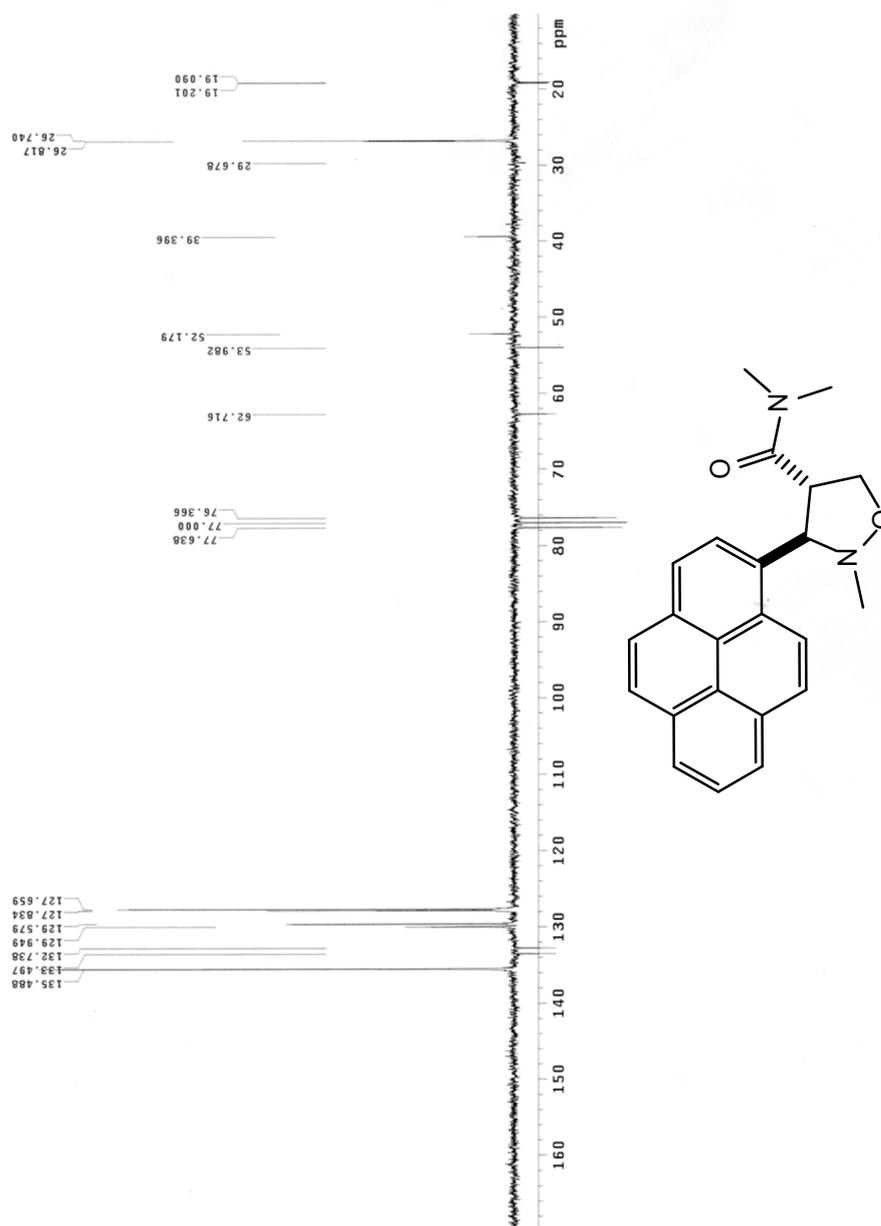
Spettro gcosy del composto **8c**

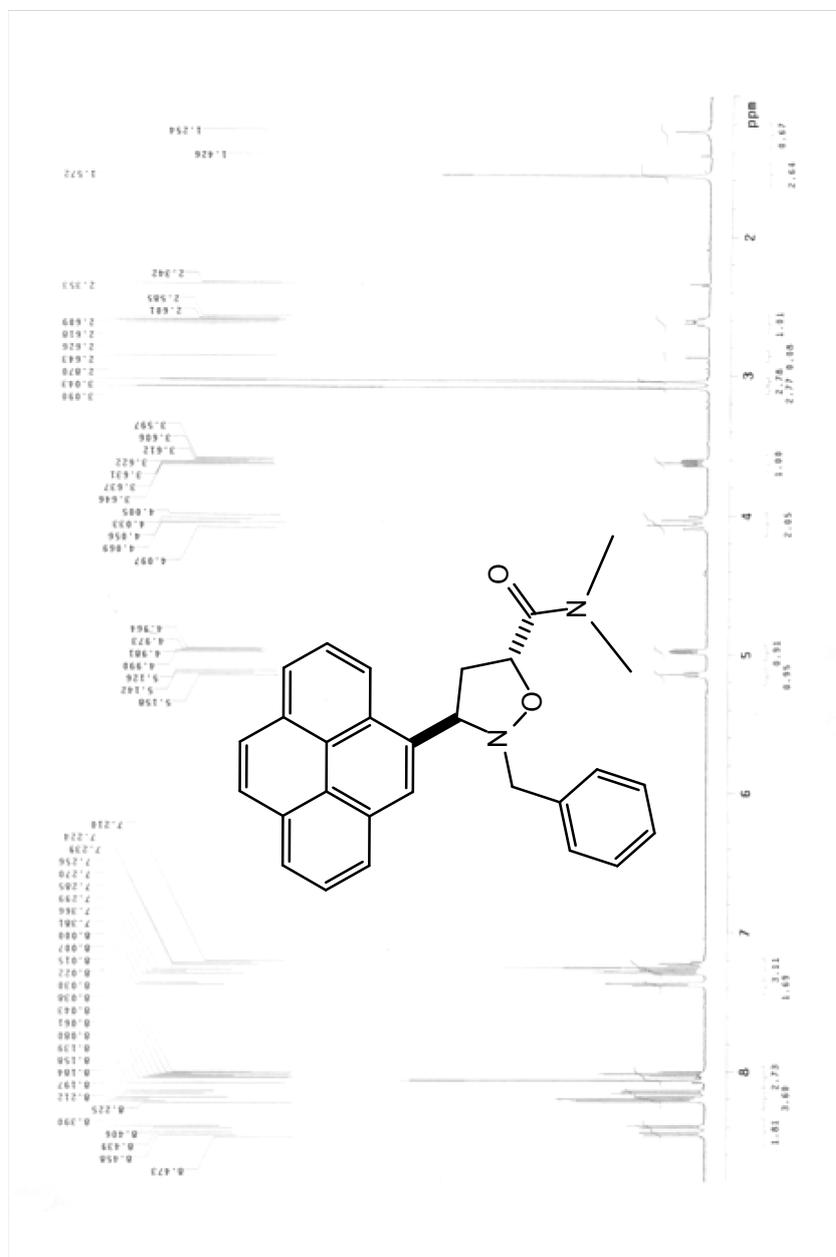
Spettro ^{13}C NMR del composto **8c**

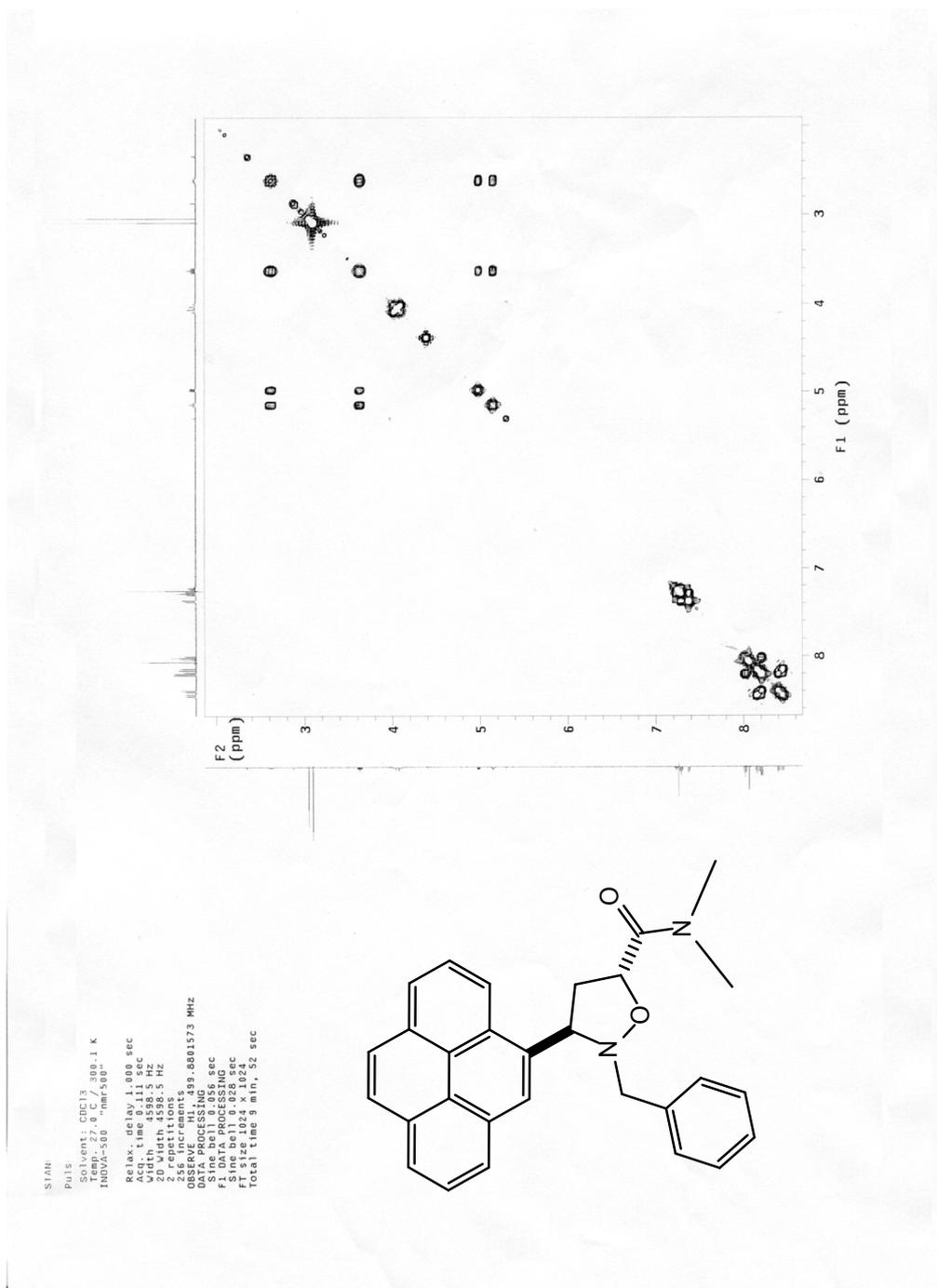
Spettro ^1H NMR del composto **9c**

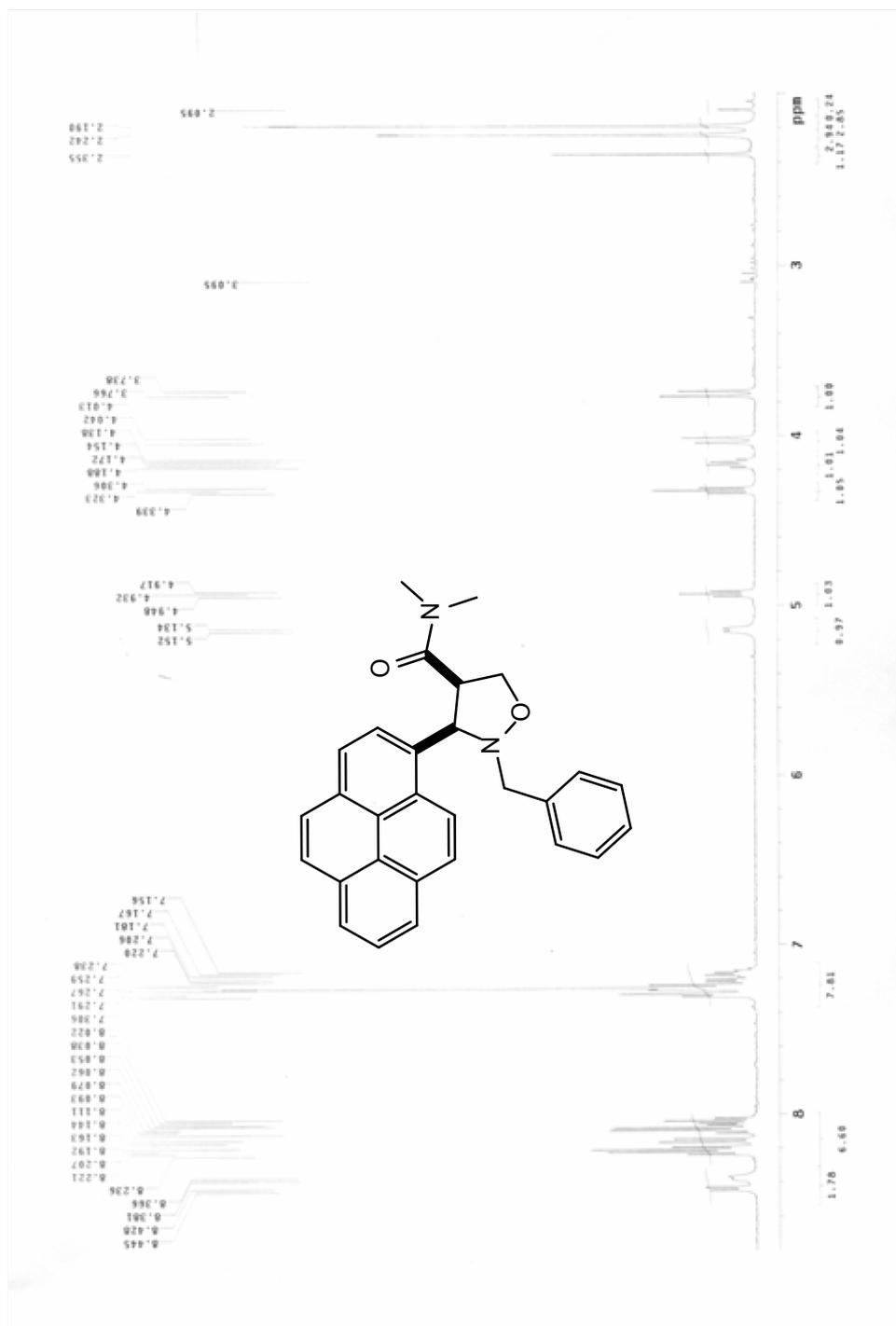
Spettro gcosy del composto 9c

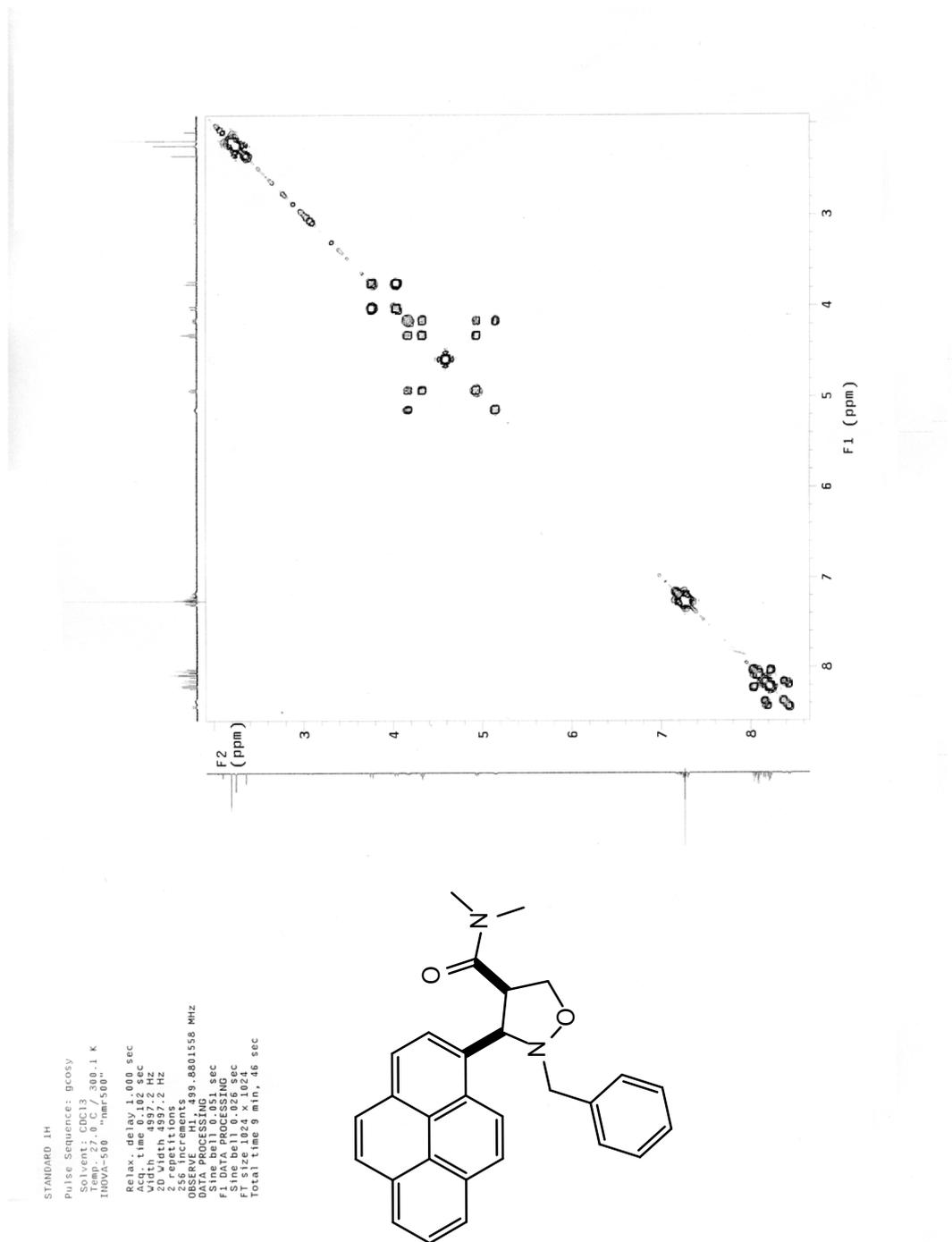


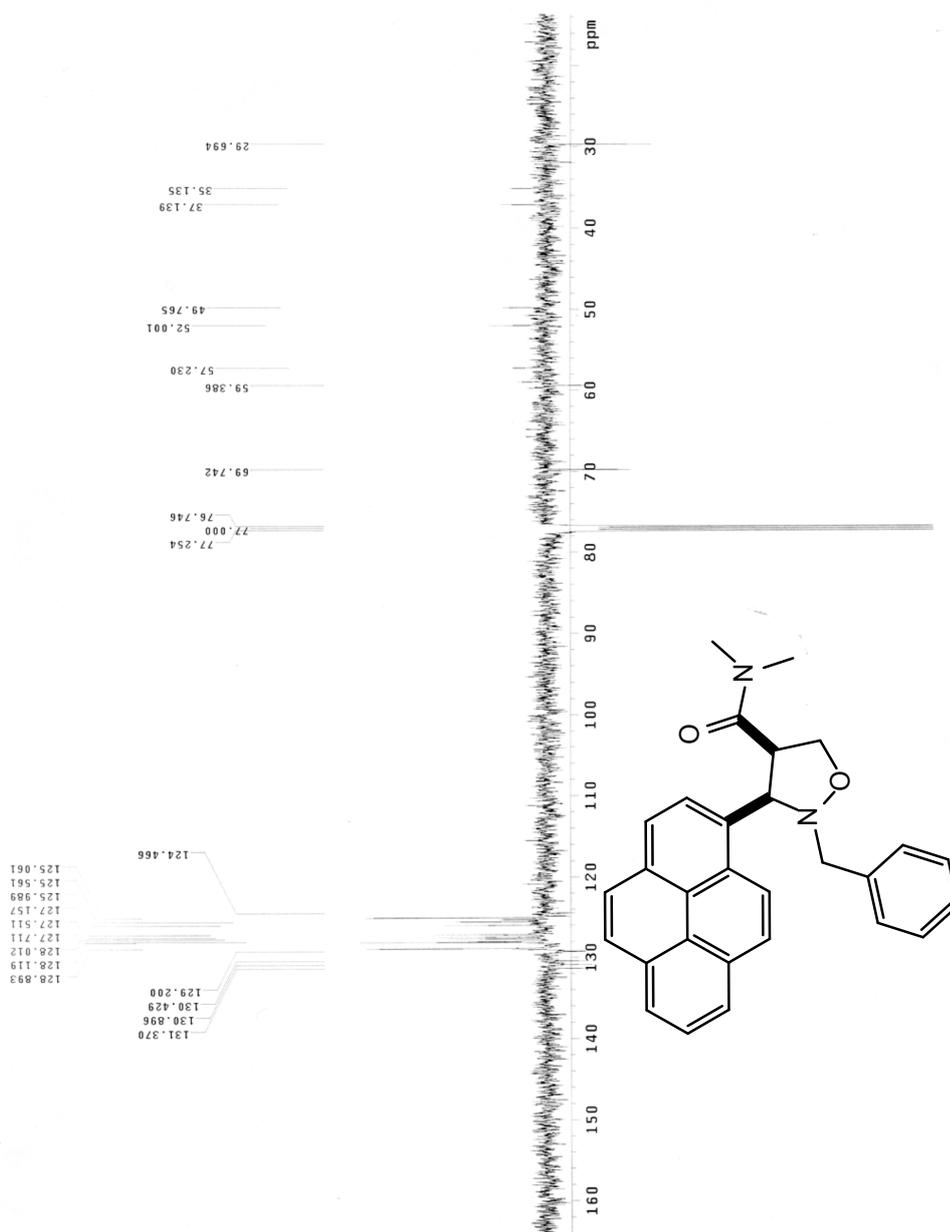
Spettro ^{13}C NMR del composto **9c**

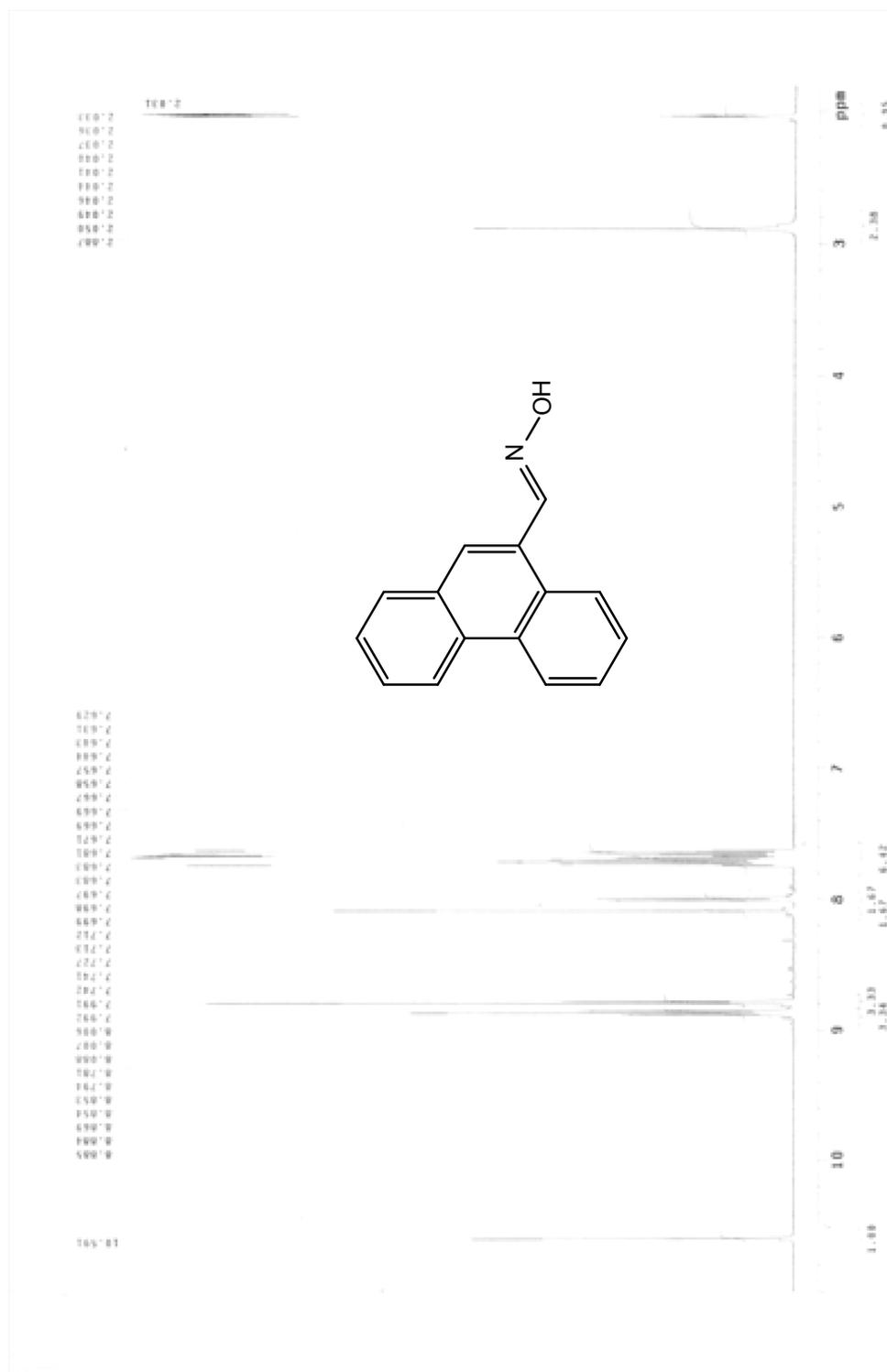
Spettro ^1H NMR del composto **7d**

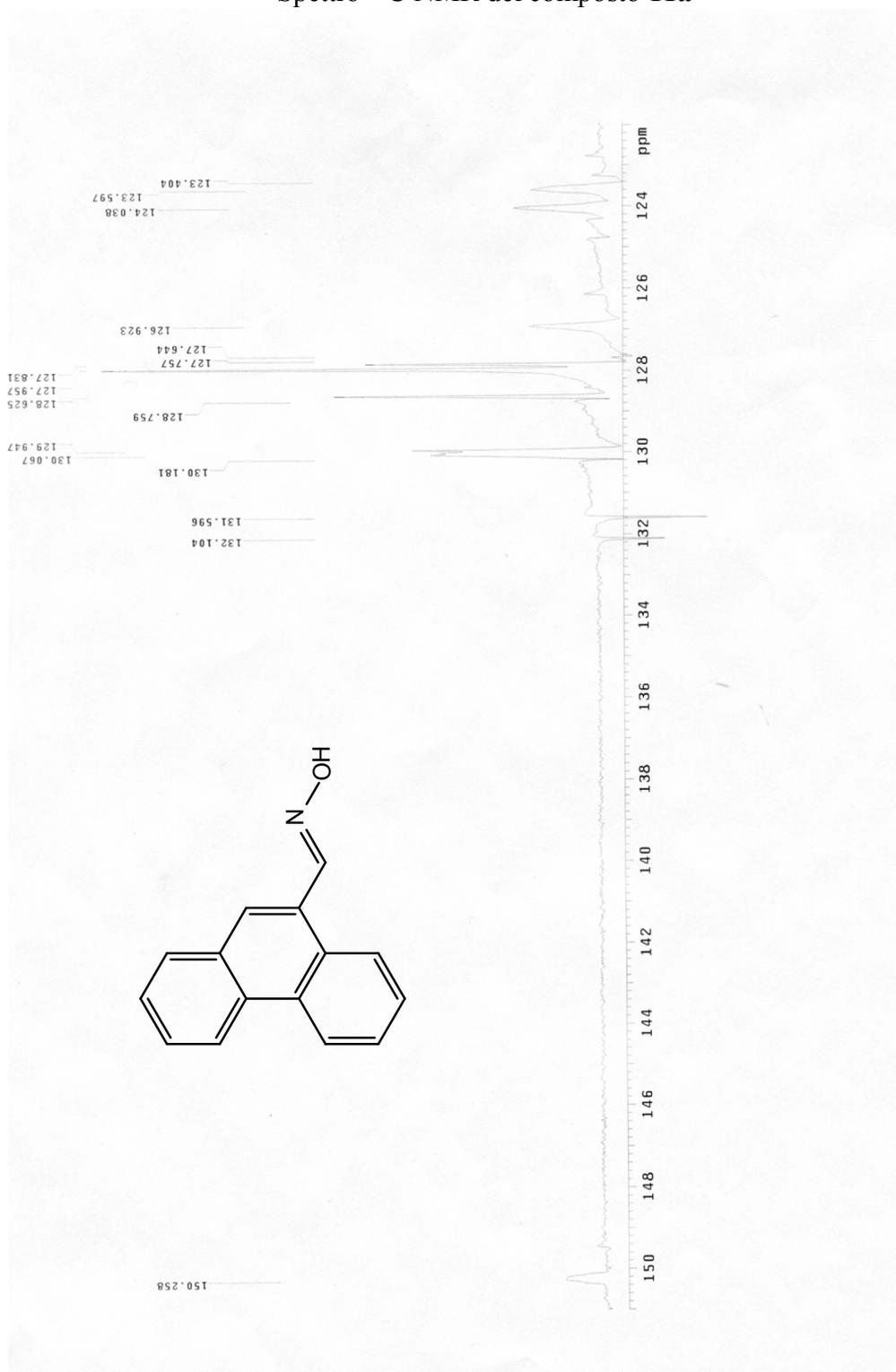
Spettro gcosy del composto **7d**

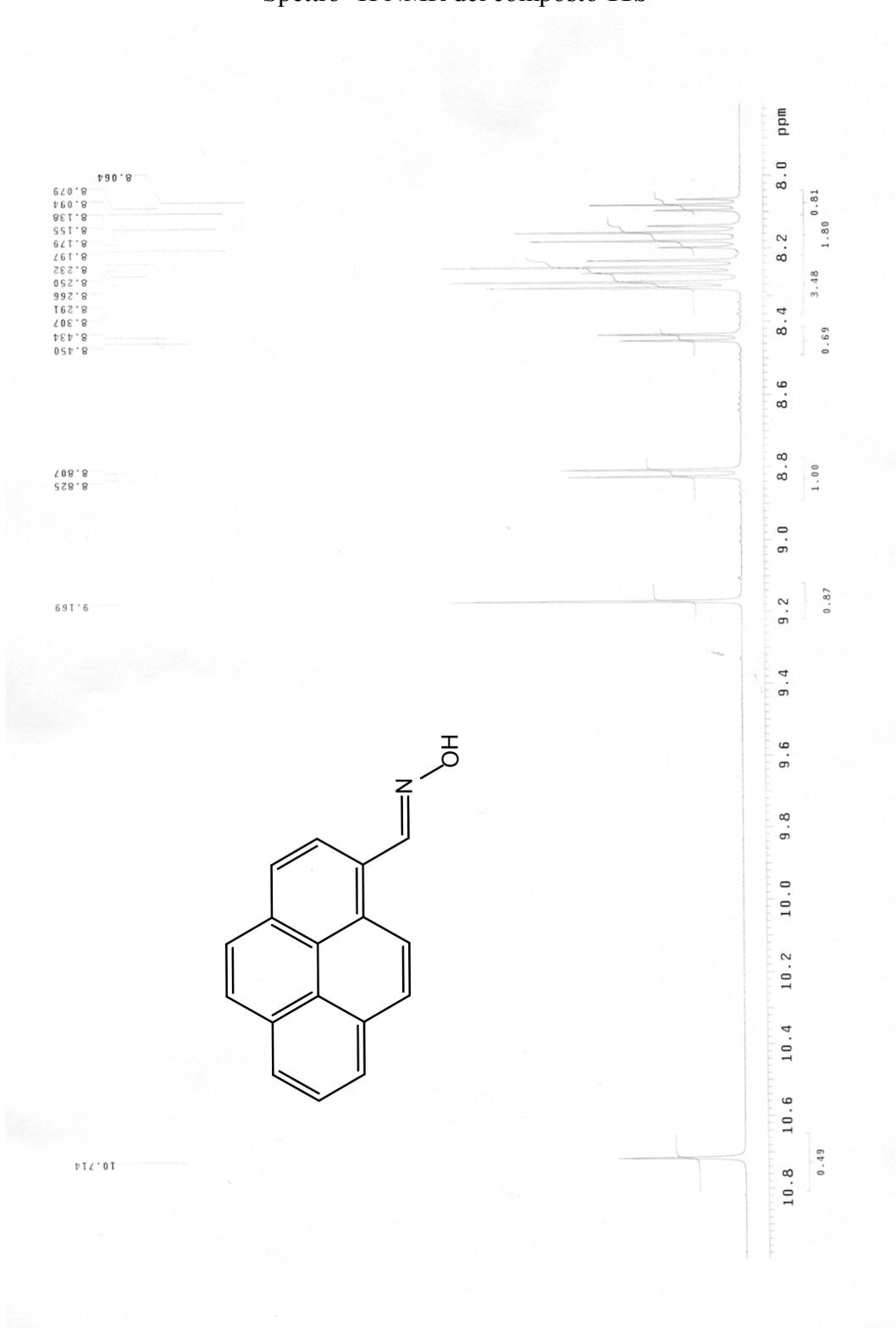
Spettro ^1H NMR del composto **10d**

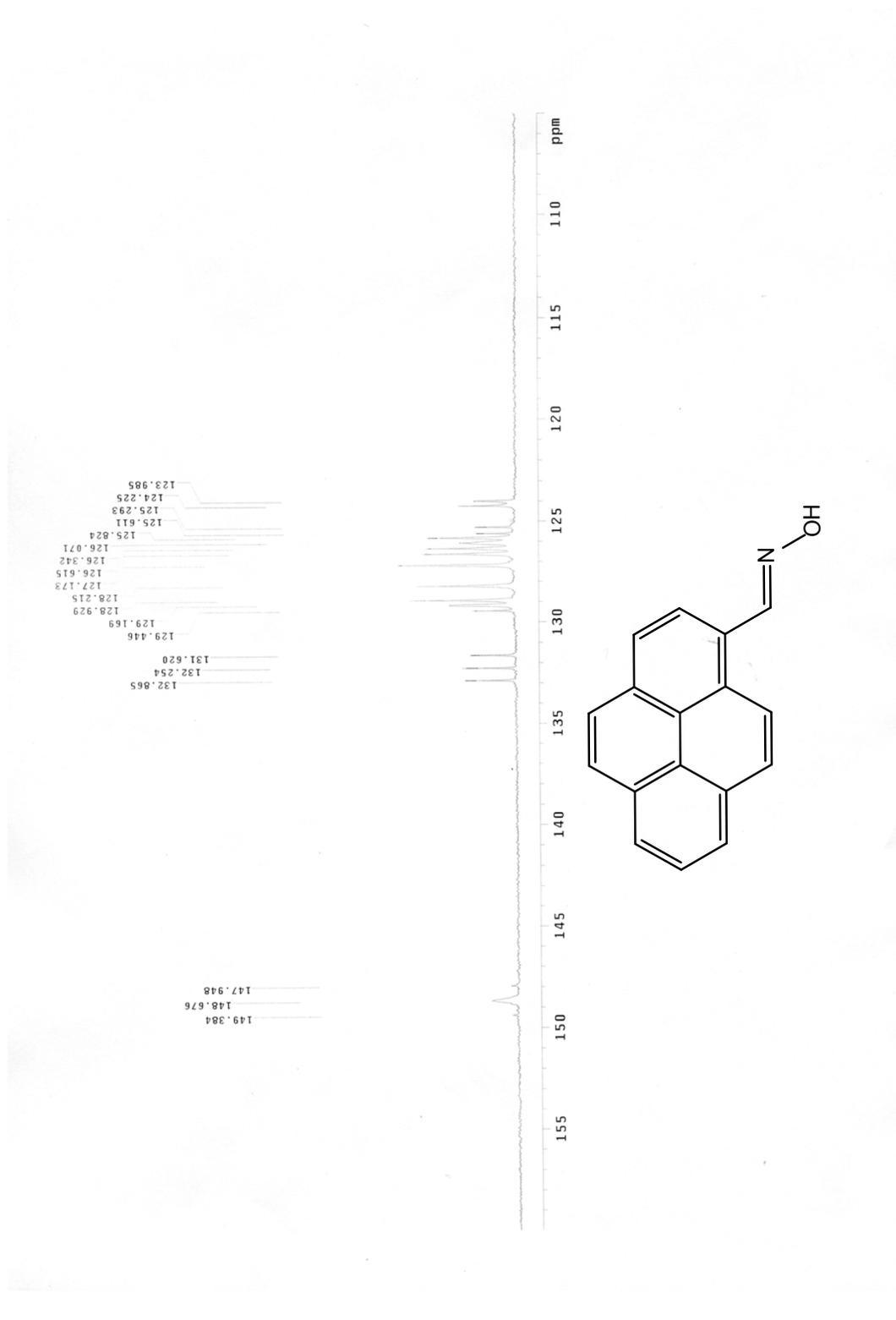
Spettro gcosy del composto **10d**

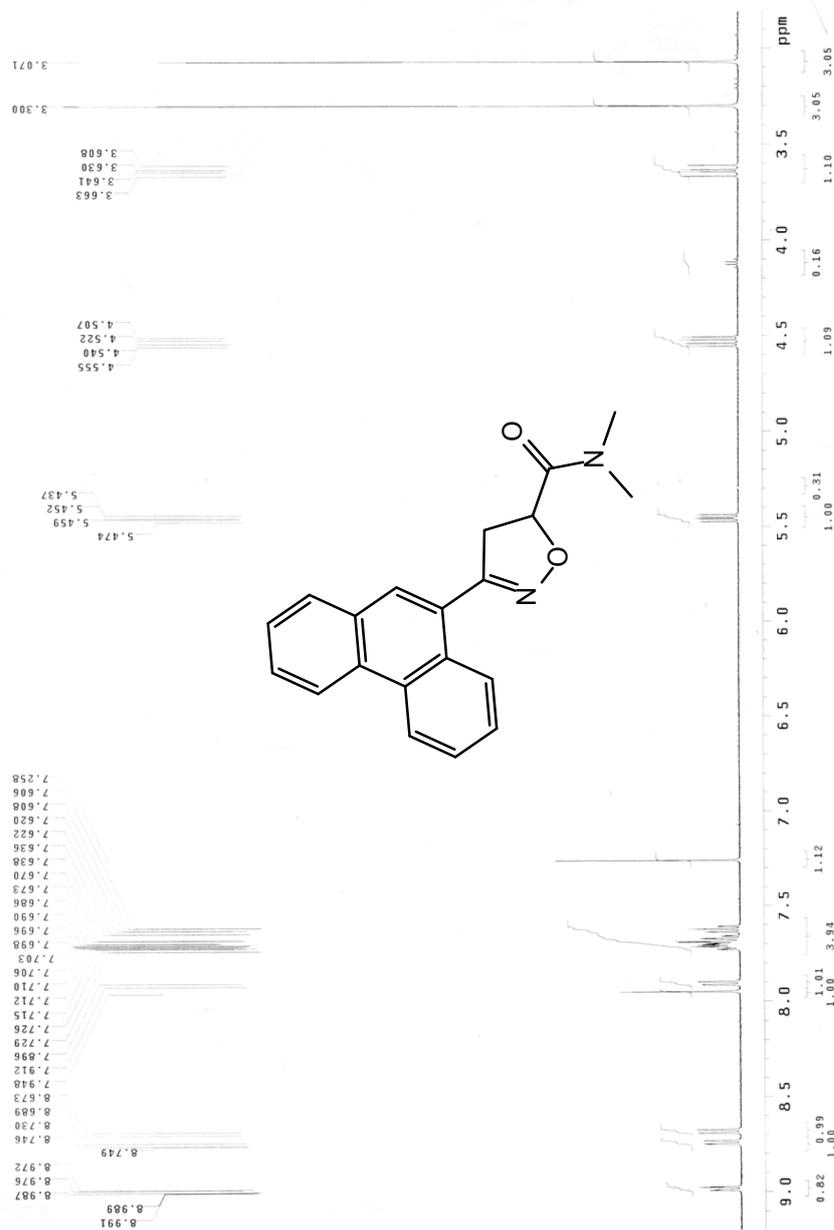
Spettro ^{13}C NMR del composto **10d**

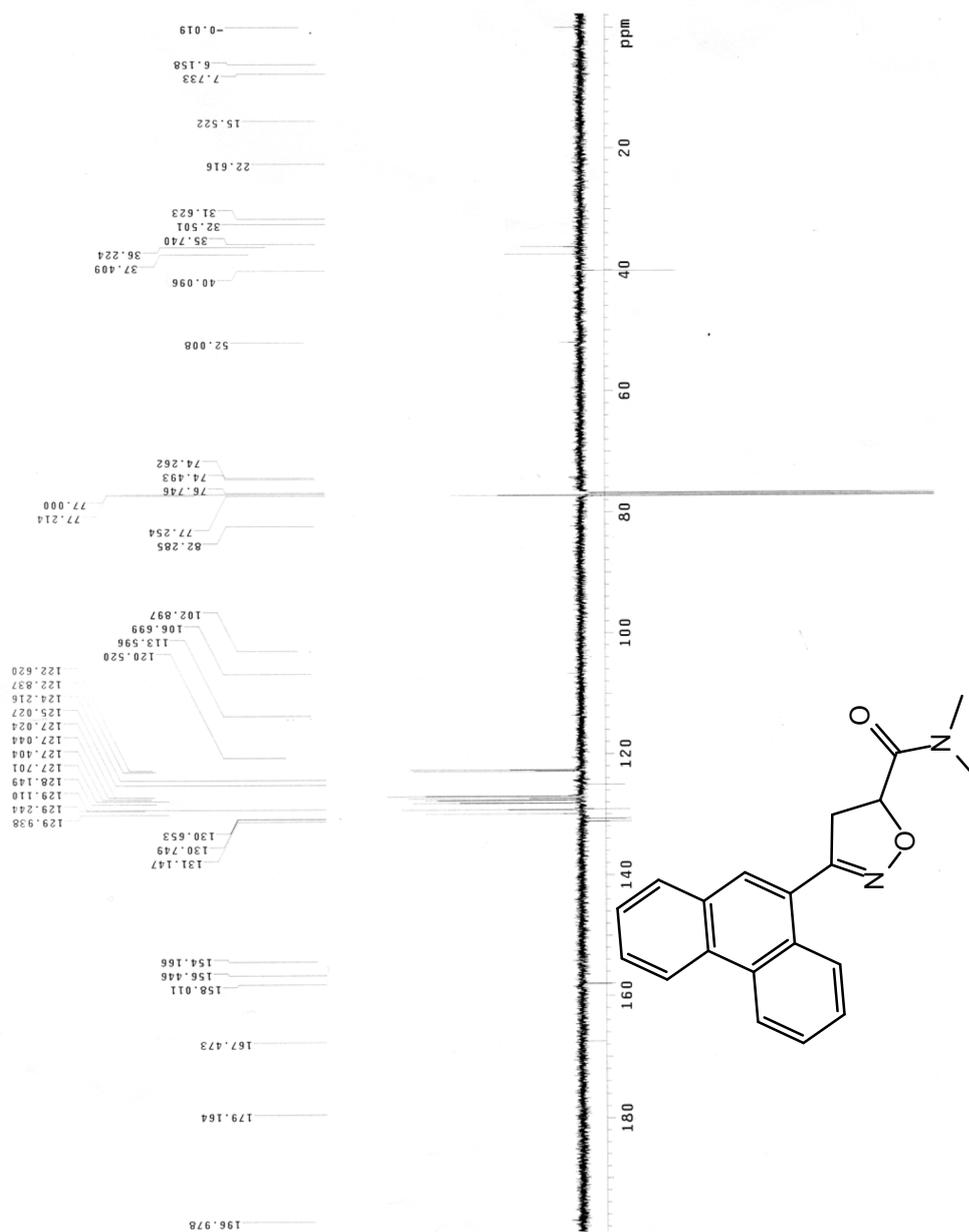
Spettro ^1H NMR del composto **11a**

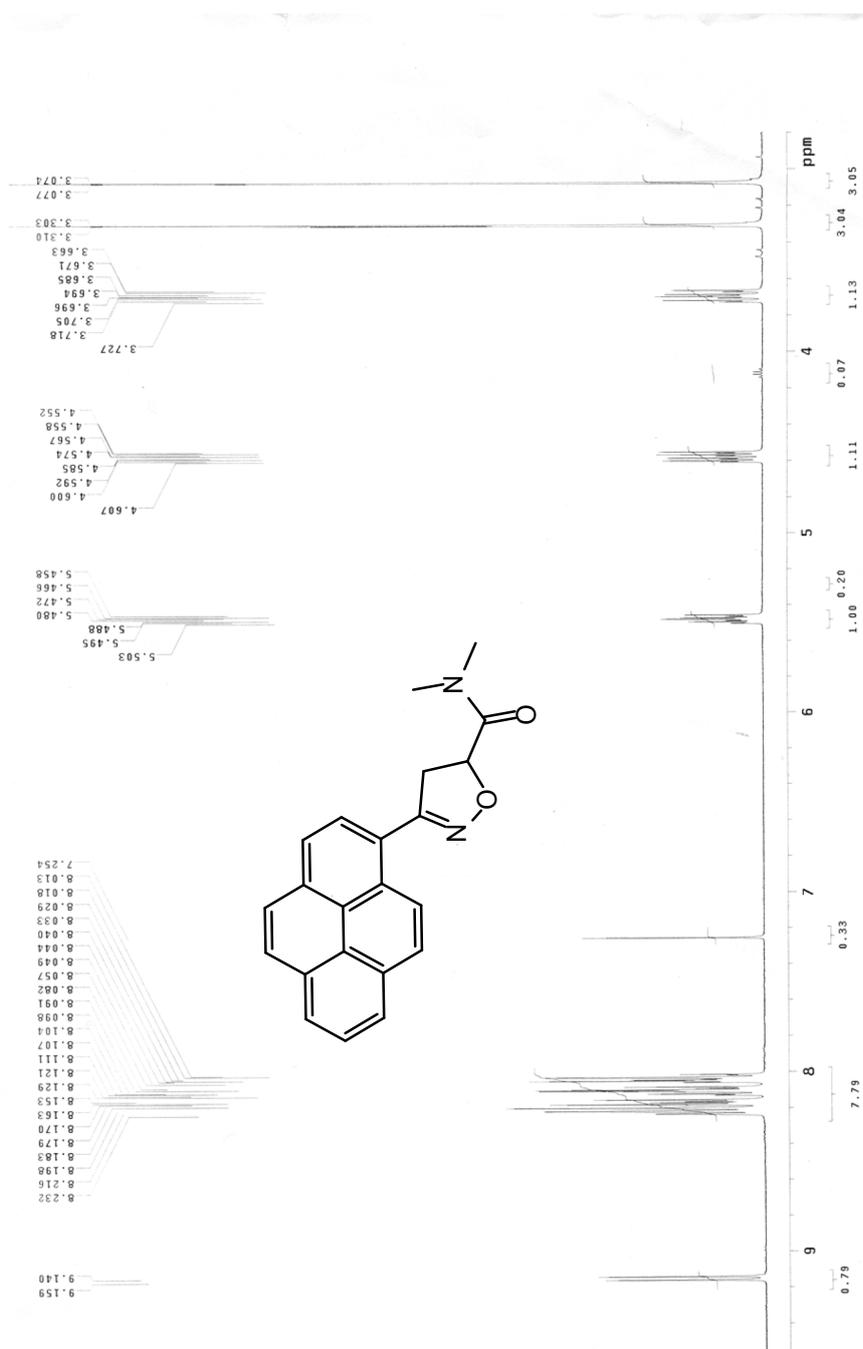
Spettro ^{13}C NMR del composto **11a**

Spettro ^1H NMR del composto **11b**

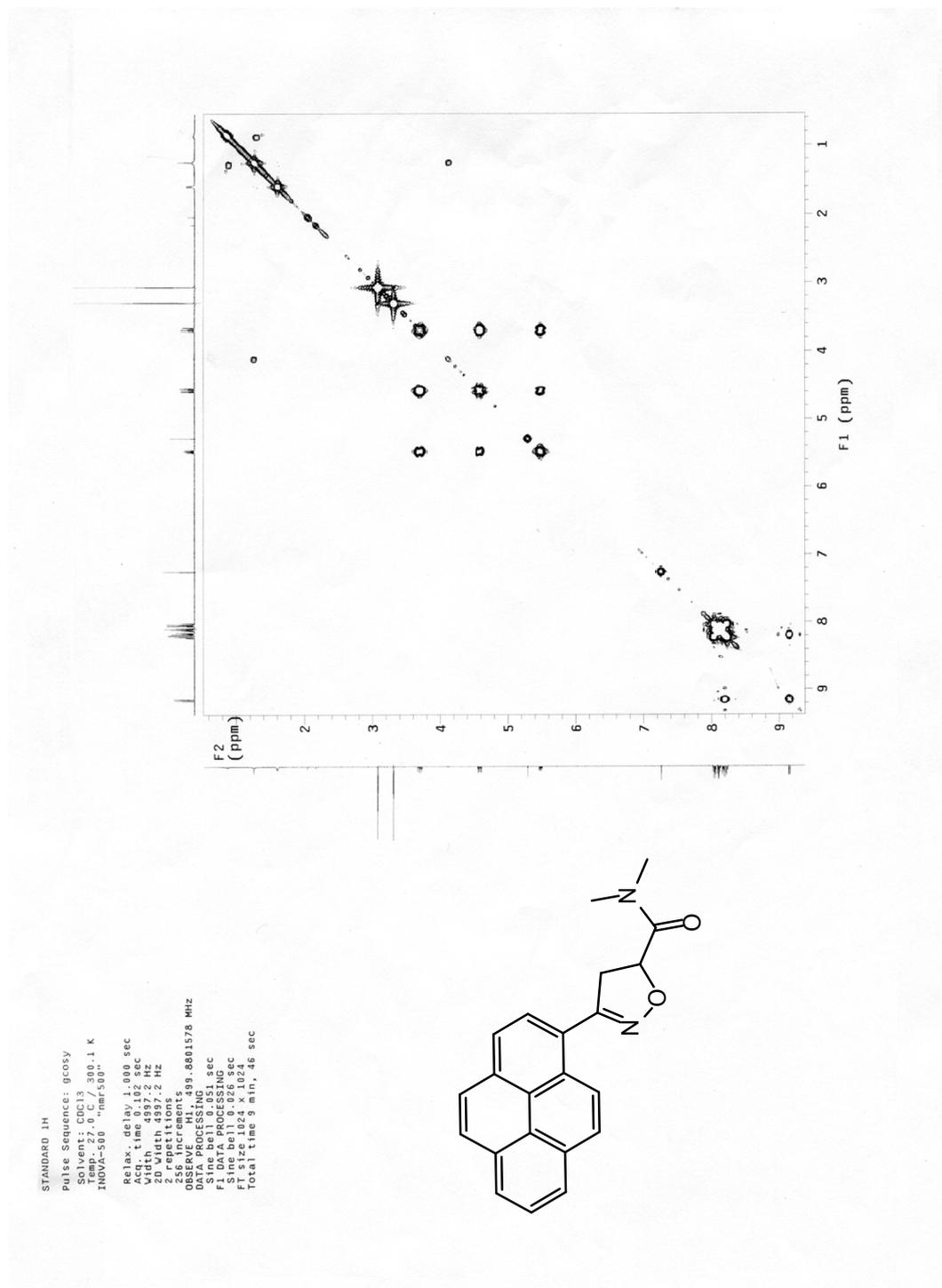
Spettro ^{13}C NMR del composto **11b**

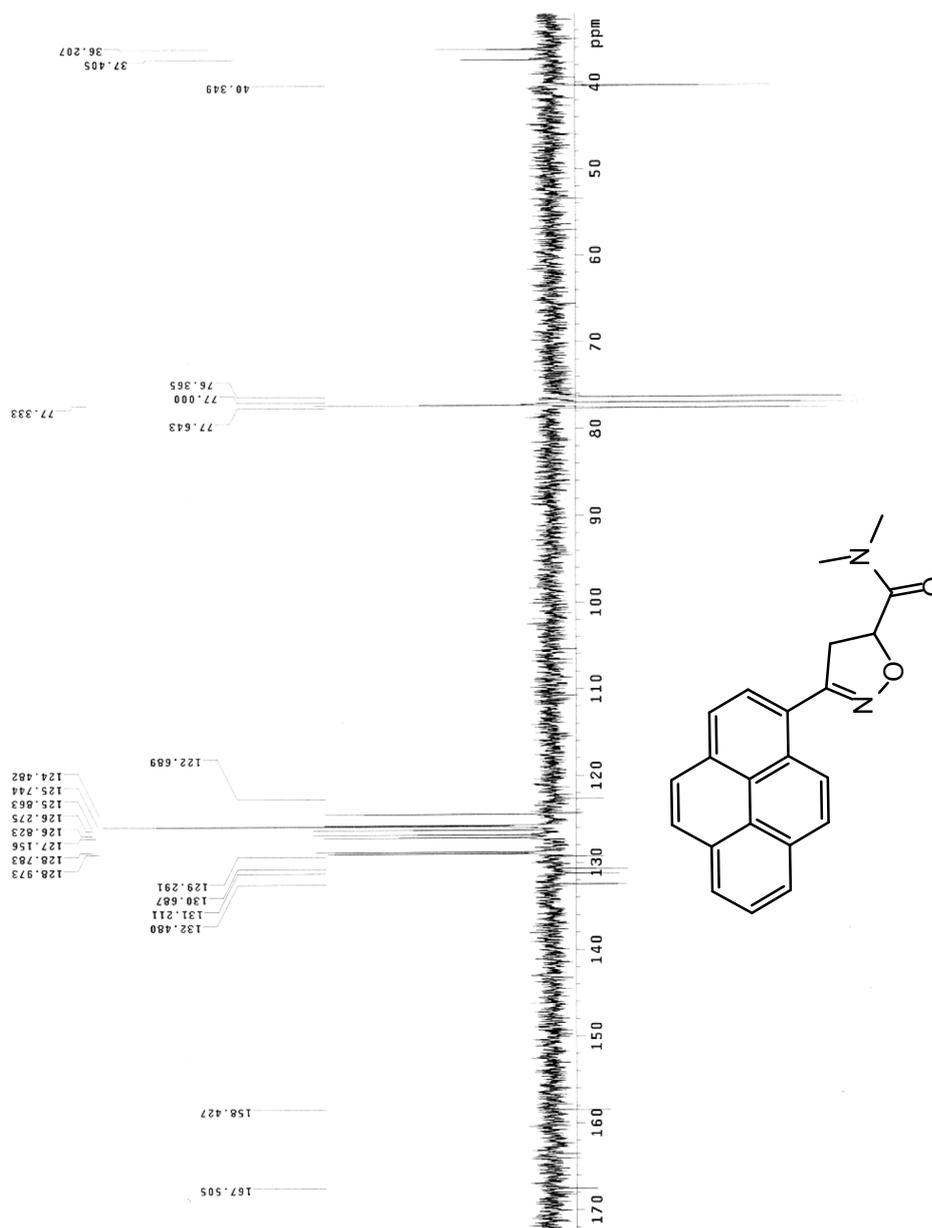
Spettro ^1H NMR del composto **13a**

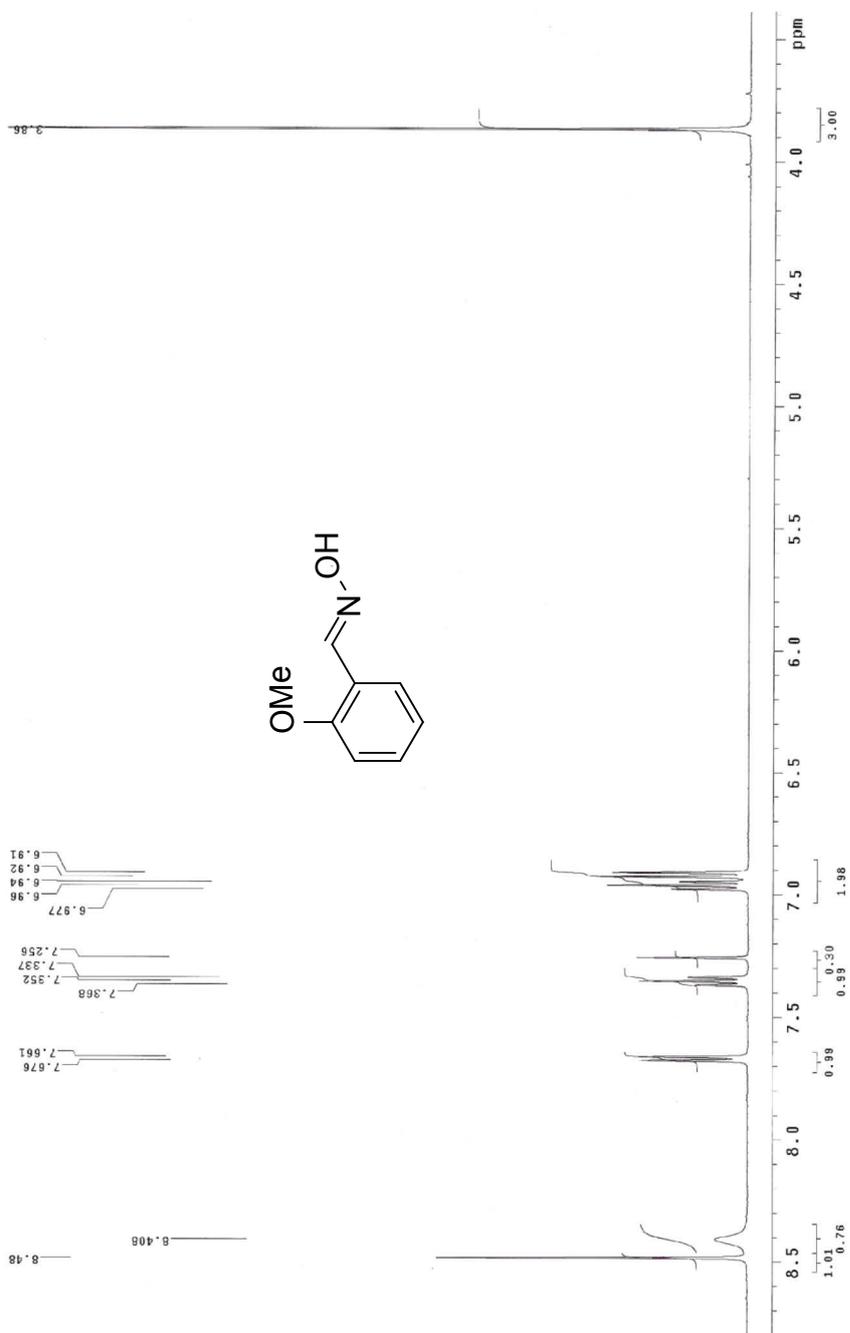
Spettro ^{13}C NMR del composto **13a**

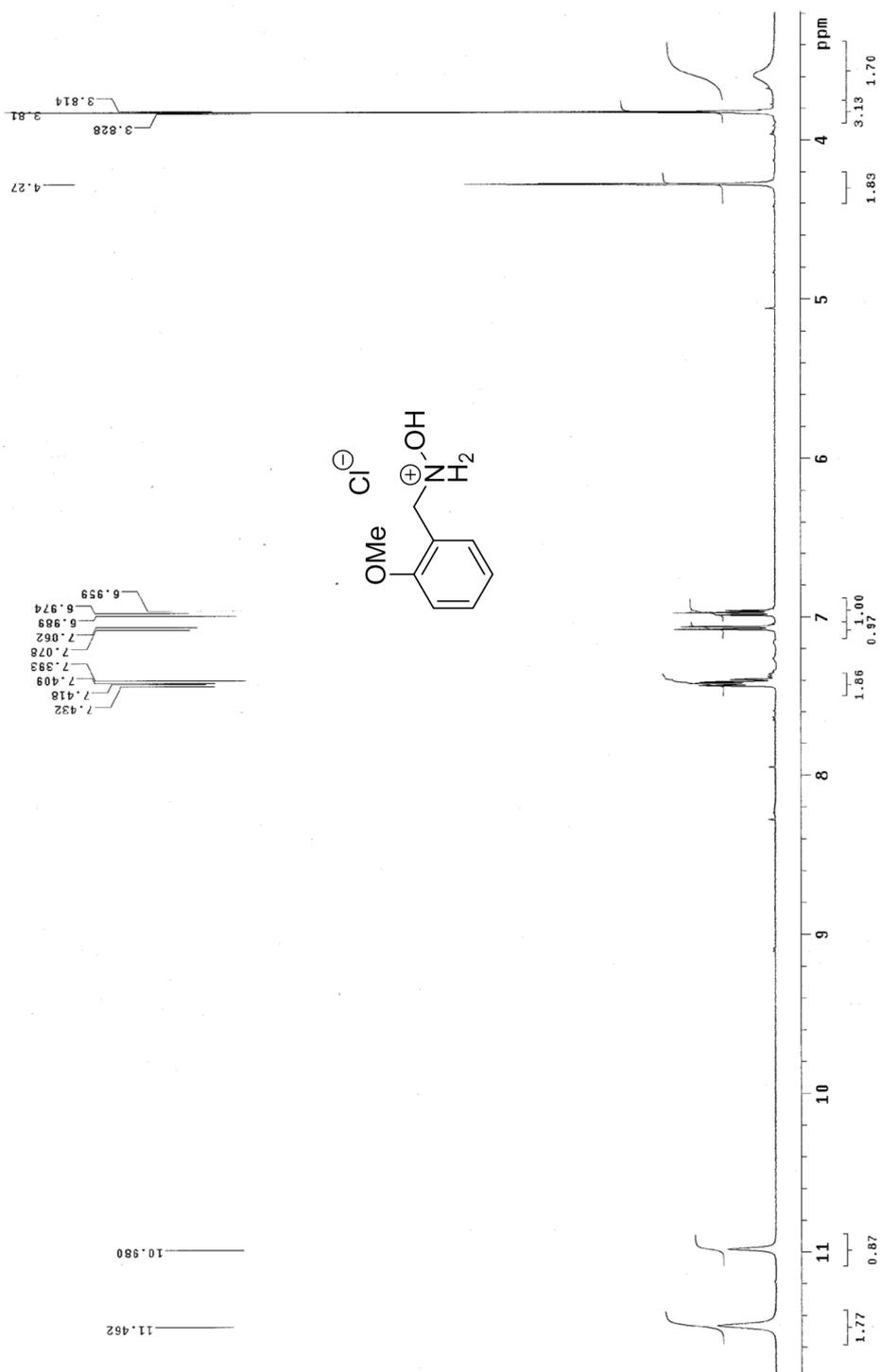
Spettro ^1H NMR del composto **13b**

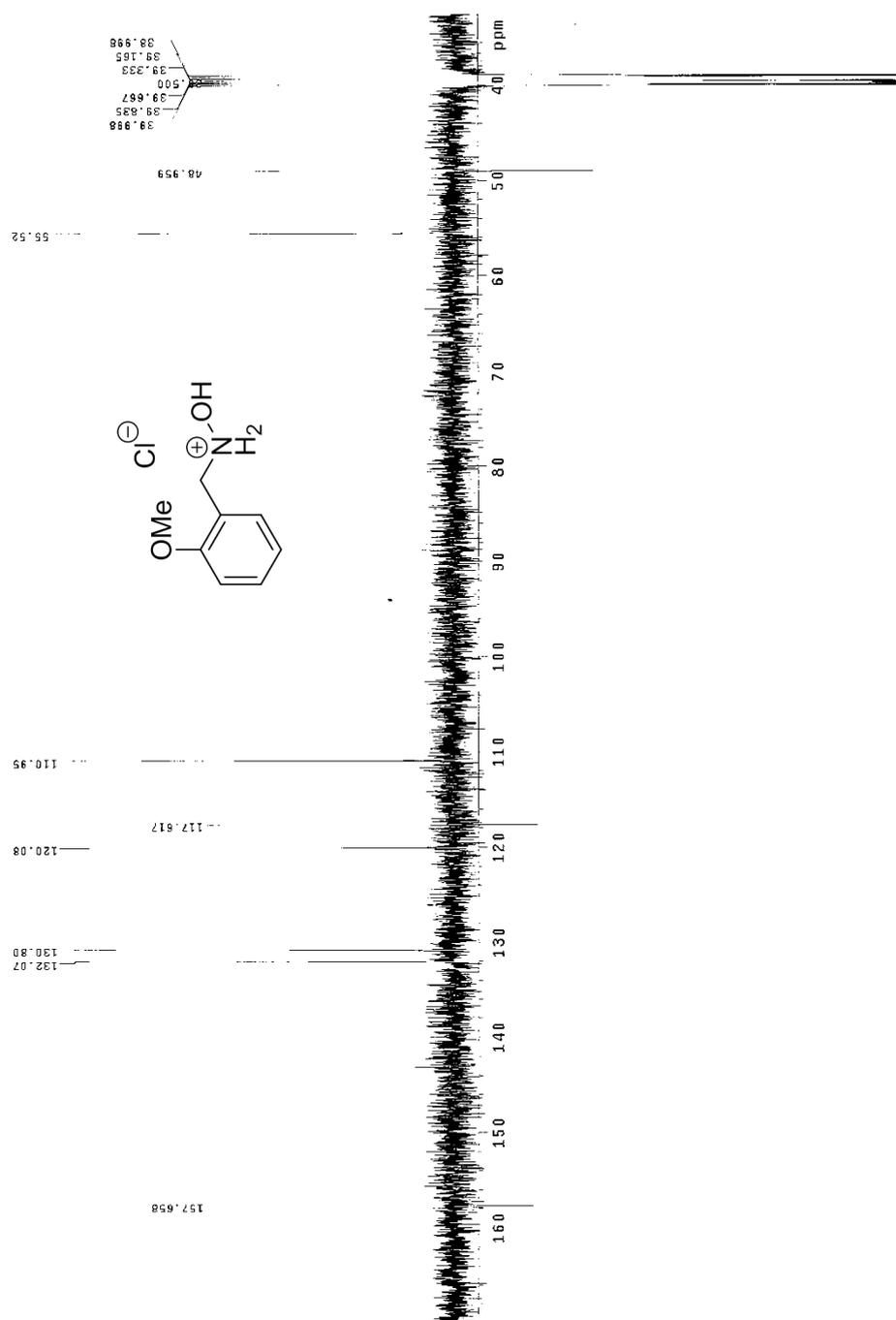
Spettro gcosy del composto 13b

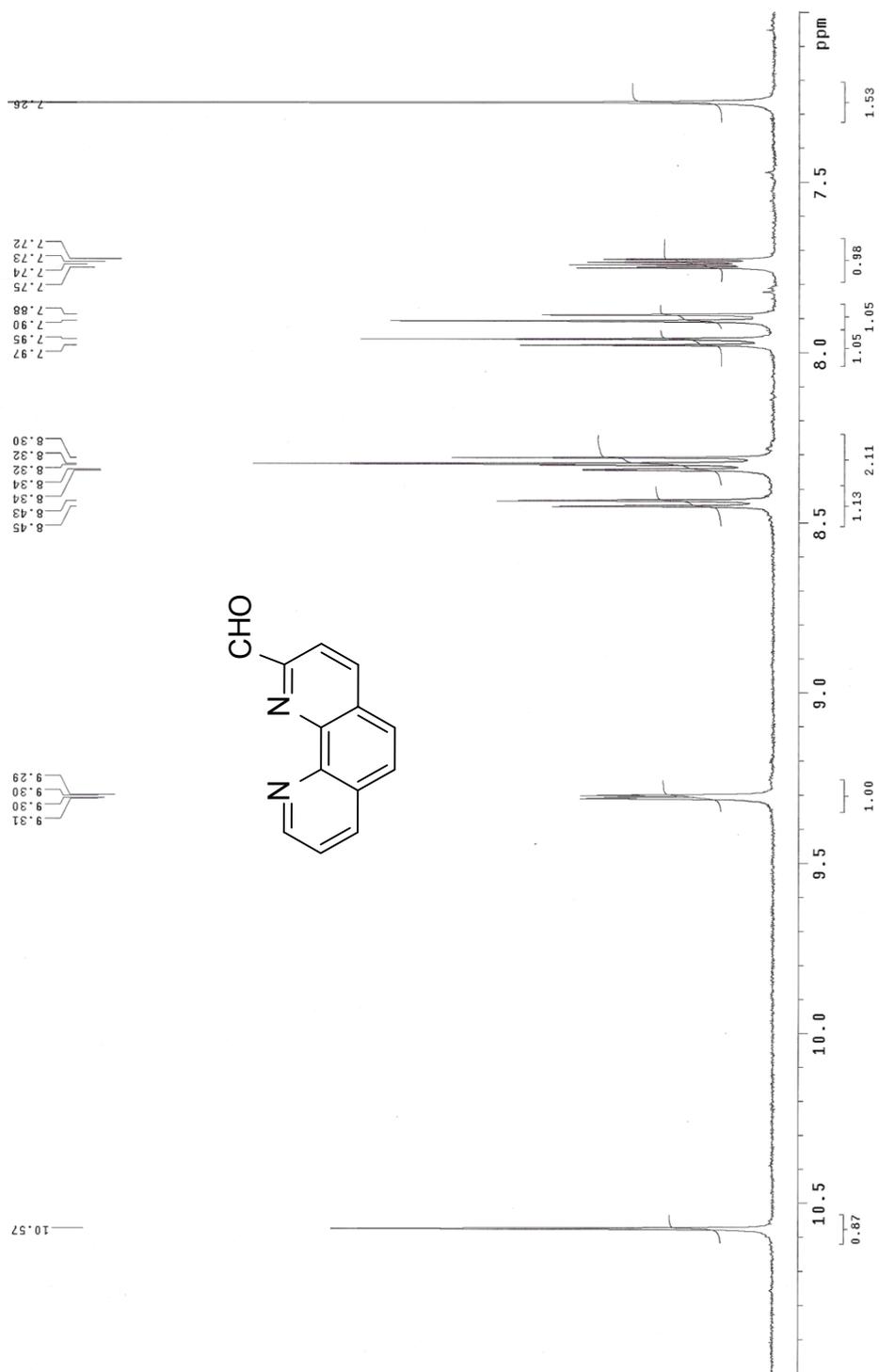


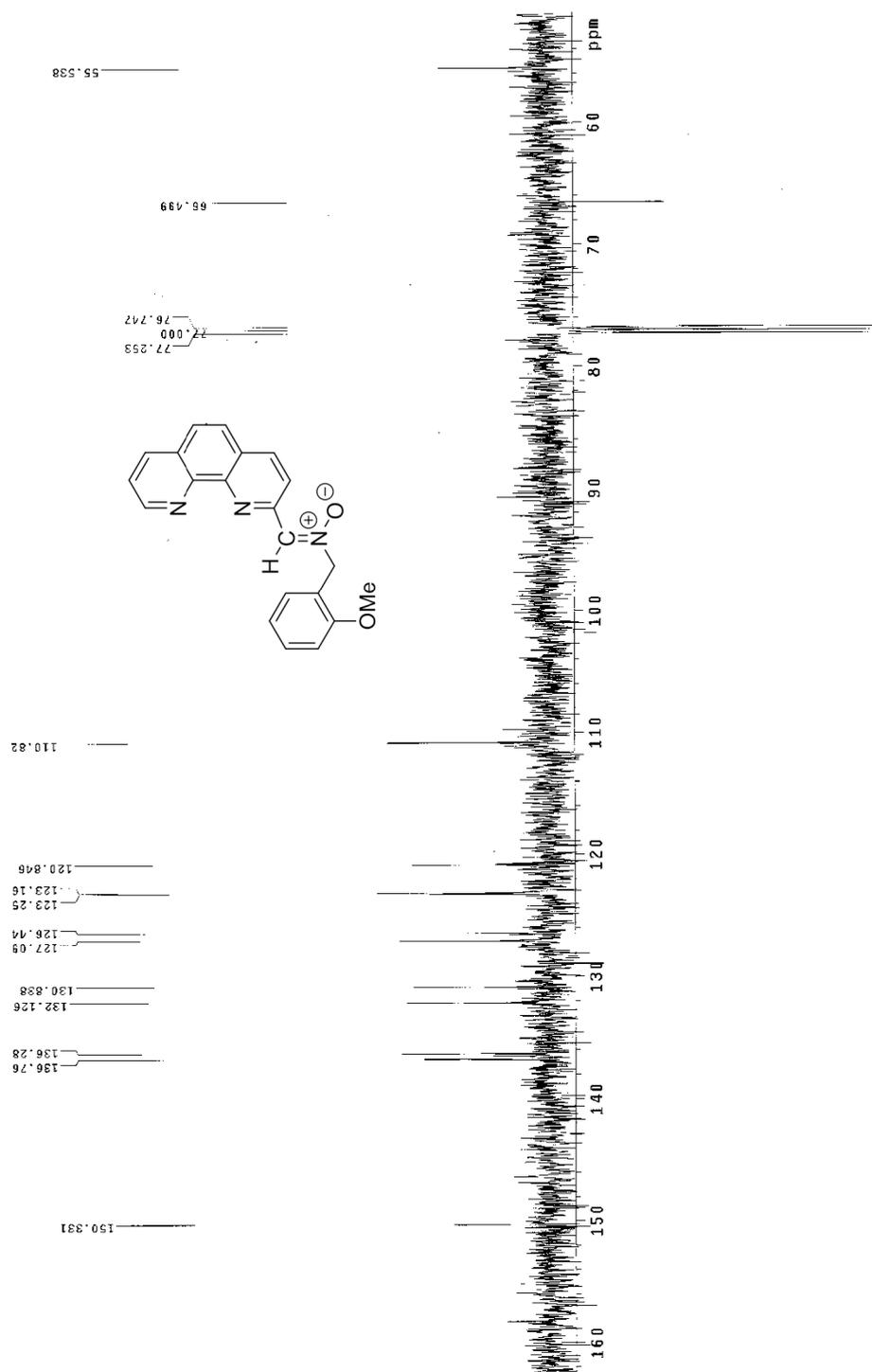
Spettro ^{13}C NMR del composto **13b**

Spettro ^1H NMR del composto **16**

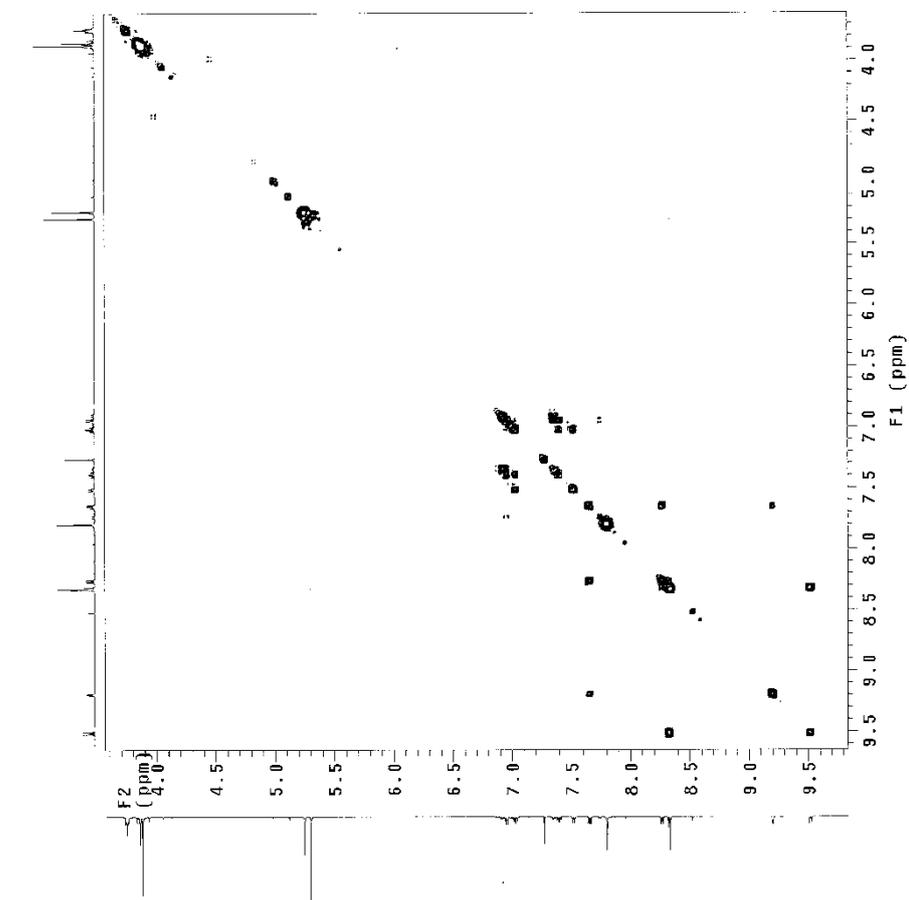
Spettro ^1H NMR del composto **17**

Spettro ^{13}C NMR del composto **17**

Spettro ^1H NMR del composto **18**

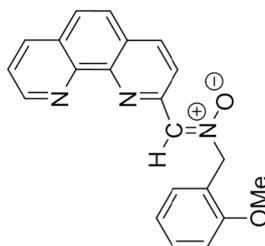
Spettro ^{13}C NMR del composto **19**

Spettro gcosy del composto 19

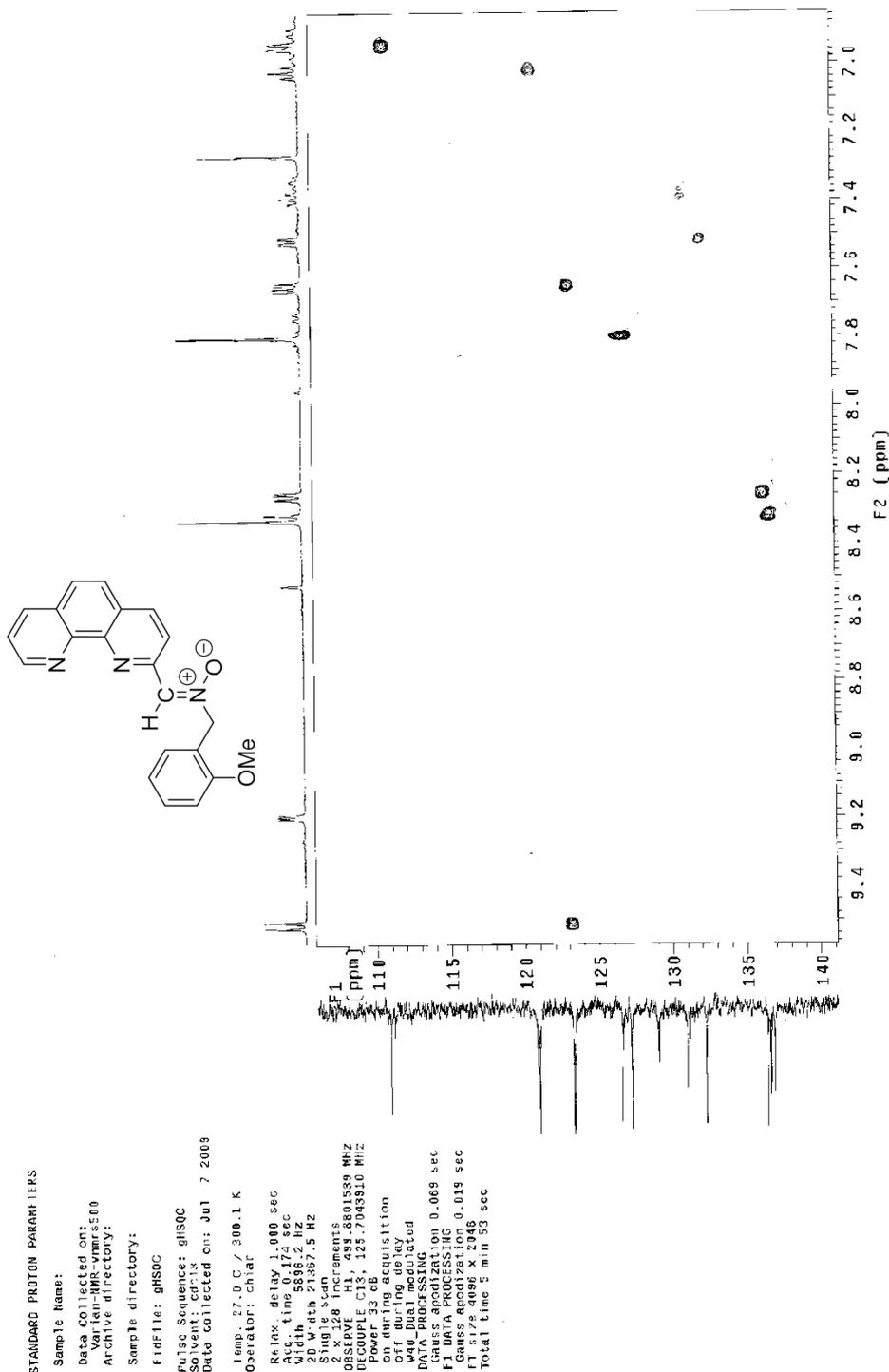


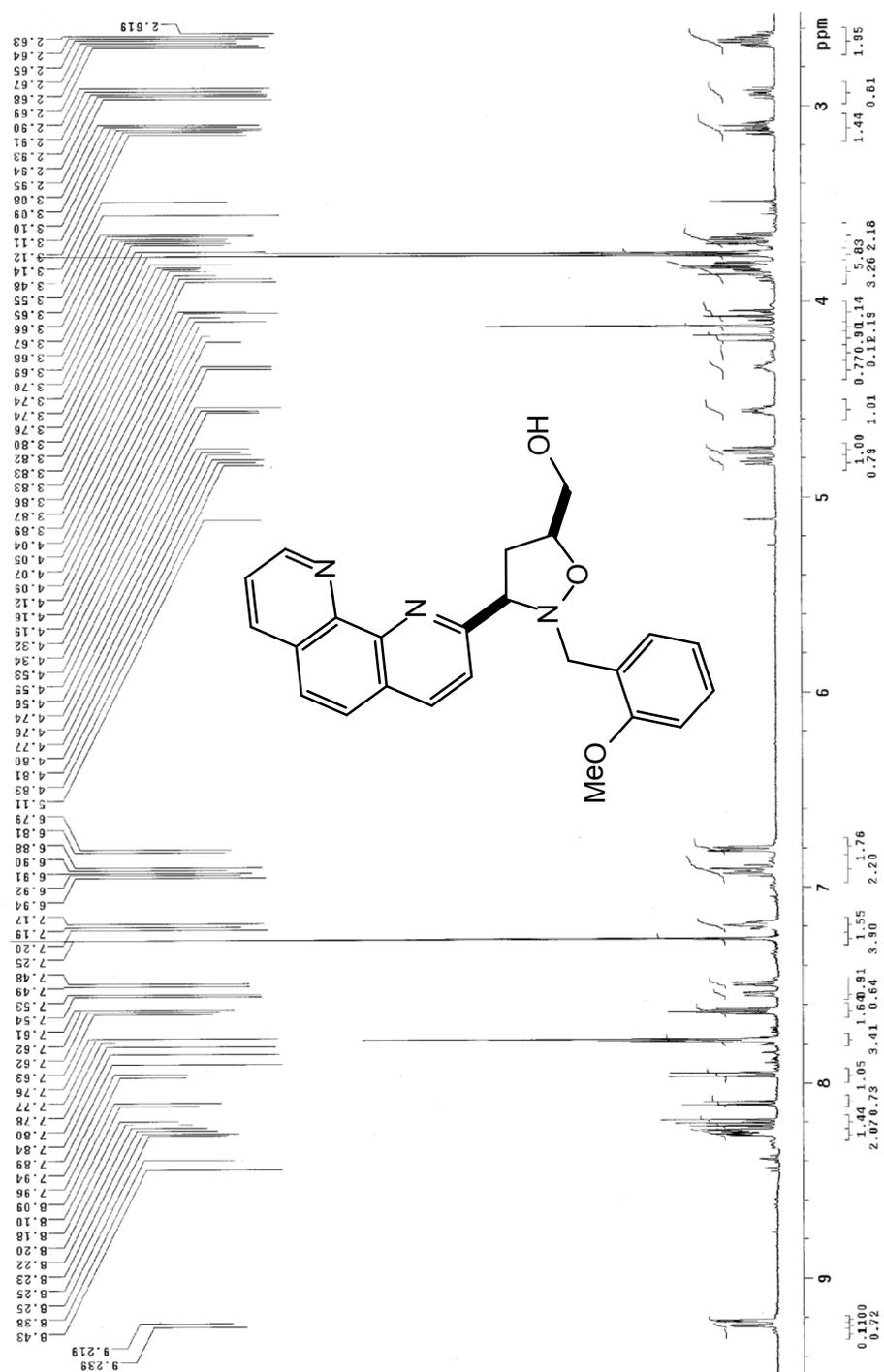
STANDARD PROTON PARAMETERS

Sample Name:
 Data Collected on:
 Varian-NMR-vnmr500
 Archive directory:
 Sample directory:
 Fid file: gcosy
 Pulse Sequence: gcosy
 Solvent: dmsd
 Data collected on: Jul 7 2008
 Temp.: 27.0 C / 300.1 K
 Operator: chiar
 Relax. delay: 1.000 sec
 Ord. time: 17.72 sec
 Width: 5896.2 Hz
 2D Width: 5896.2 Hz
 Single scan
 0.250 increments
 1280 increments
 DATA PROCESSING: 88.6801538 MHz
 Sine bell: 0.087 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell: 0.022 sec
 F2 DATA PROCESSING
 Sine bell: 0.022 sec
 Total time: 3 min 15 sec

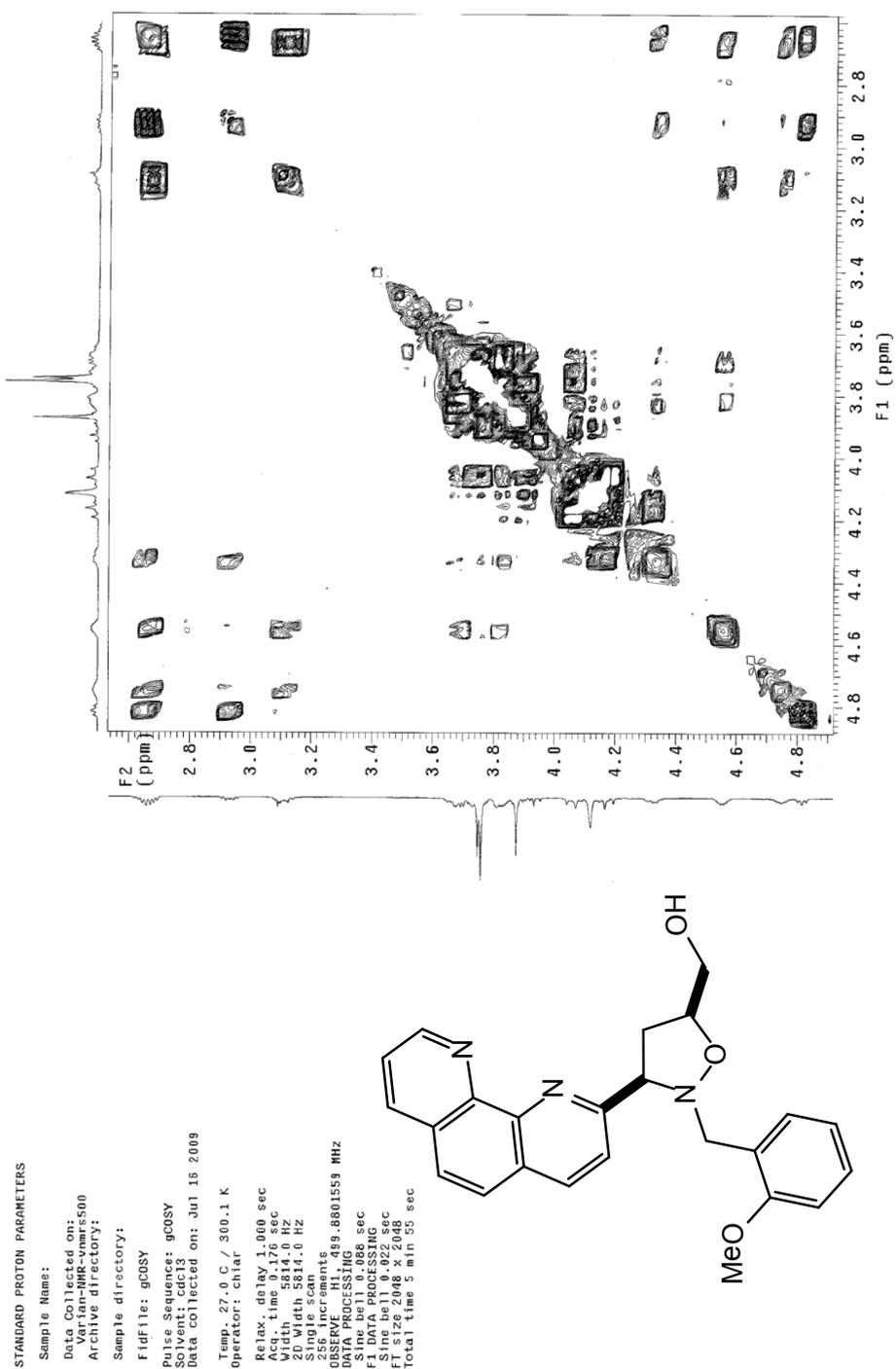


Spettro ghsqc del composto 19



Spettro ^1H NMR del composto **20**

Spettro gcosy del composto 20



BIBLIOGRAFIA

1. Graves, D. E.; Velea, L. M. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 915–929.
 2. Henry, D. W. *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63*, 845–854.
 3. Liu, L. F. *Ann. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 351–375.
 4. Hasing, Y-H.; Liu, L. F.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Kirschenbaum, S.; Silber, R.; Potmesil, M. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4385–4389.
 5. Danny, W. A.; Cain, B. F.; Atwell, G. J.; Hansch, C.; Panthananickal, A.; Leo, A. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 276–315.
 6. a) L. Brunton, J. Lazo, K. Parker, “*The Pharmacological Basis of Therapeutics*”, eleventh ed. Goodman and Gilman’s, McGraw-Hill, New York, **2005**; b) G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219–234; c) N. Zhang, Q. Yang, Primary tumor resection may improve prognosis for nonoperable advanced breast cancer, *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 1058–1059.
 7. M. Garcia, A. Jemal, E.M. Ward, M.M. Center, Y. Hao, R.L. Siegel, M.J. Thun, *Global Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, Atlanta, **2007**.
 8. M.H. David-Cordonnier, M.P. Hildebrand, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Keuser, K. Benzschawel, T. Lemster, U. Pindur, Design, synthesis and
-

-
- biological evaluation of new oligopyrrole carboxamides linked with tricyclic DNA intercalators as potential DNA ligands or topoisomerase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 752–771.
9. L.S. Lerman, Structural considerations in the interaction of deoxyribonucleic acid and acridines, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18–30.
 10. R. Martinez, L. Chacon-Garcia, The search of DNA-intercalators as anti-tumoral drugs: what it worked and what did not work, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 127–151.
 11. M.M. Heck, W.C. Earnshaw, Topoisomerase II: a specific marker for cell proliferation, *J. Cell. Biol.* **1986**, *103*, 2569–2581.
 12. D.W. Henry, Structure-activity relationships among daunorubicin and adriamycin analogs, *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63*, 845–854.
 13. M.E. Fox, P.J. Smith, Long-term inhibition of DNA synthesis and the persistence of trapped topoisomerase II complexes in determining the toxicity of the antitumor DNA intercalators mAMSA and mitoxantrone, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 5813–5818.
 14. a) Tufariello, J. J. “*1,3-Dipolar Cycloaddition*”, A. Padwa, Wiley Interscience, New York, **1984**, *2*, 83–168. b) Caramella, P.; Grünanger, P. “*1,3-Dipolar Cycloaddition*”, A. Padwa, Wiley Interscience, New York, **1984**, *1*, 291–392.
 15. a) DeShong, P.; Lander, S. W. Jr.; Leginus, J. M.; Dicken, M. “*Advances in Cycloaddition*”, D. P. Curran; JAI Press Inc., Greenwich, **1988**, *1*, 87–
-

-
128. b) Padwa, A.; Schoffstall, A. M. “*Advances in Cycloaddition*”, D. P. Curran; JAI Press Inc., Greenwich, **1990**, 2, 2–28. c) Grünanger, P.; Vita Finzi, P.; “*The Chemistry of Heterocyclic Compounds: Isoxazoles*”, E. C. Taylor, Wiley Interscience New York, **1991**, 733–777.
16. a) Annunziata, R.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Raimondi, L. *Gazz. Chim. Ital.* **1989**, 119, 253–268. b) Aurich, H. G.; Viesemeier, F.; Boutahar, M. *Chem. Ber.* **1991**, 124, 2329–2334. c) Aurich, H. G.; Frenzen, G.; Gentes, C. *Chem. Ber.* **1993**, 126, 787–795. d) Aurich, H. G.; Quintero, J. L. *Tetrahedron* **1994**, 50, 3929–3941. e) Chiacchio, U.; Di Bella, M. R.; Rescifina, A.; Romeo, G.; Uccella, N. *Heterocycles* **1993**, 36, 2209–2213. f) Padwa, A.; Chen, Y. Y.; Chiacchio, U.; Dent, W. *Tetrahedron* **1985**, 41, 3529–3535. g) Padwa, A.; Chiacchio, U.; Venkatramanan, M. K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1108–1109. h) Liguori, A.; Romeo, G.; Sindona, G.; Uccella, N. *Chem. Ber.* **1988**, 121, 105–109. i) Liguori, A.; Romeo, G.; Sindona, G.; Uccella, N. *Chem. Ber.* **1989**, 122, 2019–2020.
17. a) Tufariello, J. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 396–403. b) Confalone, P. N.; Huie, E. M. *Org. React.* **1988**, 36, 1–173. c) Padwa, A.; Schoffstall, A. M.; “*Advances in Cycloaddition*”, D. P. Curran, JAI Press Inc., Greenwich, **1990**, 2, 2–28. d) Hassner, A. “*Heterocycles in Bio-Organic Chemistry*”; Bergmon, J.; Royal Soc. of Chem.: Cambridge, **1991**, 130–143. e) Caruthers, V.; “*Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*”, Baldwin, J. E.; FRS & P. D. Magnus, FRS, *Tetrahedron Organic Chemistry Series*
-

-
- 1990, 8, 269–331. f) Ihara, M.; Takahashi, M.; Fukumoto, K.; Kametani, T. *J. Chem Soc., Chem. Commun.* **1988**, 9, 10.
18. a) Huisgen, R.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, 565–633. b) Hiberty, P. C.; Leforestier, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 100, 2012. c) Padwa, A. “*Comprehensive Organic Synthesis*”, Trost, B. M.; Fleming, I. Pergamon Press: Oxford, **1991**, 4, 1067. d) Wade, P. A. “*Comprehensive Organic Synthesis*”; Trost, B. M.; Fleming, I. Pergamon Press: Oxford, **1991**, 4, 1111. e) Harcourt, R. D. *Tetrahedron* **1978**, 34, 3125. f) Harcourt, R. D. *Tetrahedron* **1979**, 35, 901. g) Yamaguchi, K.; Fueno, T. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, 22, 471. h) Yamaguchi, K.; Nishio, A.; Fueno, T. *Chem. Lett.* **1974**, 971. i) Yamaguchi, K.; Fueno, T.; Ohta, K. *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 50, 266. l) Yamaguchi, K.; Nishio, A.; Yabushita, S.; Fueno, T. *Chem. Phys. Lett.* **1978**, 53, 109. m) Yamaguchi, K.; Nishio, A.; Yabushita, S.; Fueno, T. *Chem. Lett.* **1977**, 1479. n) Yamaguchi, K.; Yabushita, S.; Fueno, T. *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 2321–2322. o) Yamaguchi, K.; Yabushita, S.; Fueno, T.; Kato, S.; Morokuma, K. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 27.
19. a) Poppinger, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7468. b) Poppinger, D. *Austr. J. Chem.* **1976**, 29, 465.
20. a) Leroy, G.; Nguyen, M. T.; Sana, M. *Tetrahedron* **1978**, 34, 2459. b) Leroy, G.; Sana, M. *Tetrahedron* **1976**, 32, 1379. c) Leroy, G.; Nguien, M. T.; Sana, M. *Tetrahedron* **1976**, 32, 1529.
21. a) Fukui, K. *Fortsch. Chem. Forsch.* **1970**, 15, 1. b) Fukui, K. *Acc. Chem.*
-

-
- Res.* **1971**, *4*, 57. c) Salem, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 543–553.
22. a) Houk, K. N.; Sims, J.; Watts, C. R.; Luskus, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7301. b) Houk, K. N.; Yamaguchi, K. “*1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*”; Padwa, A.; Wiley Interscience: New York, **1984**, *2*, 407. c) Sustmann, R. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 2717. d) Sustmann, R. *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40*, 569.
23. Gothel, K. V.; Hazell, R. G.; Jørgensen, K. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1–346.
24. Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Romeo, G. in “*Targets Heterocyclic Systems: Chemistry and Properties*”; O. A. Attanasi e D. Spinelli, Società Chimica Italiana, Roma, **1997**, *1*, 225.
25. A. Rescifina, M.A. Chiacchio, A. Corsaro, E. De Clercq, D. Iannazzo, A. Mastino, A. Piperno, G. Romeo, R. Romeo, V. Valveri, Synthesis and biological activity of isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons: potential DNA intercalators, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 709–715.
26. A. Rescifina, M.G. Varrica, C. Carnovale, G. Romeo, U. Chiacchio, Novel isoxazole polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating agents, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 163–173.
27. a) M. Burdisso, R. Gandolfi, P. Grünanger, Control of regiochemistry nitrene cycloadditions. Regioselectivity of the reactions of trisubstituted nitrenes with electron-deficient and conjugated dipolarophiles, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5579–5594; b) P. Merino, J. Revuelta, T. Tejero, U. Chiac-
-

-
- chio, A. Rescifina, A. Piperno, G. Romeo, Enantioselective synthesis of 4-hydroxy-D-pyroglutamic acid derivatives by an asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 167–172;c) U. Chiacchio, A. Corsaro, J. Mates, P. Merino, A. Piperno, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, T. Tejero, Isoxazolidine analogues of pseudouridine: a new class of modified nucleosides, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4733–4738; d) G. Romeo, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, A. Corsaro, A. Rescifina, U. Chiacchio, C-alkoxycarbonyl nitrones: building blocks for the synthesis of butenolides, lactams and modified nucleosides, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**, *2*, 59–77.
28. a) P. Merino, J. Revuelta, T. Tejero, U. Chiacchio, A. Rescifina, G. Romeo, A DFT study on the 1,3-dipolar cycloaddition reactions of C-(methoxycarbonyl)-N-methyl nitron with methyl acrylate and vinyl acetate, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3581–3592; b) P. Merino, T. Tejero, U. Chiacchio, G. Romeo, A. Rescifina, A DFT study on the 1,3-dipolar cycloaddition reactions of C-(hetaryl) nitrones with methyl acrylate and vinyl acetate, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1448–1458.
29. A. Rescifina, U. Chiacchio, A. Corsaro, A. Piperno, R. Romeo, Isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 129–136.
-