
SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Sintesi di nuovi derivati pirimidinici e valutazione della loro attività biologica come antitumorali

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Alice Bressan

RELATORE

Prof.ssa Carla Boga

CORRELATORI

Dott. Gabriele Micheletti

Dott. Dario Telese

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

1. Introduzione	1
1.1. Leucemia acuta mieloide (LAM)	1
1.2. Trattamento della LAM	2
1.2.1. Inibitori FLT3	2
1.2.2. Inibitori IDH1 e IDH2	3
1.2.3. Agenti ipometilanti	4
1.2.4. Veletoclax e Glasdegib	5
1.2.5. Inibitori delle deacetilasi istoniche	7
1.3. Gli inibitori CDC20 e Apcin	8
1.4. Benzotiazoli e 2-amminobenzotiazoli	10
1.4.1. Principali metodi di sintesi del 2-amminobenzotiazolo e derivati	10
1.4.2. Proprietà biologiche dei benzotiazoli e 2-amminobenzotiazoli	12
1.5. Indoli	15
1.5.1. Principali metodi di sintesi dell'indolo e dei suoi derivati	16
1.5.2. Proprietà biologiche dei derivati indolici	18
1.6. Benzofurazani	21
1.5.1. Principali metodi di sintesi del benzofurazano e derivati	22
1.5.2. Proprietà biologiche dei benzofurazani e derivati	24
2. Risultati e discussione	28
2.1. Sintesi di derivati contenenti benzotiazolo	28
2.2. Sintesi di derivati contenenti indolo	33
2.3. Sintesi di derivati contenenti benzofurazano	33
2.4. Saggi biologici	34
2.4.1. Saggi su linee cellulari di leucemia acuta mieloide	34

2.4.2. Saggi su altre linee cellulari di cancro umano	35
3. Conclusioni	37
4. Parte sperimentale	38
4.1. Note generali	38
4.2. Sintesi di 3	39
4.3. Sintesi di 4	40
4.4. Sintesi di 6a	41
4.5. Sintesi di 6b	42
4.6. Sintesi di 6c	43
4.7. Sintesi di 6d	44
4.8. Sintesi di 6e	45
4.9. Sintesi di 10	46
4.10. Sintesi di 12a e 12b	47
4.11. Metodi di esecuzione dei saggi biologici	49
5. Bibliografia	50

1. INTRODUZIONE

1.1 Leucemia acuta mieloide (LAM)

La leucemia acuta mieloide è una patologia tumorale oncoematologica originata da un malfunzionamento nel processo di ematopoiesi dovuto a mutazioni che colpiscono le cellule staminali nel midollo osseo, chiamate HSC (Hematopoietic Stem Cells).¹

L'ematopoiesi è il processo che porta alla produzione e regolazione delle cellule del sangue; le HSC presenti all'interno del midollo osseo seguono processi differenziativi ben precisi che portano a una prima suddivisione in cellule staminali mieloidi e linfoidi e successivamente alla formazione di globuli rossi, linfociti e piastrine.

Nella LAM l'ematopoiesi delle cellule mieloidi è compromessa, portando alla formazione di cellule anomale, chiamate blasti, incapaci di svolgere le funzioni tipiche delle cellule del sangue (Figura 1). Questi blasti vengono prodotti in grandi quantità provocando un rapido incremento della massa cellulare sanguigna. Questo incremento provoca un aumento della viscosità del sangue che causa disturbi della circolazione, coinvolgendo il sistema nervoso (cefalea e disturbi visivi), il sistema cardiocircolatorio e le mucose (lesioni cutanee e ipertrofia gengivale). Inoltre, la replicazione incontrollata delle HSC mutate porta alla morte delle HSC sane; la regolare produzione di cellule del sangue è quindi compromessa, causando anemia, emorragie e suscettibilità alle infezioni per mancanza rispettivamente di globuli rossi, piastrine e globuli bianchi.

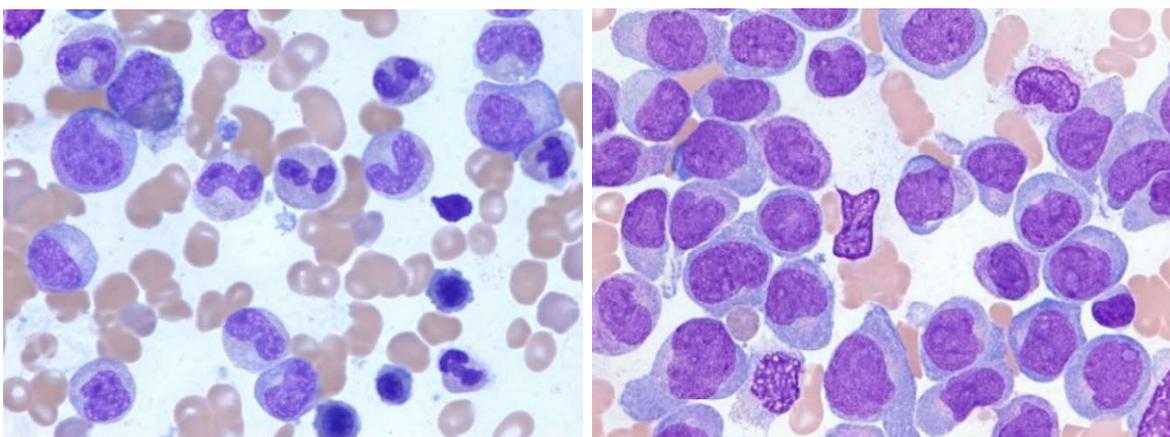


Figura 1. Cellule di midollo osseo sane e di un paziente affetto da LAM²

1.2 Trattamento della LAM

La LAM è la forma più comune di leucemia negli adulti e la sua incidenza aumenta con l'aumentare dell'età media. Il principale trattamento per la maggior parte dei tipi di LAM è la chemioterapia, che però è associata a un elevato numero di effetti collaterali; più del 50% dei pazienti non tollerano questo trattamento a causa della loro età e/o condizioni di comorbidità, presentando quindi una prognosi infausta. Negli ultimi anni sono stati perciò sviluppati e approvati farmaci differenti da quelli standard da usare quando la chemioterapia non è possibile o per potenziarne l'efficacia.³ Studi epidemiologici e genetici hanno dimostrato che all'origine della LAM risiedono diverse mutazioni genetiche (mutazioni puntiformi, riarrangiamento di geni e translocazioni cromosomiche) che provocano una maggiore sopravvivenza e proliferazione delle cellule leucemiche; non esiste quindi una cura standard quando non è possibile il trattamento chemioterapico; è perciò una sfida per la comunità scientifica la ricerca di differenti opzioni e la selezione della migliore terapia.

1.2.1 Inibitori FLT3

La proteina FLT3 (fms-like tyrosine kinase-3) fa parte del gruppo delle chinasi ed è un recettore di membrana presente nei progenitori delle cellule linfoide e mieloidi che regola la proliferazione, l'apoptosi (morte cellulare programmata) e la differenziazione delle cellule ematopoietiche.⁴ La mutazione del gene FLT3 che codifica per la proteina è presente in circa un terzo dei pazienti affetti da LAM rappresentando quindi una delle più frequenti alterazioni genetiche che hanno un ruolo nella patologia.⁵ Normalmente FLT3 è nella sua forma inattiva; in presenza del suo legante (FL, un fattore di crescita) forma un dimero che attiva il recettore e promuove la fosforilazione.

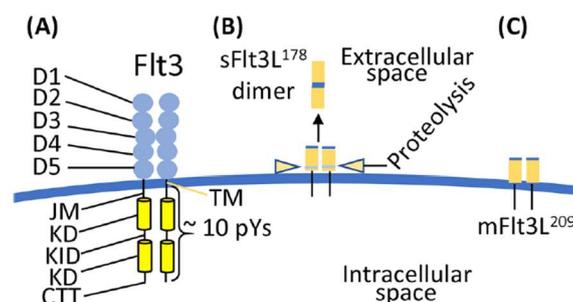


Figura 2. Struttura di FLT3⁴

Una volta attivata, la proteina si degrada rapidamente. Le mutazioni del gene FLT3 portano alla formazione di una proteina FLT3 attiva indipendentemente dalla presenza del legante causando una proliferazione incontrollata dei blasti.⁶ Farmaci come Midostaurin e Gilteritinib (Figura 3) inibiscono la funzionalità della proteina FLT3 mutata.

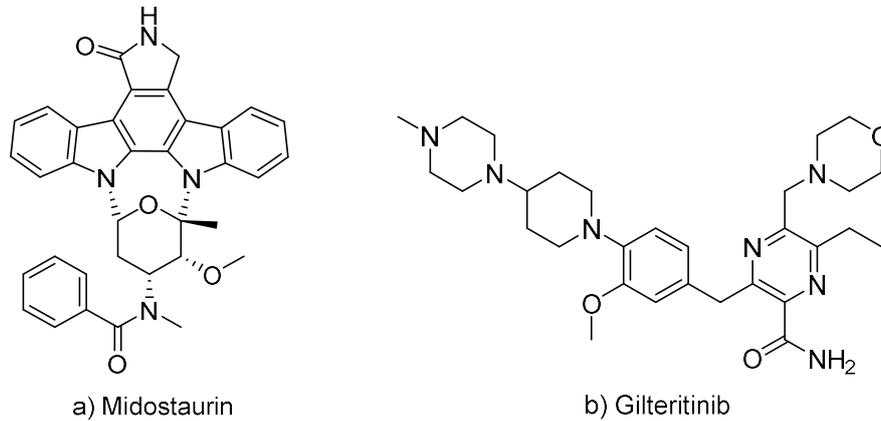


Figura 3. Formule di struttura di a) Midostaurin e b) Gilteritinib

1.2.2 Inibitori IDH1 e IDH2

In alcuni pazienti con LAM (circa 20%) le cellule hanno una mutazione nel gene IDH1 o IDH2, geni che codificano per enzimi isocitrato deidrogenasi (IDH1 e 2) coinvolti in diversi processi metabolici ed epigenetici della cellula.⁷ Isocitrato deidrogenasi è un enzima che si attiva in presenza di NADP e catalizza la decarbossilazione ossidativa (ossidazione con produzione di CO₂) dell'isocitrato a α-chetoglutarato (α-KG) nel ciclo di Krebs; IDH1 è l'enzima presente nel citoplasma mentre IDH2 è il suo omologo mitocondriale.⁸ IDH mutato catalizza la conversione di α-KG a 2-idrossiglutarato (2HG), che è un analogo strutturale di α-KG: l'unica differenza è nella sostituzione dell'α-chetogruppo con un gruppo idrossile.

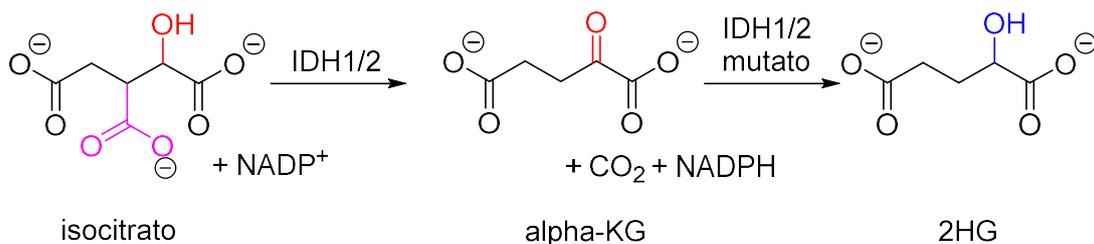


Figura 4. Reazioni catalizzate da IDH e IDH mutato

L'aumento di 2HG generato da IDH1 e IDH2 mutati ha un impatto sulla funzione degli enzimi che richiedono α -KG come substrato come TET2, responsabile della demetilazione del DNA, interferendo quindi con il processo di metilazione del DNA.⁹ I pazienti con mutazione IDH rispondono male alla chemioterapia e sono soggetti a ricadute; inibitori IDH come Ivosidenib (per IDH1) ed Enasidenib (per IDH2) (Figura 5) hanno mostrato una buona risposta clinica in questi pazienti.¹⁰

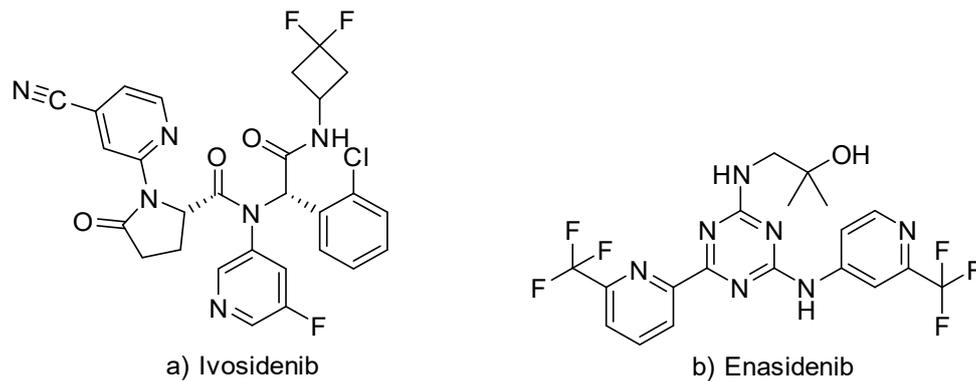


Figura 5. Formule di struttura di a) Ivosidenib e b) Enasidenib

1.2.3 Agenti ipometilanti

La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico che avviene per addizione di un gruppo metile (CH_3) al DNA, modificando la funzione dei geni e influenzando l'espressione genica. L'addizione del gruppo metile è controllata da una serie di enzimi chiamati DNA metiltransferasi (DNMT). Tre tipi di DNMT (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) sono responsabili della stabilizzazione e del mantenimento del processo di metilazione¹¹ (Figura 6).

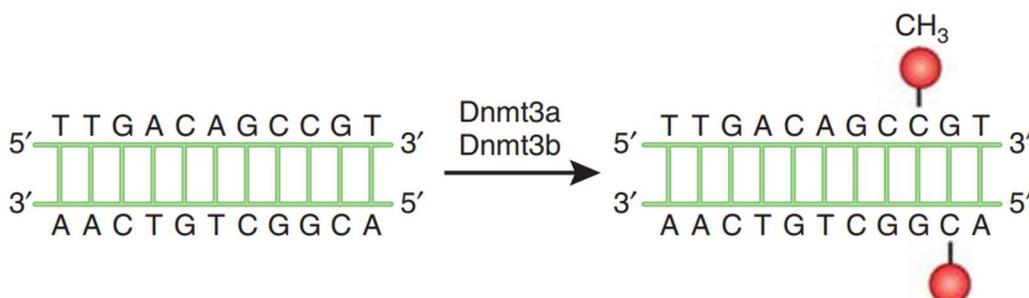


Figura 6. Metilazione del DNA¹¹

Una eccessiva metilazione del DNA porta al silenziamento dei geni soppressori tumorali e ha perciò un ruolo essenziale nel processo di trasformazione di una cellula sana in cellula tumorale. Gli inibitori di DNA metiltransferasi come 5-Azacytidine e Decitabine (Figura 7) sono noti come agenti ipometilanti (HMA) e sono stati usati da più di dieci anni per il trattamento di pazienti affetti da LAM considerati non idonei ad altre chemioterapie.¹² Gli HMA sono analoghi chimici dei nucleosidi che una volta incorporati direttamente nel DNA inibiscono irreversibilmente la DMT, causando la sintesi della proteina alterata che porta all'apoptosi della cellula leucemica; in questo modo sono riattivati i geni soppressori tumorali.³

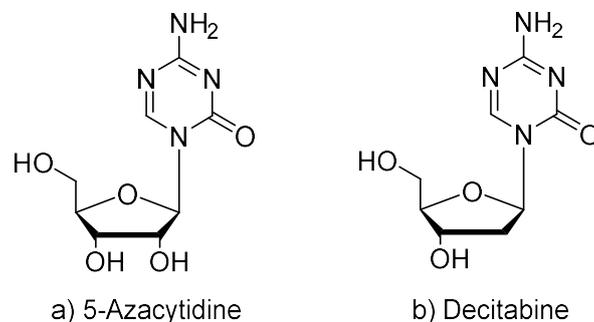


Figura 7. Formule di struttura di a) 5-Azacytidine e b) Decitabine

1.2.4 Venetoclax e Glasdegib

Venetoclax e Glasdegib sono farmaci che hanno attività limitata se usati come unico agente, ma mostrano una buona risposta nei pazienti se associati a basse dosi di agente chemioterapico (citarabina) o ad agenti ipometilanti.¹³

Venetoclax (Figura 8) è un farmaco inibitore della proteina BCL-2 (B-cell lymphoma-2), una proteina che impedisce l'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata. L'apoptosi è fondamentale per lo sviluppo degli organismi pluricellulari e per garantire l'omeostasi dei tessuti. BCL-2 è una delle proteine che regolano questo processo di apoptosi attraverso complesse interazioni proteina-proteina e proteina-membrana. Le proteine antiapoptotiche come BCL-2 sono spesso espresse in grandi quantità nelle cellule cancerose, consentendo a queste ultime una elevata sopravvivenza attraverso il sequestro di grandi quantità della loro controparte pro-apoptosi.¹⁴ È stato dimostrato

che l'utilizzo di Venetoclax in combinazione con Azacitidine genera una migliore risposta nei pazienti rispetto a quelli trattati solo con Azacitidine.¹⁵

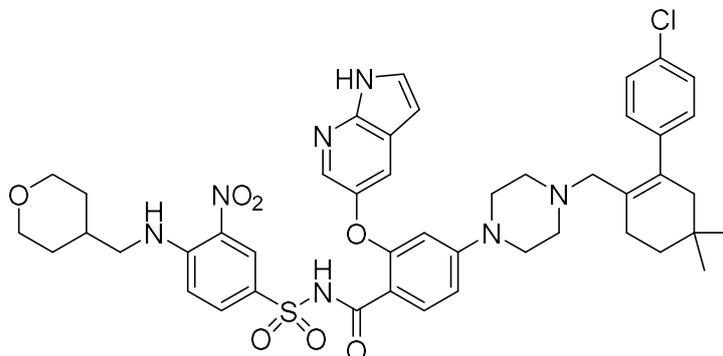


Figura 8. Formula di struttura del Venetoclax

Glasdegib (Figura 9) è un inibitore della via di segnalazione Hedgehog, l'attivazione della quale è associata a un elevato numero di neoplasie.¹⁶ La via di segnalazione Hedgehog regola la differenziazione della cellula staminale nello sviluppo embrionale ed è solitamente silenziata nei tessuti adulti. Un'attivazione anomala della via Hedgehog è stata osservata nelle linee cellulari della LAM resistenti alla chemioterapia. Studi mostrano che la proteina transmembrana SMO, essenziale nell'attivazione della via Hedgehog, è coinvolta nel mantenimento delle cellule leucemiche. L'inibizione della proteina SMO da parte del Gladsegib porta a una selettiva e potente inibizione della segnalazione Hedgehog e quindi a una significativa efficacia antitumorale.¹⁷ Glasdegib agisce in sinergia sia con la chemioterapia convenzionale sia con agenti ipometilanti.

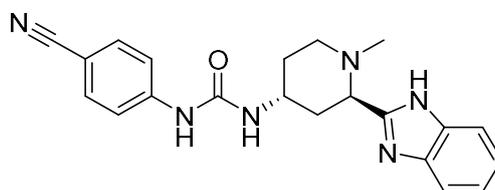


Figura 9. Formula di struttura del Glasdegib

1.2.5 Inibitori delle deacetilasi istoniche

Gli istoni sono delle proteine strettamente associate al DNA la cui funzione principale è quella di tenere compatto il DNA e permettere così alla cellula di conservare una grande quantità di materiale genetico in uno spazio ristretto come il nucleo. L'acetilazione degli istoni (Figura 10) ad opera degli enzimi istone acetiltransferasi (HATs) è determinante per l'espressione genica, in quanto rende il DNA più accessibile alle polimerasi e rendendo quindi più frequenti i processi di trascrizione. Al contrario, la rimozione del gruppo acetile dagli istoni della quale si occupa la classe di enzimi istone deacetilasi (HDACs), causa un compattamento della struttura del DNA reprimendo la trascrizione genica.¹⁸

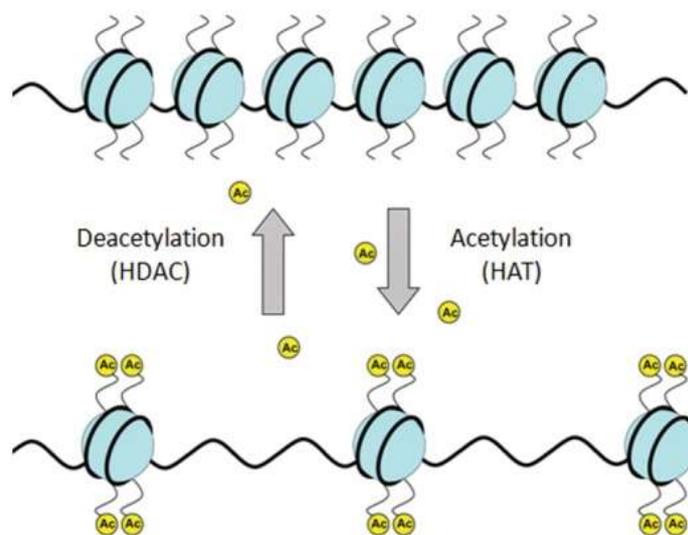


Figura 10. Acetilazione e deacetilazione degli istoni¹⁹

L'azione opposta di HATs e HDACs regola l'espressione genica attraverso la modellazione della cromatina. Una sovraespressione delle HDACs è stata correlata all'insorgenza di neoplasie, tra le quali la LAM, rendendo questi enzimi target promettenti per interventi terapeutici in grado di rimediare alle alterazioni epigenetiche associate alla neoplasia. Sono stati perciò sviluppati una serie di inibitori delle HDACs, come il Vorinostat (Figura 11), in grado di interagire con il sito catalitico degli enzimi e indurre un arresto del ciclo cellulare e apoptosi della cellula tumorale.²⁰

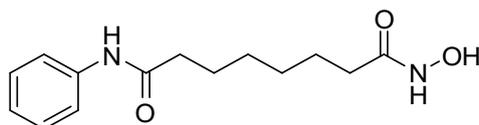


Figura 11. Formula di struttura del Vorinostat (SAHA)

1.3 Gli inibitori CDC20 e Apcin

Secondo un innovativo progetto dal titolo: "*Studio del ruolo e dell'interattoma di CDC20 attraverso le fasi del ciclo cellulare in modelli di Leucemia Acuta Mieloide*" proposto dalla ricercatrice IRST IRCCS dr.ssa Giorgia Simonetti, una proteina chiamata CDC20 potrebbe essere un valido *target* sul quale indirizzare la ricerca di farmaci in grado di migliorare le condizioni dei soggetti affetti da LAM.

Il complesso promotore dell'anafase APC/C (Figura 12) fa parte della famiglia di enzimi E3 ubiquitina ligasi ed è considerato uno degli enzimi più importanti per la regolazione del ciclo cellulare; si tratta del complesso proteico che innesca il passaggio da metafase ad anafase durante la mitosi della cellula. L'azione di APC/C è principalmente regolata da due co-attivatori, CDC20 (cell division cycle 20 homologue o Fizzy) e Cdh1 (CDC20 homologue 1 o FZR1) che formano con APC/C due distinti complessi. È stato osservato che durante la mitosi CDC20 è il co-attivatore predominante mentre l'azione di Cdh1 è repressa;²¹ ciò porta Cdh1 ad avere una funzione di soppressione della carcinogenesi mentre CDC20 avrebbe una funzione pro-oncogena.²² Inibire la formazione del complesso APC/C-CDC20 può quindi avere degli utili risvolti nella cura di diverse forme tumorali, tra cui la LAM.

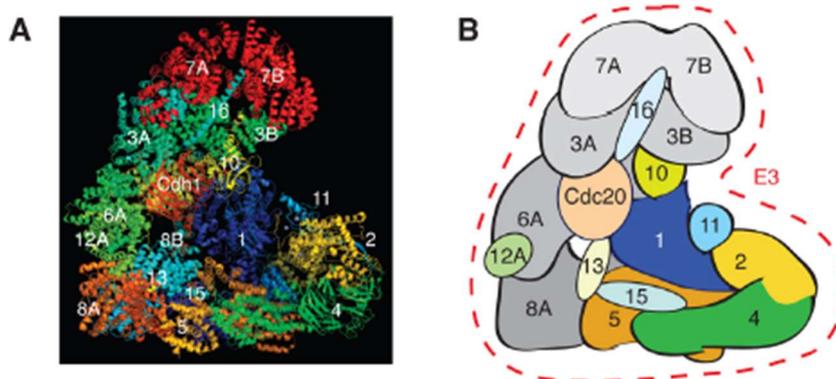


Figura 12. Struttura del complesso APC/C²¹

Recenti studi hanno identificato una molecola chiamata Apcin (Figura 13) in grado di bloccare le interazioni tra il complesso promotore dell'anafase APC/C e il suo co-attivatore CDC20. L'Apcin si è dimostrato efficace nel ridurre la proliferazione delle cellule tumorali nell'osteosarcoma, la neoplasia che aggredisce le cellule del tessuto osseo più comune.²³

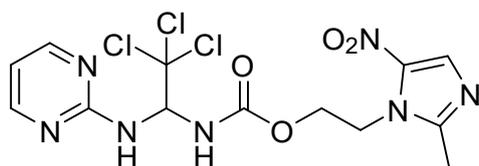
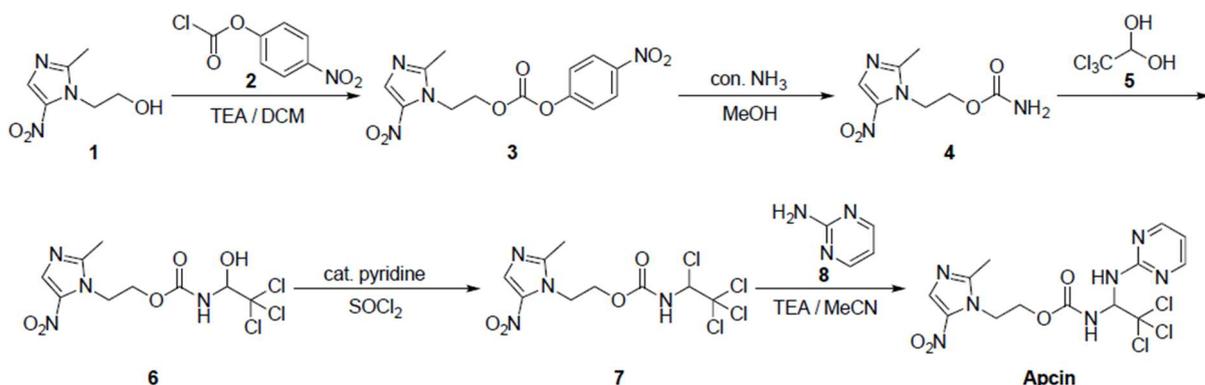


Figura 13. Formula di struttura dell'Apcin

Apcin è stato sintetizzato da Sundia Meditech con la procedura descritta nello Schema 1:²⁴



Schema 1. Sintesi dell'Apcin²⁴

Il primo step prevede un'esterificazione del derivato imidazolico **1** con il 4-nitrofenil cloroformiato **2** in ambiente basico (triethylammina). Segue una rimozione del 4-nitrofenolato con ammoniaca. Il composto **4** risultante è fatto reagire con cloralio idrato (**5**) ottenendo così il composto **6**. Infine, dopo una clorurazione con tionil cloruro, l'ultimo step prevede la sostituzione del cloro con 2-amminopirimidina (**8**), che porta alla formazione dell'Apcin.

Questa sintesi consente di ottenere il prodotto Apcin puro ma purtroppo con una resa piuttosto bassa, 8.3%. Sfruttando l'Apcin come punto di partenza e tenendo in considerazione che la funzione inibitoria dell'Apcin è data dalla presenza nella

molecola del gruppo 1,1,1-tricloroetilico, sono stati sintetizzati in questo lavoro di tesi alcuni derivati conservando i gruppi tricloroetilico e 2-amminopirimidinico, mentre la porzione eterociclica viene sostituita con derivati 2-amminobenzotiazolici e indolici che sono eterocicli molto spesso presenti in composti con proprietà antitumorali.

1.4 Benzotiazoli e 2-amminobenzotiazoli

Il benzotiazolo (Figura 14a) è un sistema eteroaromatico costituito dalla fusione del benzene con l'anello tiazolico in posizione 4,5. Il benzotiazolo e i suoi derivati sono presenti in numerose piante sia terrestri che marine e sono caratterizzati da una notevole importanza a livello biologico per le molteplici attività farmacologiche. Il benzotiazolo gioca quindi un ruolo significativo nel controllo e nella cura di diverse patologie, tra le quali il cancro.²⁵ Il derivato 2-amminobenzotiazolo (Figura 14b) è già stato utilizzato con successo nella sintesi di farmaci inibitori delle deacetilasi istoniche dal gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto questo lavoro di tesi.²⁶

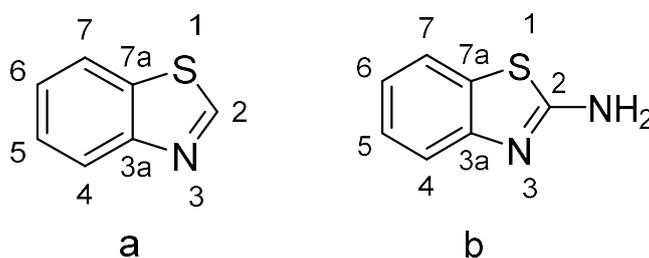
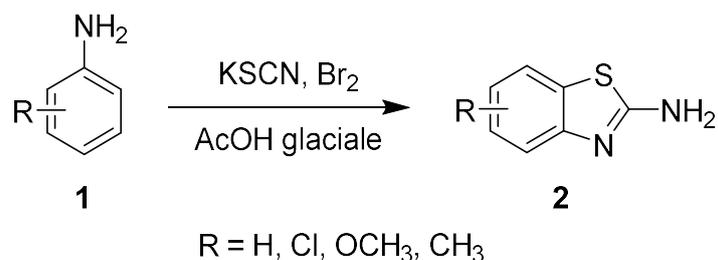


Figura 14. Struttura del benzotiazolo e del 2-amminobenzotiazolo

1.4.1 Principali metodi di sintesi del 2-amminobenzotiazolo e derivati

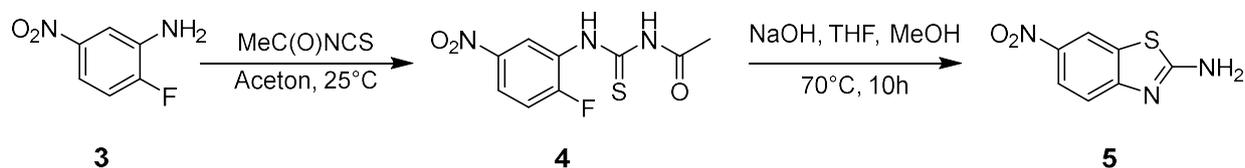
Di seguito sono riportate le principali procedure sintetiche per ottenere 2-amminobenzotiazolo e i suoi derivati sostituiti nelle diverse posizioni dell'anello benzenico.

La prima reazione è una delle procedure più utilizzate per la sintesi di 2-amminobenzotiazoli sostituiti e prevede la reazione tra anilina sostituita **1** con potassio tiocianato (KSCN) e bromo (Br_2) in ambiente acido (AcOH).²⁷ Il potassio tiocianato reagisce con l'anilina formando l'intermedio fenil tiocianato che reagisce con il bromo in presenza di acido acetico per dare 2-aminobenzotiazoli sostituiti.



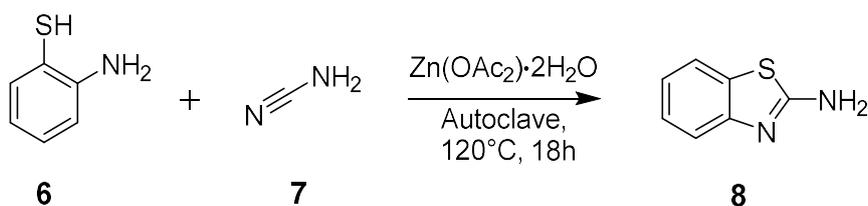
Schema 2. Reazione di formazione di 2-amminobenzotiazoli

Un'altra sintesi proposta da Yoshida²⁸ prevede un primo step nel quale orto-fluoro-meta-nitroanilina **3** reagisce con acetil isotiocianato (MeC(O)NCS) formando la tiourea sostituita **4**. Il secondo step prevede la ciclizzazione della tiourea in presenza di NaOH ottenendo 2-amminobenzotiazolo sostituito in posizione 6 con un gruppo nitro (NO₂).



Schema 3. Sintesi secondo Yoshida²⁸

Una terza procedura propone la sintesi di 2-amminobenzotiazolo utilizzando prodotti commerciali facilmente reperibili. La sintesi prevede la reazione tra 2-amminotiofenolo **6** e cianammide **7** in presenza di zinco acetato diidrato (Zn(OAc)₂·2H₂O) in assenza di solventi e in autoclave.²⁹



Schema 4. Reazione di sintesi del 2-amminobenzotiazolo secondo Nale²⁹

1.4.2 Proprietà biologiche dei benzotiazoli e dei 2-amminobenzotiazoli

I benzotiazoli e i loro derivati manifestano un'attività biologica considerevole e differenti applicazioni farmaceutiche. Da diversi anni tali composti sono oggetto di studio finalizzato alla scoperta di nuovi composti farmacologicamente attivi per incrementare la gamma di bersagli biologici su cui essi possano agire.

Molti derivati contenenti un nucleo benzotiazolico, o una struttura correlata ad esso, come 2-amminobenzotiazolo, sono impiegati nei più svariati ambiti della ricerca farmaceutica per la produzione di farmaci ad azione antitumorale (Figura 15), antidiabetica (Figura 16), antisettica (Figura 17) e antivirale (Figura 18).³⁰

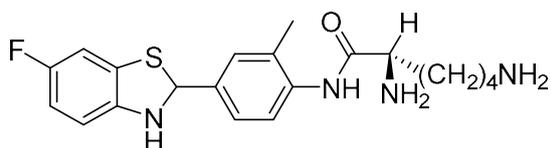


Figura 15. Formula di struttura del Phortress, un antitumorale in fase clinica I

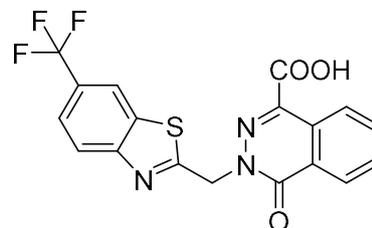


Figura 16. Formula di struttura del Zopolrestat, un antidiabetico

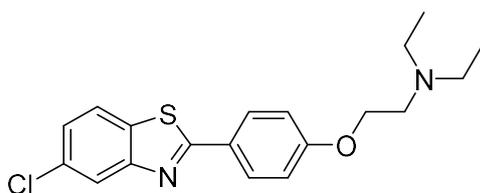


Figura 17. Formula di struttura dell'Aletazolo

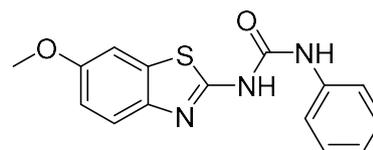


Figura 18. Formula di struttura del Frentizolo

Degno di nota è il derivato tioflavina T (Figura 19), un sale benzotiazolico *N*-metilato.

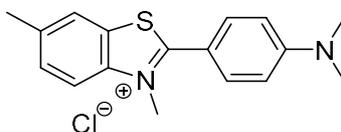


Figura 19. Formula di struttura della tioflavina T

Questo composto viene utilizzato per diagnosticare e studiare la presenza e la formazione delle placche di amiloide sia *in vitro* che *in vivo*. Le placche di amiloide sono degli aggregati proteici insolubili e mal ripiegati che si depositano negli spazi intracellulari a livello del sistema nervoso centrale. La loro presenza è strettamente

correlata all'insorgenza di patologie come la malattia di Parkinson ed il morbo di Alzheimer, anche se, nonostante le varie ipotesi, il meccanismo attraverso cui questi aggregati proteici porterebbero alla manifestazione della patologia non è ancora del tutto chiaro.

Questi aggregati proteici sono composti da fibre che presentano due o più foglietti β -ripiegati. La tioflavina T legandosi a queste fibre diventa fluorescente rendendo le placche di amiloide facilmente riconoscibili.³¹

I composti a base di benzotiazolo e dei suoi derivati hanno attirato l'attenzione per le loro proprietà antitumorali in diverse linee cellulari cancerose umane, come quelle del colon, del polmone (NSCL: non-small cell lung) e della mammella, mostrando una notevole attività antitumorale. I benzotiazoli e derivati sono infatti inibitori competitivi dei siti del gruppo di enzimi tirosina chinasi. Tirosina chinasi (RTK) sono recettori ad alta affinità superficiale cellulare per molti fattori di crescita polipeptidici, citochine e ormoni. Questi enzimi occupano una posizione centrale nel controllo della proliferazione cellulare, dimostrando di essere regolatori chiave del normale processo cellulare e di giocare un ruolo critico nello sviluppo di diverse tipologie di cancro. I benzotiazoli agiscono competendo con ATP nel legame al sito catalitico di tirosina chinasi. Il sito attivo contiene due legami idrogeno chiave formati dall'interazione tra gli amminogruppi N-1 e N-6 dell'anello dell'adenina presente nel sito. Il benzotiazolo agisce proprio su uno di questi legami idrogeno, che non è usato da ATP ma gioca un ruolo importante nella selettività inibitoria.³²

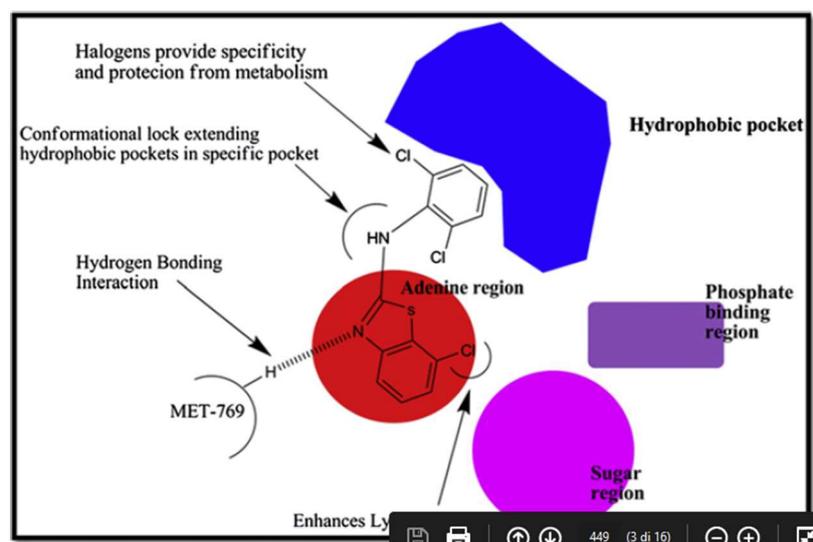


Figura 20. Modello ipotetico del legame tra un derivato benzotiazolico e il sito attivo di tirosina chinasi³²

Un'altra applicazione di questi eterocicli è nella sintesi di ibridi ad azione antitumorale appartenenti alla categoria degli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC).

La sintesi di questi nuovi composti è stata progettata prendendo spunto dalla struttura di due noti inibitori dell'HDAC, il Vorinostat (SAHA) e l'acido 9-idrossistearico (9-HSA).



Figura 21. Formule di struttura del SAHA (a) e del 9-HSA (b)

Facendo reagire una serie di derivati 2-amminobenzotiazolici e il cloruro acilico dell'acido azelaico mono-metil-estere tramite reazione di Schotten-Baumann sono stati ottenuti i composti illustrati in figura 22.

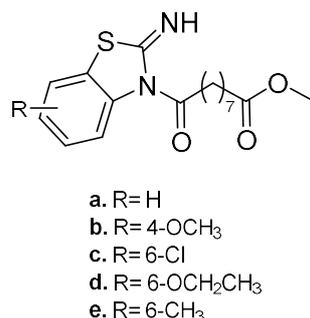


Figura 22. Formula di struttura di derivati ibridi a base 2-amminobenzotiazolica

Per idrolisi del composto **a** con idrossido di litio si è ottenuto il derivato in figura 23; entrambi si sono rivelati essere i composti più attivi, tra quelli analizzati, nell'inibire la crescita delle cellule tumorali HT-29, relative al cancro umano al colon. Dai saggi biologici effettuati si è evinto come i composti suddetti fossero in grado di determinare un notevole blocco delle cellule HT-29 in fase S-G2/M.²⁶

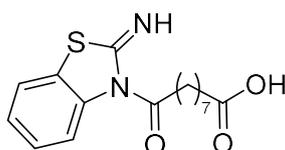


Figura 23. Formula di struttura del composto ottenuto tramite idrolisi della funzione esterea

1.5 Indoli

L'indolo è un composto organico eterociclico aromatico con struttura biciclica, composto da un anello benzenico fuso con un anello pirrolico. L'indolo è una molecola di notevole importanza biologica, in quanto è responsabile della regolazione di vari aspetti della fisiologia batterica come la formazione di spore, la stabilità dei plasmidi, la farmacoresistenza, la formazione di biofilm e la virulenza.³³ Inoltre l'amminoacido triptofano, precursore del neurotrasmettitore serotonina, è un derivato dell'indolo.³⁵

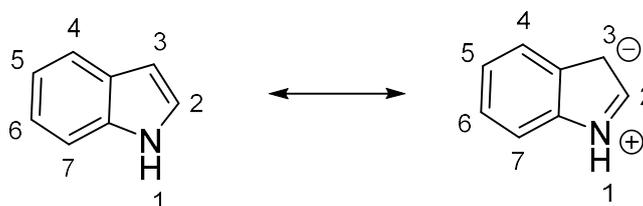


Figura 24. Forme di risonanza del nucleo indolico

L'indolo subisce reazioni di sostituzione elettrofila principalmente in posizione 3, che è particolarmente reattiva come si nota dalla formula di risonanza, mentre la posizione 2 e l'anello benzenico sono scarsamente elettrofili.

In generale gli indoli sono delle basi deboli, (l'atomo di idrogeno in posizione 1 ha una pK_a di circa 16 in acqua) e l'acidità del protone aumenta quando in posizione 3 è presente un gruppo elettron-attrattore.

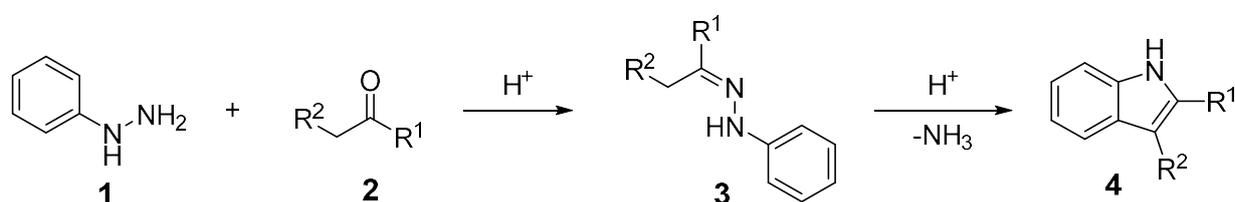
La *N*-deprotonazione dell'indolo è facilmente ottenibile utilizzando una base forte, l'anione risultante reagisce velocemente con gli elettrofili per fornire derivati *N*-alchilati.

Lo *scaffold* indolico, grazie alla sua versatilità, è un composto molto utilizzato per il design e lo sviluppo di agenti antitumorali. Nell'ultima decade, numerosi studi hanno riportato che vari composti a base di indolo hanno mostrato una potenziale attività antitumorale, rendendo l'indolo un importante punto di partenza per la sintesi di farmaci.³⁵

1.5.1 Principali metodi di sintesi dell'indolo e dei suoi derivati

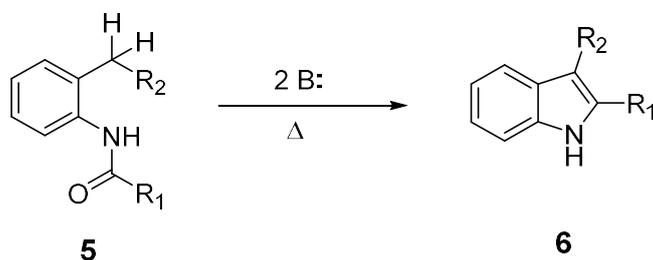
Gli indoli sono generalmente sintetizzati utilizzando reazioni di ciclizzazione tra areni sostituiti, arilammine e arilidrazine. In alternativa può essere utilizzato come punto di partenza il pirrolo costruendo l'anello benzenico.

Il primo metodo per la sintesi dell'indolo è la sintesi di Fischer³⁶ (Schema 5) e prevede la reazione tra l'arilidrazina **1** con un chetone o un'aldeide **2**. Attraverso la formazione dell'immina intermedia **3** in seguito all'attacco del carbonile al gruppo amminico primario dell'arilidrazina, si ottengono indoli sostituiti **4**.



Schema 5. Sintesi di Fischer

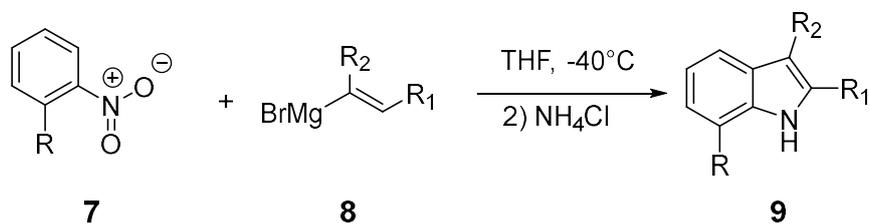
I derivati indolici possono essere sintetizzati anche con la sintesi di Madelung³⁷ (Schema 6), che prevede una reazione di ciclizzazione intramolecolare di *N*-fenilammidi **5** in ambiente fortemente basico (ad esempio NaNH₂) e ad alte temperature. La reazione inizia con l'estrazione dell'idrogeno benilico dal sostituente in orto all'ammide, consentendo l'attacco del carbonio carbonilico elettrofilo e la conseguente ciclizzazione. Questa procedura consente di ottenere indoli con rese elevate ed è perciò frequentemente utilizzata in industria.



Schema 6. Sintesi di Madelung

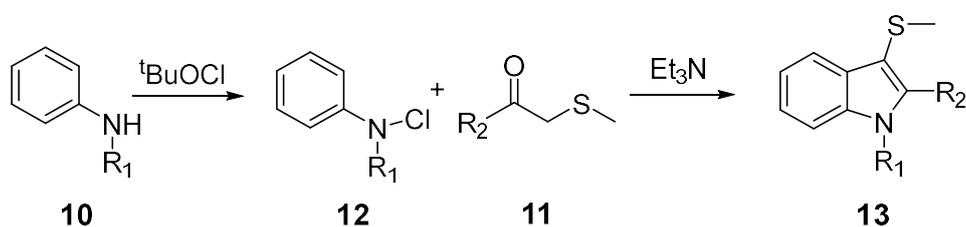
La reazione di Bartoli³⁸ prevede l'utilizzo di nitro areni *orto*-sostituiti **7** e reattivi di Grignard vinilici **8** per formare indoli sostituiti **9** sia sull'anello benzenico che in posizione 3 (Schema 7). L'attacco del reattivo di Grignard al nitroarene causa un

riarrangiamento [3,3]-sigmatropico, a cui segue una ciclizzazione e una successiva eliminazione di acqua portando alla formazione del derivato indolico desiderato.



Schema 7. Sintesi di Bartoli

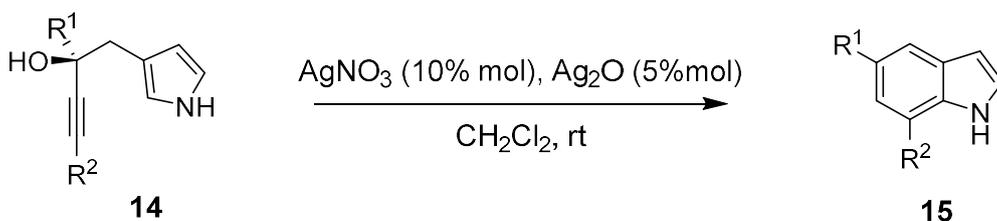
Un quarto metodo, chiamato sintesi di Gassman³⁹ (Schema 8), consente di ottenere indoli e indoli alchilati a partire dall'anilina **10** e da un chetone **11** contenente un tioetere legato in β . La reazione prevede la formazione della cloroammia **12** per reazione con tert-butil ipoclorito (tBuOCl); segue l'addizione dello zolfo del chetone che porta alla formazione di uno ione solfonio e alla ciclizzazione per condensazione. Il gruppo tioetereo può essere rimosso con il catalizzatore Ni-Raney.



Schema 8. Sintesi di Gassman

Un ultimo approccio “*back to front*” per la sintesi degli indoli sostituiti **15** prevede l'utilizzo come starter di un derivato pirrolico **14** chiamato inolo.⁴⁰

La ciclizzazione avviene in presenza di argento utilizzato come catalizzatore. Questo metodo di sintesi consente di ottenere indoli sostituiti con buone rese.



Schema 9. Sintesi indolica a partire da derivati pirrolici

1.5.2 Proprietà biologiche dei derivati indolici^{41, 42}

Dalla scoperta dell'indolo nel 1860 fino ad oggi, le caratteristiche chimiche e biologiche di questo eterociclo sono state studiate a lungo e lo sono tutt'ora. L'indolo, oltre ad essere presente in moltissime molecole naturali (sia di origine vegetale che animale) è considerato uno dei componenti eterociclici più importanti per lo sviluppo di farmaci; lo *scaffold* indolico è infatti un gruppo fondamentale per la sua proprietà di interagire con i sistemi proteici. La scoperta e l'estrazione di alcaloidi a base indolica attrae l'interesse della comunità scientifica e ha portato alla sintesi di farmaci utilizzati nella cura di patologie più o meno comuni.

Molte molecole presenti nell'organismo umano, come neurotrasmettitori, amminoacidi e proteine, sono caratterizzati da uno *scaffold* indolico.

Il triptofano (Figura 25a) è un amminoacido essenziale usato nella biosintesi delle proteine e caratterizzato appunto dalla presenza di un gruppo indolico come catena laterale. Il triptofano è il precursore di serotonina, melatonina e vitamina B3.

La serotonina (Figura 25b) è una monoammina neurotrasmettitrice sintetizzata principalmente dai neuroni del sistema nervoso centrale. La funzione biologica della serotonina è complessa: è responsabile della regolazione dell'umore, dell'appetito, del sonno e di alcune funzioni cognitive (memoria e apprendimento), inoltre svolge un ruolo fondamentale nel controllo di numerosi processi fisiologici. La sintesi avviene con l'idrossilazione del triptofano sulla posizione 5 dell'anello seguita da decarbossilazione per produrre la serotonina. Diverse classi di antidepressivi, come SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) e SNRI (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors), interferiscono con il normale assorbimento di serotonina limitandone l'assorbimento.

La melatonina (Figura 25c) invece è un ormone rilasciato principalmente dalla ghiandola pineale con la funzione di regolare il ciclo sonno-veglia tramite la sua azione sull'ipotalamo. È usato come integratore alimentare per il trattamento dell'insonnia o della sindrome da jet lag. La melatonina è sintetizzata a partire dalla serotonina, con una reazione di *N*-acetilazione seguita da una metilazione ad opera degli enzimi *N*-acetiltransferasi e idrossindol-*O*-metiltransferasi.⁴³

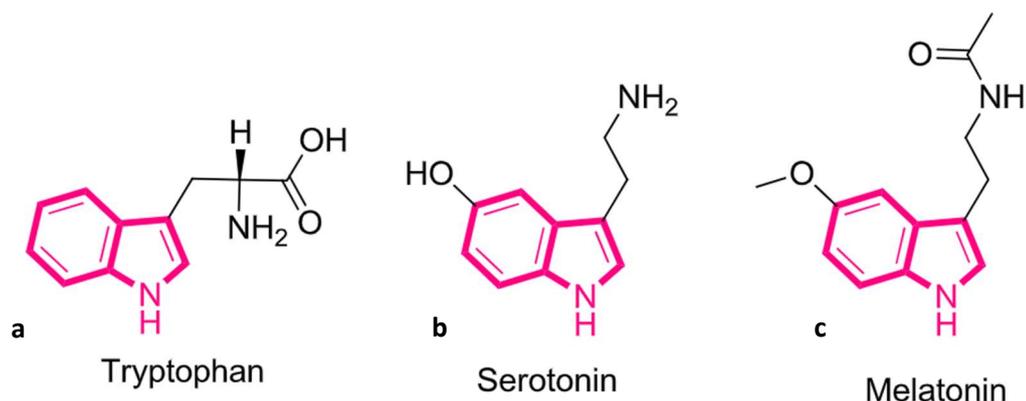


Figura 25. Molecole biologicamente attive contenenti il nucleo indolico.⁴¹

Molti alcaloidi naturali, come l'ergotamina, la Vinblastina e l'Armalina (Figura 26), ritrovati in specie vegetali differenti, si sono dimostrati attivi sull'organismo umano. Modifiche strutturali hanno permesso di amplificare le loro proprietà farmacologiche al fine di curare patologie comunemente diffuse come diverse forme tumorali, patologie infiammatorie, ipertensione, etc.

Ad oggi sono conosciuti molti farmaci a base indolica con proprietà farmacologiche anche molto diverse, spesso progettati a partire da composti vegetali estratti da piante o funghi.

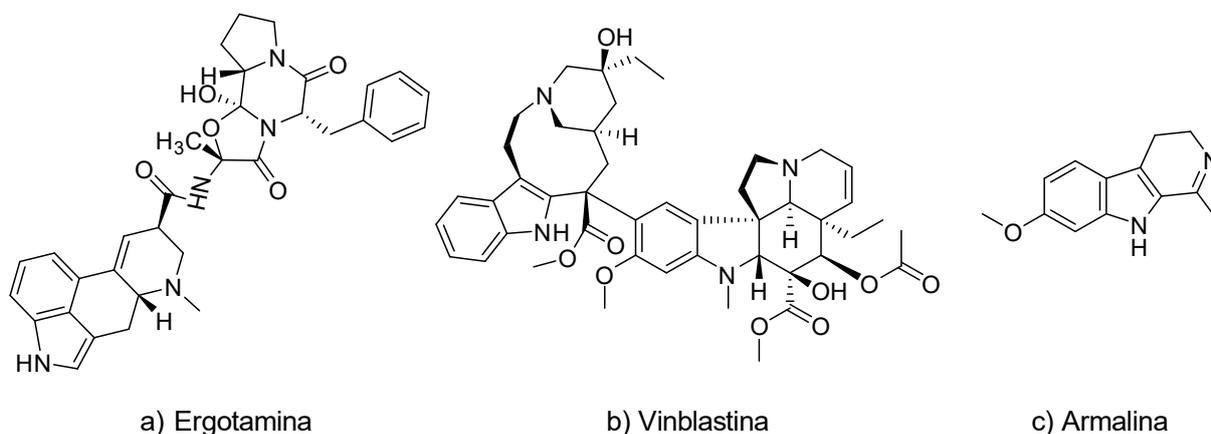


Figura 26. Formule di struttura di tre alcaloidi naturali

Gli estratti naturali Vincristina, Vinblastina e Vindesina (Figura 27), isolati dalla pianta *Catharanthus roseus*, sono stati approvati per il trattamento di vari stati tumorali come leucemia, linfoma, melanoma, tumore alla mammella e NSCLC (non-small cell lung cancer). Questi alcaloidi naturali mostrano il loro effetto antitumorale attraverso l'inibizione della polimerizzazione dei tubuli nelle cellule cancerose.

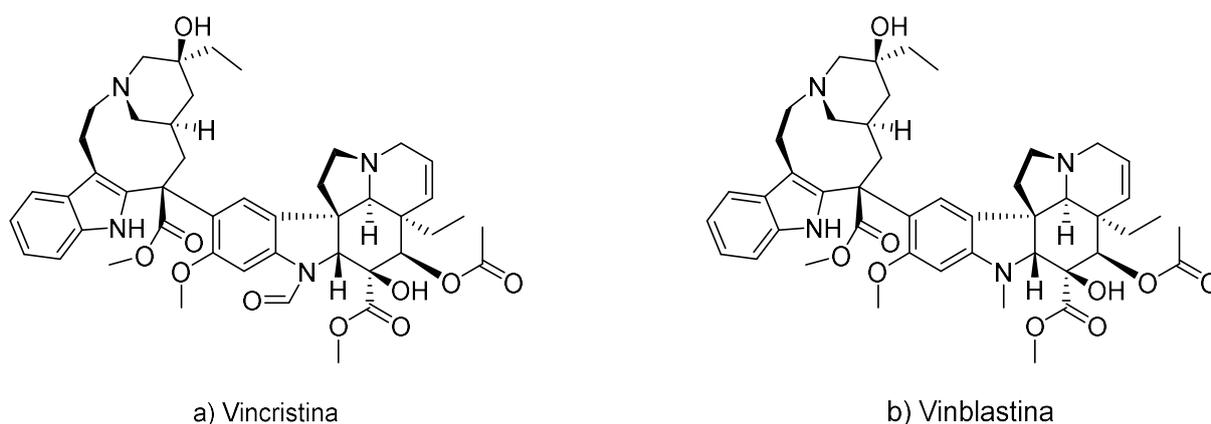


Figura 27. Formule di struttura di Vincristina e Vinblastina, due alcaloidi di origine naturale con proprietà antitumorali

Inoltre, numerose molecole sintetiche contenenti derivati indolici sono state approvate per la loro attività antitumorale. Diversi studi pubblicati si focalizzano su queste molecole implicate nel trattamento di carcinoma renale, tumore gastrointestinale e NSCLC. Un esempio sono i farmaci Sunitinib e Osimertinib, inibitori multi-target del recettore tirosina chinasi (RTK), del recettore del fattore di crescita delle piastrine (PDGFR) e del recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR).

Un altro derivato di sintesi a base indolica è il Panobinostat (Figura 28), la cui attività biologica è data dalla capacità di inibire l'enzima istone deacetilasi (HDAC-6), con cui è stato co-cristallizzato per fornire una migliore comprensione della sua interazione con la tasca recettoriale.

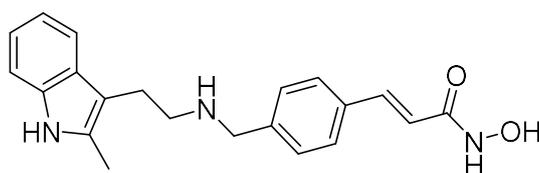


Figura 28. Formula di struttura del derivato indolico Panobinostat

Nella figura 30 è possibile vedere tre differenti interazioni che stabilizzano il legame farmaco-recettore, il gruppo OH forma un legame ad idrogeno con un residuo di acido aspartico e istidina, il gruppo NH forma un legame con un residuo di serina e l'anello benzenico partecipa con un'interazione idrofobica $\pi-\pi$.

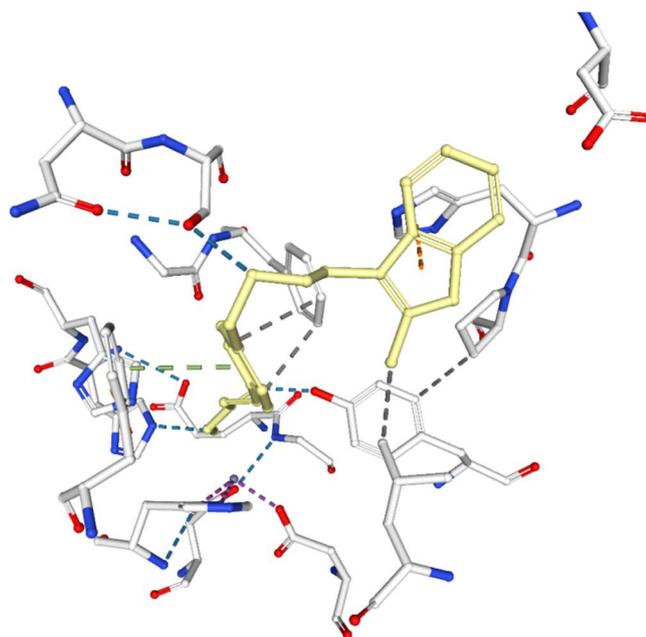


Figura 29. Interazione tra il Panobinostat (giallo) e l'HDAC-6.⁴⁴

1.6 Benzofurazani

Il benzofurazano, o 2,1,3-benzossadiazolo (Figura 30), è un sistema ciclico eteroaromatico composto da un anello benzenico fuso con un anello ossadiazolico. Benzofurazani e derivati hanno proprietà interessanti utili in differenti applicazioni in diversi campi. Per esempio, mostrano un ampio spettro di attività biologiche come antibatterici, antifungini, antileucemici e acaricidi.⁴⁵ I benzofurazani per la loro struttura planare e coniugata trovano applicazione come biosensori fluorescenti e coloranti. Inoltre, sostituiti con gruppi nitro si comportano come potenti elettrofili impiegati per composti di interesse applicativo per studi di tipo meccanicistico.

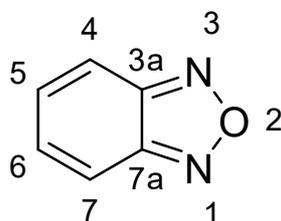
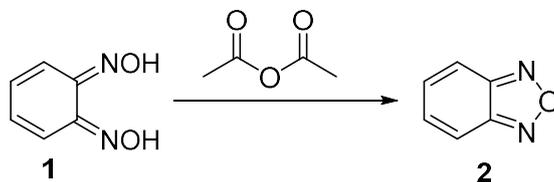


Figura 30. Struttura del benzofurazano

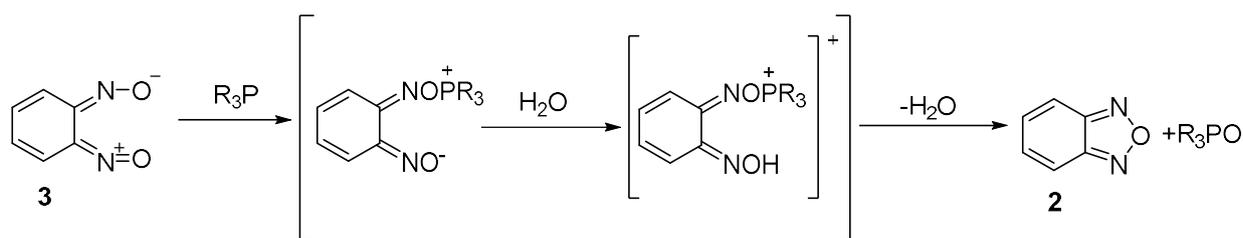
1.6.1 Principali metodi di sintesi del benzofurazano e derivati

Un primo metodo per ottenere il benzofurazano, proposto da Zincke nel 1899, prevede la reazione di *o*-benzochinone diossima utilizzando anidride acetica e la successiva ciclizzazione.⁴⁶



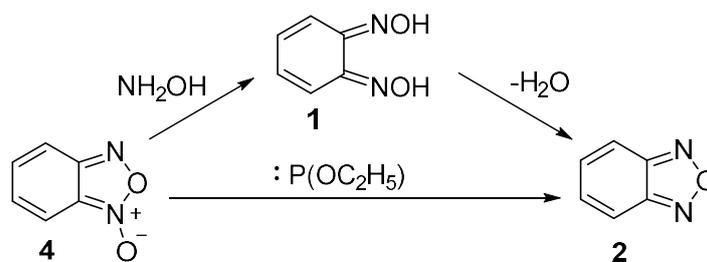
Schema 9. Sintesi secondo Zincke

Un secondo metodo proposto da Boyer ed Ellzey è la deossigenazione di *o*-dinitrosobenzene **3** con fosfine (trifenilfosfina, ma anche tri-*n*-butilfosfina o trietilfosfina) in un solvente idrocarburico attraverso la formazione di un probabile stato di transizione zwitterionico e/o una base quaternaria.⁴⁷



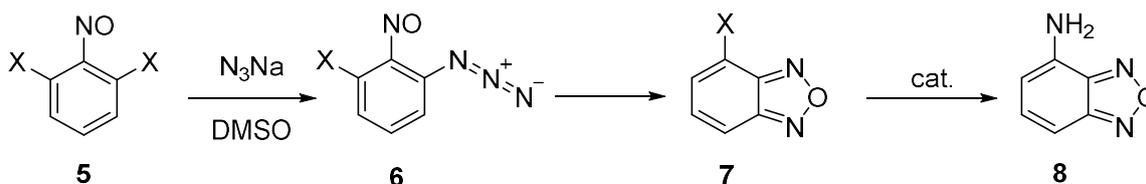
Schema 10. Sintesi secondo Boyer ed Ellzey

Il benzofurazano può inoltre essere sintetizzato a partire dal benzofurossano corrispondente **4** con una reazione di deossigenazione *one-step* usando trietil fosfito oppure tramite una riduzione con idrossilammina che porta all'intermedio chinone diossima che deidrata rapidamente a riflusso in ambiente alcalino.⁴⁸



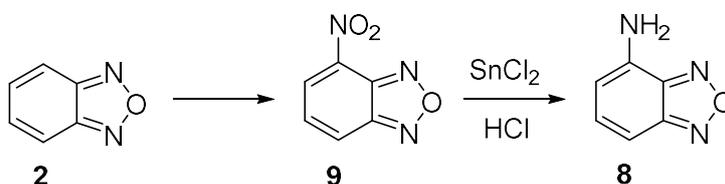
Schema 11. Sintesi da benzofurossano

I benzofurazani sostituiti sono preparati con la reazione tra 2,6-dialogeno nitrosobenzeni **5** e sodio azoturo in dimetilsolfossido. Il primo step prevede la sostituzione di uno dei due gruppi alogeno con l'azoturo, a cui segue una ciclizzazione per reazione con il gruppo nitroso in posizione orto, ottenendo il 4-alogenobenzofurazano **7**.⁴⁸ L'alogeno in posizione 4 può subire una reazione di amminolisi in presenza di un catalizzatore per ottenere 4-amminobenzofurazano.⁴⁹



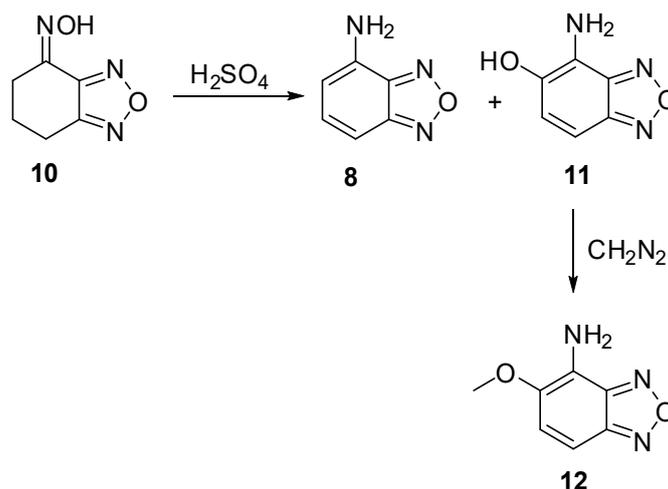
Schema 12. Reazione per ottenere benzofurazani sostituiti

Il 4-amminobenzofurazano può essere ottenuto inoltre dalla riduzione del 4-nitrobenzofurazano **9** con dicloruro stannoso e acido cloridrico in condizioni blande. Il nitrobenzofurazano è facilmente preparato tramite nitratura del benzofurazano con una miscela nitrante.⁴⁹



Schema 13. Reazione per ottenere 4-amminobenzofurazano

I derivati del benzofurazano possono essere sintetizzati con la reazione di aromatizzazione di Semmler-Wolff. L'ossima **10** è scaldata in acido solforico con conseguente formazione di una miscela di 4-amminobenzofurazano (prodotto maggioritario) e 4-ammino-5-idrossibenzofurazano **11**. Il secondo prodotto trattato con diazometano porta alla formazione di 4-ammino-5-metossibenzofurazano **12**.⁵⁰



Schema 14. Aromatizzazione di Semmler-Wolff

1.6.2 Proprietà biologiche dei benzofurazani e derivati

I benzofurazani trovano diverse applicazioni in campo biologico e farmaceutico, sia all'interno di principi attivi di farmaci (antibatterici, antivirali, antifungini, antileucemici) sia come sonde per il rilevamento biologico.

Un derivato del benzofurazano (Figura 31) mostra una promettente attività antivirale contro l'influenza A (H1N1). Questo composto è infatti in grado di bloccare l'interazione tra PA e PB1, due subunità appartenenti al complesso RNA polimerasi del virus A/H1N1. RNA polimerasi dell'influenza, composta dalle tre subunità PB1, PB2 e PA, è un target attraente per quanto riguarda l'inibizione della replicazione virale per la sua presenza in differenti tipi di virus e il basso rischio di sviluppare resistenza al farmaco.⁵¹

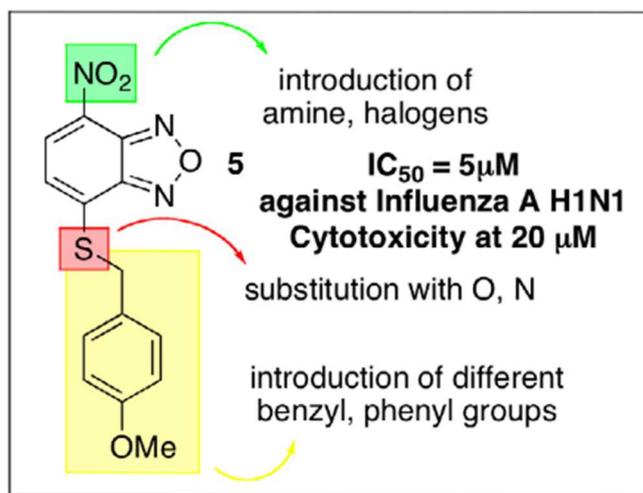


Figura 31. Derivato benzofurazanico antivirale⁵¹

Un'importante proprietà dei derivati del benzofurazano è la predisposizione alla fluorescenza, dovuta alla struttura biciclica coniugata; con gli opportuni sostituenti in grado di estendere la coniugazione è possibile ottenere perciò composti estremamente fluorescenti. Questi derivati contengono gruppi elettron-donatori, come anelli tetrazolici alchilati, connessi al gruppo benzofurazano che funge da elettron-accettore.⁵²

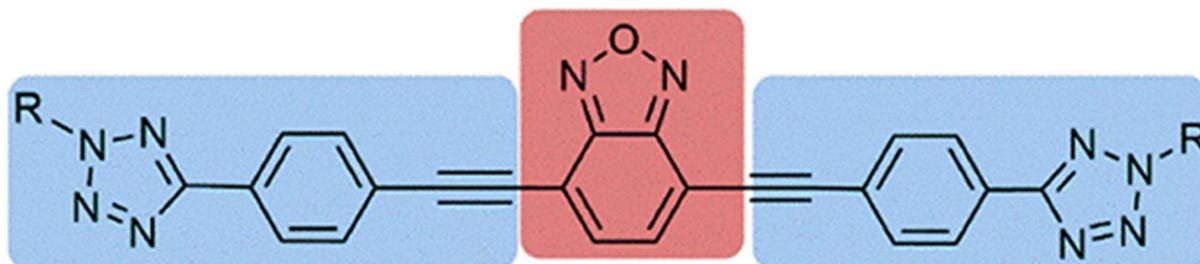


Figura 32. Derivato del benzofurazano fluorescente⁵²

I derivati fluorescenti dei benzofurazani hanno attirato l'attenzione per il loro utilizzo come sonde per il rilevamento biologico, controllo del *drug delivery* ecc. L'utilizzo di sonde fluorescenti ha diversi vantaggi, come l'alta sensibilità, selettività e rilevamento in tempo reale e *in situ*. In particolare, le sonde che emettono nel vicino infrarosso (sonde NIR) hanno un significato importante per la ricerca nel campo dell'*imaging* in vivo per la loro capacità di penetrare nei tessuti e di non danneggiare le cellule vive. Un esempio di sonda fluorescente NIR è il derivato del benzofurazano, nel quale è presente uno scheletro di emi-cianina, utilizzato per rilevare i biotoli cisteina (Cys), omocisteina (Hcy) e glutazione (GSH). Questi biotoli sono di grande importanza per la salute umana nel processo metabolico cellulare e sono correlati ad una serie di malattie. La sonda fluorescente in figura 33 è in grado di rilevare la presenza simultaneamente di questi tre biotoli in organismi viventi.⁵³

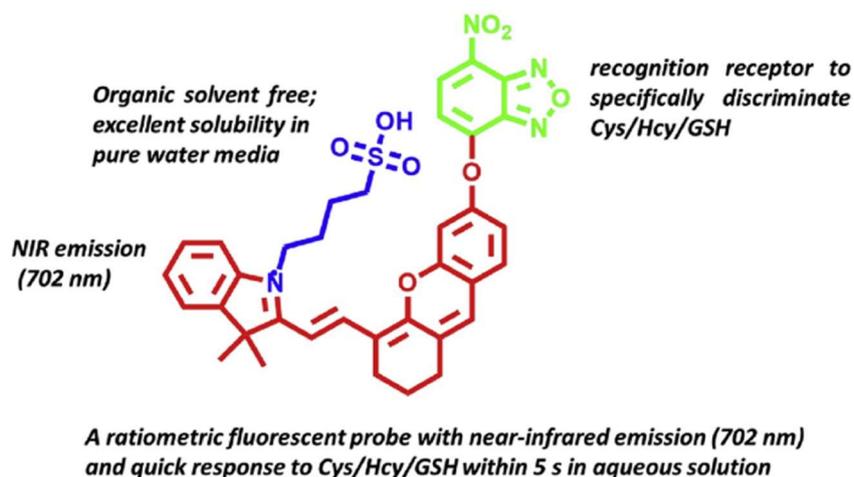


Figura 33. Sonda fluorescente a base di benzofurazano⁵³

Recentemente i derivati del benzofurazano sono diventati oggetto di interesse per le loro proprietà antitumorali. Infatti i derivati come 4-nitrobenzofurazano (Figura 34), sono potenti inibitori della biosintesi proteica in diverti tipi di cellule animali ma con un effetto tossico per il metabolismo dei leucociti in particolare, impedendo l'incorporazione di uridina all'interno dell'RNA del globulo bianco.⁴⁸

Alcuni derivati nitrobenzofurazani contenenti una catena laterale *N'*-idrossibenzimidammidica sono considerati importanti *target* terapeutici per il trattamento immunoterapico del cancro. Recenti studi hanno infatti dimostrato la sua attività inibitoria nei confronti dell'enzima indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO1), fondamentale nel catabolismo dell'L-triptofano, considerato un meccanismo cruciale nella tolleranza immunitaria. L'inibizione di IDO1 riduce la crescita anomala delle cellule tumorali e mostra inoltre un effetto sinergico con il trattamento chemioterapico e radioterapico.⁵⁴

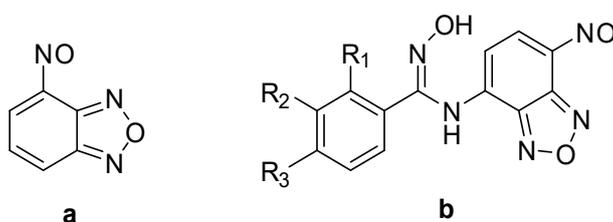


Figura 34. 4-Nitrobenzofurazano (a) e derivato *N'*-idrossibenzimidammidico (b)

2. RISULTATI E DISCUSSIONE

Studi effettuati dal gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto questo lavoro di tesi hanno indicato che alcuni elementi presenti nella struttura dell'Apcin, come il gruppo 2-amminopirimidinico e il gruppo CCl_3 evidenziati in figura 35, si sono dimostrati essenziali per l'inibizione del processo di attivazione di CDC20. Questi elementi sono stati perciò mantenuti nella struttura dei nuovi derivati. In particolare in questo lavoro di tesi ci si è focalizzati sulla sintesi di composti in cui, oltre alle suddette funzionalità, fosse presenti il nucleo benzotiazolico o quello benzofurazanico (sostituendo la parte di molecola dell'Apcin indicata in nero nella figura 35).

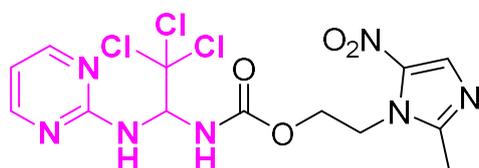
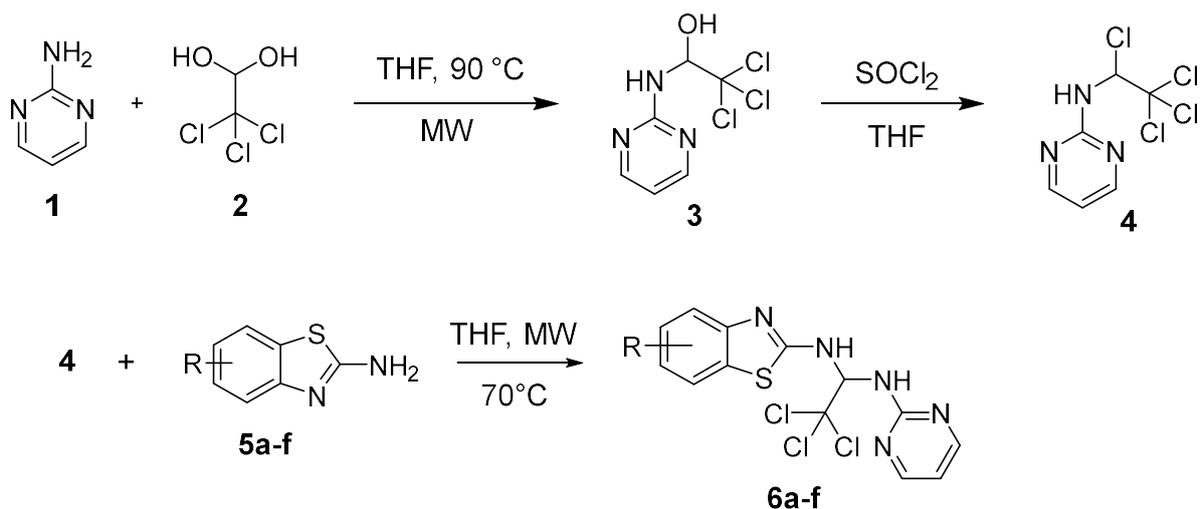


Figura 35. Struttura dell'Apcin

2.1 Sintesi di derivati contenenti benzotiazolo

La scelta di impiegare come sostituito il 2-amminobenzotiazolo è stata suggerita dal fatto che molti composti contenenti il nucleo benzotiazolico presentano proprietà farmacologiche rilevanti e proprietà antitumorali. L'introduzione del nucleo 2-amminobenzotiazolico avrebbe quindi potuto dar luogo ad una modificazione con risvolti biologici interessanti, perciò è stata realizzata la sintesi dei composti **6a-e** a partire da 2-amminobenzotiazolo e suoi derivati sostituiti nell'anello benzocondensato, come descritto nello Schema 15.

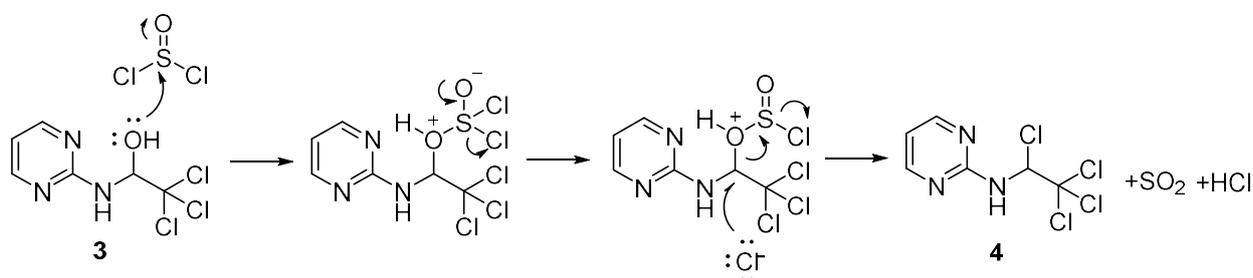


a: R= H; b: R= 4-OCH₃; c: R= 6-OCH₂CH₃; d: R= 6-CH₃; e: 6-Cl; f: 6-NO₂

Schema 15. Procedura sintetica dei derivati a base 2-amminobenzotiazolica.

Il primo *step* prevede la sintesi dell'emiamminale intermedio **3** per condensazione a partire da 2-amminopirimidina (**1**) e cloralio idrato (**2**). I due reagenti sono sciolti in THF e la miscela è riscaldata con l'ausilio di microonde (MW). Al termine della reazione l'analisi TLC ha rivelato la presenza dei reagenti in tracce, ed il prodotto è stato purificato mediante distillazione bolla a bolla. Al termine della distillazione l'emiamminale **3** è stato ottenuto con una resa del 96%.

Il secondo *step* è una reazione con cloruro di tionile (SOCl₂) in ambiente anidro che ha portato alla formazione del cloruro **4** per sostituzione del gruppo ossidrilico dell'emiamminale **3** (Schema 16).



Schema 16. Meccanismo di reazione della clorurazione su **3**.

La reazione è condotta a 25°C circa, in THF anidro per evitare la disattivazione di SOCl₂ e mantenere l'integrità del prodotto finale.

L'apparecchiatura utilizzata per questa reazione è schematizzata in Figura 36: un pallone a tre colli è stato collegato a una colonna refrigerante aperta per consentire l'allontanamento dei sottoprodotti gassosi HCl e SO₂; in un collo è invece inserita una pipetta Pasteur collegata al giunto del pallone mediante raccordo Sovirel e pescante nella soluzione, e collegata, tramite adattatore, alla linea dell'azoto; l'ultimo collo è dedicato all'inserimento dei reagenti e del solvente di reazione.

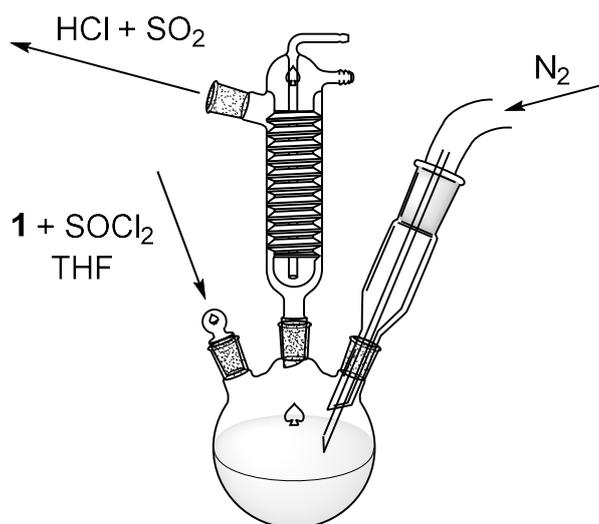
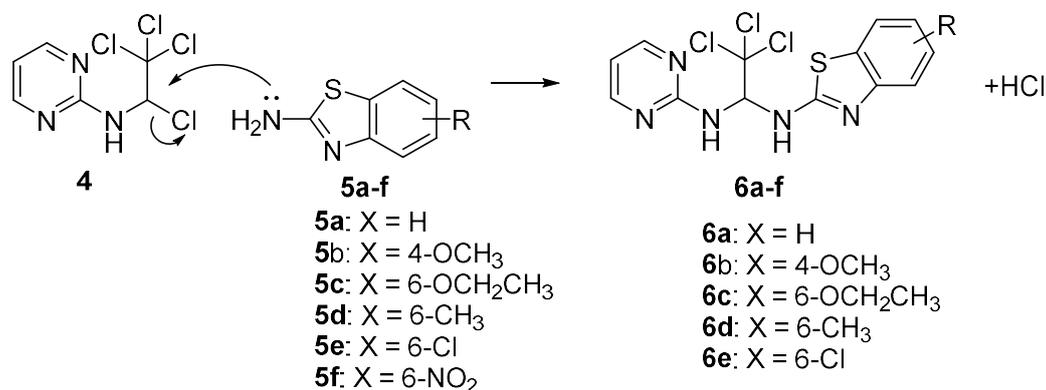


Figura 36. Vetreria utilizzata per la reazione di clorurazione

Durante la reazione è stato gorgogliato azoto all'interno della soluzione sia per avere l'ambiente di reazione in atmosfera inerte sia per favorire la completezza della reazione mediante l'allontanamento dei sottoprodotti gassosi. L'andamento della reazione è stato monitorato tramite misurazione del pH con cartina al tornasole posta allo sbocco del refrigerante: infatti durante la reazione viene liberato HCl gassoso che viene rilevato dal viraggio della colorazione della cartina al tornasole.

Inizialmente al termine della reazione il prodotto era portato a secco tramite evaporatore rotante e trasferito nel reattore per lo *step* successivo, ma poi si è optato per il trasferimento diretto della miscela di reazione all'interno del reattore, utilizzando quindi come solvente lo stesso solvente di questa reazione. In questo modo si riduce la possibilità di contatto del cloruro ottenuto con l'umidità presente nell'aria eliminando un passaggio che potrebbe portare a una riduzione della resa della reazione.

L'ultimo *step* è l'attacco del derivato 2-amminobenzotiazolico **5** sul composto **4** che, mediante reazione di sostituzione nucleofila, dà luogo al prodotto finale **6**.



Schema 17. Meccanismo di reazione della sostituzione nucleofila

La reazione avviene per riscaldamento dei reagenti mediante irraggiamento con microonde a 70°C. Dopo diversi tentativi il tempo di reazione massimo di esposizione alle microonde è stato riscontrato essere di 4 ore in quanto aumentando ulteriormente l'esposizione si osservava presenza nella miscela di reazione di grandi quantità di 2-amminobenzotiazolo, 2-amminopirimidina e cloralio idrato, indice di degradazione del prodotto.

Per la sintesi dei prodotti **6a-c** nella miscela di reazione è stata aggiunta piridina per neutralizzare l'HCl formato mentre per i prodotti successivi, **6d-f**, si è optato per l'aggiunta di due equivalenti di 2-amminobenzotiazolo perché, nonostante la presenza di piridina, una parte di 2-amminobenzotiazolo si salificava comunque, abbassando la resa di reazione.

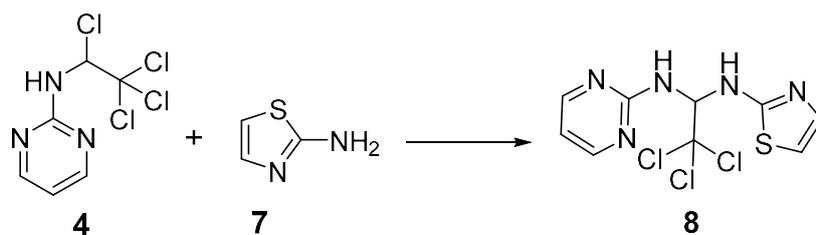
L'andamento della reazione è stato seguito mediante analisi ¹H-NMR del grezzo di reazione, in cui è stato possibile identificare la presenza del prodotto **6** attraverso alcuni picchi caratteristici della struttura che hanno permesso di stimare se la reazione fosse avvenuta o meno e in che rapporto rispetto ai reagenti. I prodotti **6a-e** sono stati tutti identificati e successivamente purificati con colonna cromatografica tranne il prodotto **6f** che non si è formato, probabilmente a causa della minore reattività del 2-amminobenzotiazolo sostituito con il gruppo fortemente disattivante nitro (NO₂).

Al termine della reazione, il cloridrato del 2-amminobenzotiazolo e l'eventuale cloruro **4** non reagito sono stati separati in buona parte dalla miscela grezza di reazione

aggiungendo diclorometano al residuo ottenuto dopo rimozione del solvente. In diclorometano questi sono risultati poco solubili, ed eliminati per filtrazione su imbuto di Buchner. Questa procedura ha consentito di semplificare il successivo stadio di isolamento del prodotto mediante separazione cromatografica. Quest'ultima non è risultata comunque semplice: dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ delle frazioni in uscita da una prima colonna cromatografica di prova sul residuo contenente **6a** si è notata la presenza, nelle frazioni di coda, di 2-amminopirimidina (**1**) e di cloralio idrato (**2**). Ipotizzando che questo fosse dovuto a instabilità del prodotto **6** durante il passaggio sulla silice della colonna, per la purificazione dei prodotti **6a-c** si è deciso di disattivare la silice aggiungendo alla miscela eluente, durante l'impaccamento della colonna, il 3% di trietilammina (Et_3N). Inoltre il grezzo di reazione è stato disperso nella miscela eluente invece di essere adsorbito su silice, con l'intento di evitare la degradazione del prodotto **6** desiderato ma questo procedimento ha causato una separazione più difficoltosa dei componenti del grezzo.

In seguito si è capito che la presenza di **1** e **2** nelle frazioni di coda della colonna era dovuta alla degradazione del cloruro **4** per cui la purificazione dei prodotti **6d** e **6e** è stata effettuata su silice nel modo classico con aumento di resa (da 15% a 22% per il prodotto **6d** e da 9% a 19% per il prodotto **6e**). Ciononostante, nella frazione della colonna contenente il prodotto è stata riscontrata presenza, anche se in tracce, di cloralio idrato e, dato che i prodotti finali richiedono una purezza elevatissima dovendo poi essere somministrati alle cellule per i saggi biologici, il prodotto derivante dalla cromatografia su silice è stato ulteriormente purificato mediante distillazione bolla a bolla. Nel caso del prodotto **6e**, oltre al cloralio, è stata riscontrata, via $^1\text{H-NMR}$, anche presenza di 1-cloro-4-butanolo, dovuto all'attacco del cloruro sul THF con conseguente apertura d'anello. Questo sottoprodotto è stato rimosso insieme al cloralio con la distillazione bolla a bolla, ottenendo quindi **6e** puro.

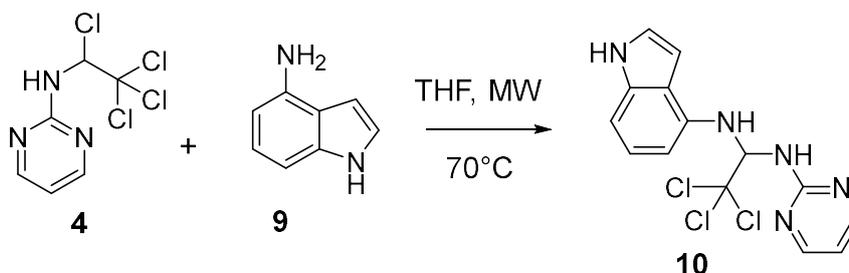
Un altro gruppo che da letteratura⁵⁵ risulta avere un importante effetto, quando presente in molti composti ad attività antitumorale, è il gruppo tiazolico. La reazione con **4** è stata anche provata con 2-amminotiazolo (**7**) ma il prodotto finale è risultato poco stabile per cui è stato ottenuto in tracce e impuro, tanto da non permettere di effettuare le analisi biologiche.



Schema 18. Procedura sintetica del derivato a base 2-amminotiazolica

2.2 Sintesi di derivati contenenti indolo

Diverse molecole contenenti derivati indolici sono state approvate per la loro attività nei confronti di diverse tipologie di cancro. Questo ha suggerito di provare anche la sintesi di tali derivati. È stato quindi deciso preparare il derivato **10** (Schema 19).



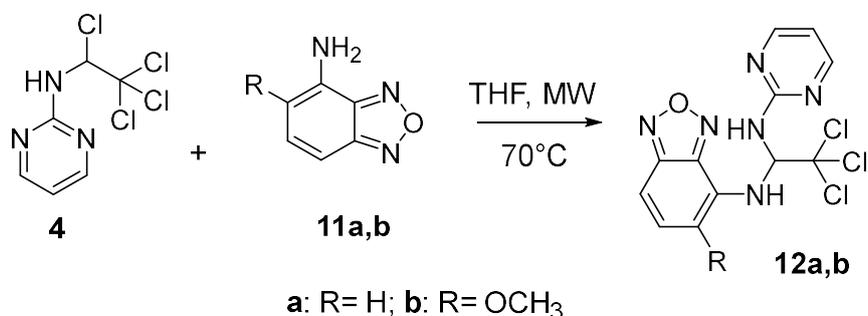
Schema 19. Procedura sintetica del derivato a base 4-amminoindolico

La procedura di sintesi è analoga a quella utilizzata per i derivati benzotiazolici. L'attacco del 4-amminoindolo (**9**) è avvenuto selettivamente attraverso il gruppo amminico in posizione 4, e non è stata rivelata presenza del regioisomero che si formerebbe per reazione con l'ammina secondaria. Il prodotto **10** ottenuto è stato purificato mediante distillazione bolla a bolla per eliminare tracce di clorolio.

2.3 Sintesi di derivati contenenti benzofurazano

Il benzofurazano e i suoi derivati di recente hanno attirato l'interesse del gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto questo lavoro di tesi per le sue proprietà interessanti utili in differenti campi applicativi.⁵⁶⁻⁵⁹

Questo ha indotto a provare la sintesi dei composti **12a,b** che è stata realizzata a partire da 4-amminobenzofurazano (**11a**) e 4-ammino-5-metossibenzofurazano (**11b**) come descritto nello schema 20.



Schema 20. Procedura sintetica per l'ottenimento dei derivati benzofurazani **12a** e **12b**.

Anche la procedura è analoga a quella utilizzata per i derivati benzotiazolici. I prodotti **12a,b** sono risultati facilmente separabili, per cromatografia, dagli altri componenti del grezzo di reazione, in quanto presentano un R_F molto inferiore rispetto agli altri componenti. I benzofurazani sono stati ottenuti, dopo purificazione cromatografica, con rese di 40% per il prodotto **12a** e 38% per il prodotto **12b** e sono stati completamente caratterizzati.

Si deve osservare che in questo lavoro di tesi non ci si è dedicati tanto alla ottimizzazione delle rese (cosa che sarà eventualmente fatta in un secondo momento, in base ai risultati biologici ottenuti) quanto all'ottenimento di prodotti con elevato grado di purezza, in modo da poter essere impiegati nei successivi saggi biologici.

2.4 Saggi biologici

I composti sintetizzati sono stati consegnati per indagini sull'attività biologica a due gruppi di ricerca, e in particolare a quello della dott.ssa Giorgia Simonetti, dell'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori, per quanto riguarda i saggi sulla leucemia acuta mieloide, e quello della prof.ssa Natalia Calonghi del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, per quanto riguarda le altre linee cellulari riportate di seguito. Si riportano in Figura 37 le

formule dei prodotti sottoposti a saggi biologici, e le sigle con cui sono stati consegnati, in cieco, ai colleghi biochimici, con i numeri a loro associati.

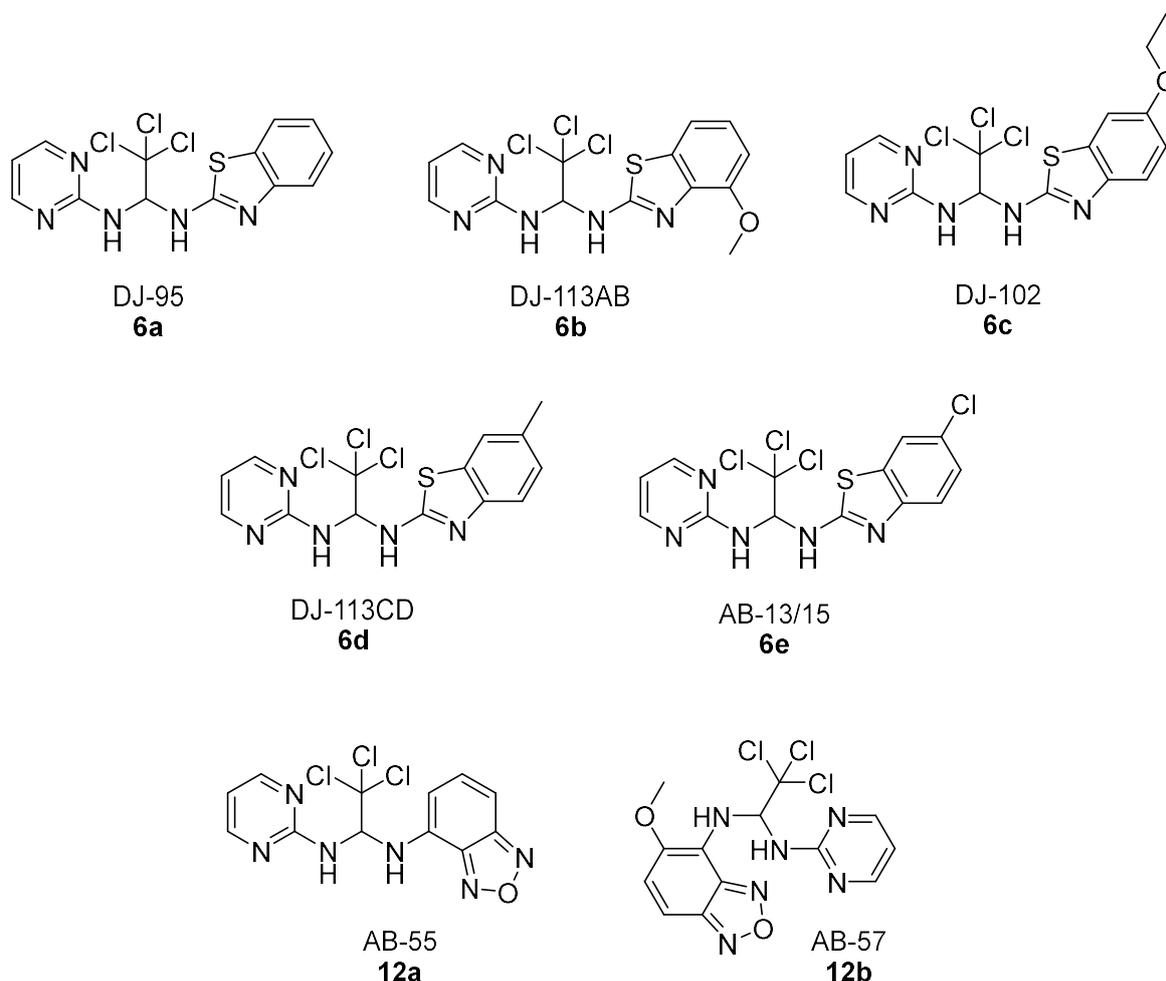


Figura 37. Formule di struttura e numerazione dei derivati su cui sono stati effettuati i saggi biologici

2.4.1 Saggi su linee cellulari di leucemia acuta mieloide

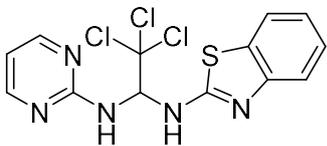
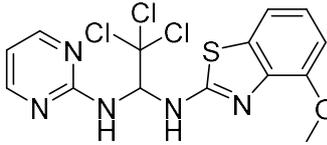
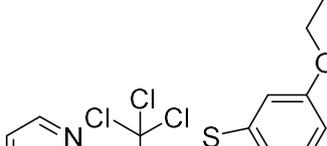
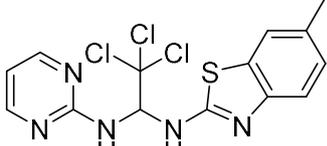
I saggi sono stati effettuati sulla linea cellulare di leucemia acuta mieloide KG-1, sensibile all'Apcin. Sono stati somministrati i composti **6a-e** ed è stata valutata la percentuale di sopravvivenza a diverse dosi dopo 24, 48 e 72 ore. Dopo 24 ore, l'effetto dei nuovi composti è risultato paragonabile a quello dell'Apcin solo a dosi elevate (≥ 100 micromolare) mentre dopo 48 ore i composti **6b-e** sono risultati più attivi di Apcin già a dose 10 micromolare. Questi dati, anche se molto preliminari, suggeriscono l'intervento di un effetto del sostituente sull'anello benzocondensato. Ulteriori studi sono tuttora in corso.

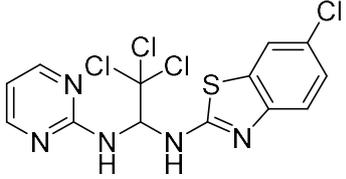
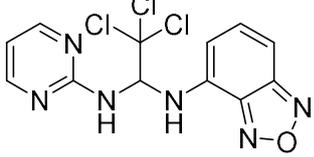
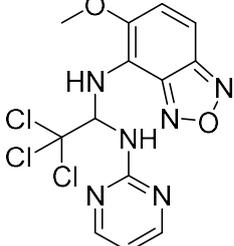
2.4.2 Saggi su altre linee cellulari di cancro umano

Tutti i composti rappresentati in Figura 37 sono stati sottoposti a saggio preliminare di attività biologica verso linee cellulari di cancro umano della cervice uterina (HeLa), dell'osso (U2OS), del colon (HT29) e della mammella (MCF7).

I dati ottenuti sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 1. Dati preliminari di attività biologica (IC₅₀) di alcuni composti sintetizzati verso alcune linee cellulari di cancro umano.^a

Composto	MCF7 IC ₅₀ (M)	HeLa IC ₅₀ (M)	U2OS IC ₅₀ (M)	HT29 IC ₅₀ (M)
 DJ-95 6a	8.1 x 10 ⁻⁹	NA	5.4 x 10 ⁻⁹	3.1 x 10 ⁻⁸
 DJ-113AB 6b	NA	3.5 x 10 ⁻⁶	6.5 x 10 ⁻⁹	NA
 DJ-102 6c	1.1 x 10 ⁻⁸	NA	8.6 x 10 ⁻⁹	NA
 DJ-113CD 6d	2.4 x 10 ⁻⁸	3.4 x 10 ⁻⁷	NA	NA

 <p>AB-13/15 6e</p>	1,1 x 10 ⁻⁷	5.4 x 10 ⁻⁸	6.6 x 10 ⁻⁹	NA
 <p>AB-55 12a</p>	NA	NA	NA	1.6 x 10 ⁻⁷
 <p>AB-57 12b</p>	1.2 x 10 ⁻⁸	5.2 x 10 ⁻⁸	1.7 x 10 ⁻⁹	NA

^a N.A.: non attivo fino a 500 µM, concentrazioni superiori non vengono solitamente prese in considerazione.

Come si può osservare dai dati riportati in tabella, tutti i composti hanno mostrato una buona attività antitumorale nei confronti di almeno una fra le linee cellulari considerate. I composti della serie benzotiazolica, a parte il derivato **6d**, risultano essere molto efficaci contro le cellule dell'osteosarcoma U2OS. Anche per quanto riguarda la linea cellulare MCF7, relativa al tumore della mammella, tutti i derivati benzotiazolici sintetizzati, tranne il derivato **6b**, si sono rivelati efficaci. La linea cellulare HT29 (tumore del colon) risulta essere sensibile solamente al derivato **6a**, mentre la linea cellulare HeLa ha mostrato sensibilità ai derivati **6b**, **6d** e **6e**.

Anche i derivati a base benzofurazanicca si sono rivelati efficaci e selettivi, il composto **12a** risulta estremamente selettivo in quanto attivo solamente contro il carcinoma del colon, mentre il derivato **12b** è efficace contro tutte le linee cellulari considerate tranne che per la HT29.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata realizzata la sintesi di nuovi composti aventi in comune il nucleo 2-amminopirimidinico e il gruppo tricloroetilenico. A questo scheletro sono stati legati diversi eterocicli per reazione fra *N*-(1,2,2,2-tetracloroetil)pirimidin-2-ammina, a sua volta ottenuta per clorurazione di 2,2,2-tricloro-1-(pirimidin-2-ilammino)etan-1-olo, e diverse ammine eterocicliche, quali una serie di 2-amminobenzotiazoli diversamente sostituiti sull'anello benzocondensato, 4-amminoindolo, 4-amminobenzofurazano e il suo derivato metossilato in posizione 5. I nuovi prodotti sono stati completamente caratterizzati e ottenuti con rese non ottimizzate ma in forma pura in modo da essere impiegati per saggi preliminari di attività biologica su diverse linee cellulari di cancro umano. I risultati biologici hanno mostrato una interessante attività di tutti i composti testati e in alcuni casi una loro selettività verso alcune linee cellulari. In futuro verrà messa a punto sia la sintesi che la purificazione dei composti, cercando di migliorare le rese ottenute, cosa che durante il periodo di tesi non è stato possibile fare a causa del lock-down decretato dalle misure governative messe in atto per contrastare il diffondersi della pandemia dovuta al virus SARS-CoV-2 che non ha permesso, o ha permesso solo parzialmente, la frequenza ai laboratori di ricerca.

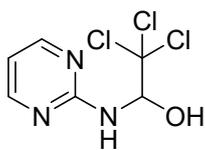
4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Note generali

I reagenti utilizzati per la sintesi dei composti, se non diversamente specificato, provengono dalla Sigma-Aldrich (Milano). La cromatografia su colonna (FC) è stata effettuata utilizzando come fase stazionaria gel di silice (Geduran Si 60, 0063-0,200mm, Merck) mentre la cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata utilizzando gel di silice 60 (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck). Per la rivelazione delle macchie relative ai reagenti aromatici è stata utilizzata una lampada UV a 254 nm. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (¹H NMR, ¹³C NMR e DEPT) sono stati registrati con spettrometri Inova 300, Mercury 400 o Inova 600 (Varian, Palo Alto, USA) rispettivamente a 300, 400, o 600 MHz (per gli spettri al protone) e a 75, 100 o 150 MHz per quelli al ¹³C. Le frequenze sono riportate in Hz e lo spostamento chimico δ è dato in ppm prendendo come riferimento il solvente (DMSO-d₆: δ = 2,50 ppm per ¹H NMR e δ = 39.5 per ¹³C NMR; CDCl₃ δ = 7.26 ppm per ¹H NMR e δ = 77.0 ppm per ¹³C NMR).

La procedura di disattivazione della silice è stata eseguita aggiungendo 3 mL di Et₃N a 97 mL di miscela eluente, dopodiché la miscela è stata versata nella colonna precedentemente impaccata e fatta percolare lentamente attraverso la silice per poi essere recuperata tramite un pallone e fatta percolare nuovamente per 2 volte, più velocemente, tramite l'ausilio di una pompetta ad aria. Infine la colonna è stata lavata con la miscela eluente pura per 2 volte. Gli spettri ESI-MS sono stati registrati con un apparecchio WATERS ZQ 4000. I punti di fusione sono stati determinati tramite un apparecchio Buchi 535 e non sono stati corretti. Per la distillazione bolla a bolla è stato utilizzato un apparecchio Buchi GKR-50 e i solventi anidri sono stati preparati seguendo procedure standard. Per le reazioni condotte in microonde è stato utilizzato un apparecchio MILESTONE Start Synth ad una potenza di 300 W. Il 4-ammino-5-metossibenzofurazano (**11b**) era già disponibile nel laboratorio di ricerca. Il THF è stato anidrificato per distillazione sotto azoto in presenza di sodio benzofenone chetile. La 2-amminopirimidina (**1**), il cloralio idrato (**2**), il 4-amminoindolo (**9**), il 4-amminobenzofurazano (**11a**) e tutti i solventi utilizzati sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich.

4.2 Sintesi di 2,2,2-tricloro-1-(pirimidin-2-ilammino)etan-1-olo (**3**)



3

Una miscela di cloralio idrato (**2**, 0.50 g, 3.0 mmol) e 2-amminopirimidina (**1**, 0.29 g, 3.0 mmol) è solubilizzata in 20 mL di THF anidro all'interno di un reattore per microonde e fatta reagire in microonde (300W) a 90°C per 3 ore e mezza. Il grezzo è purificato con distillazione bolla a bolla a 90°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa = 96%

Aspetto: Solido bianco

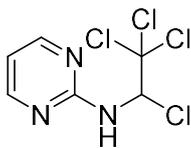
P.f. = 167 – 168 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 8.40 (d, *J* = 4.8 Hz, 2 H), 7.50 (m, 2 H, NH+OH), 6.79 (t, *J* = 4.8 Hz, 1 H), 6.20 (dd *J*₁ = 9.7 Hz, *J*₂ = 5.9 Hz, 1 H, CHCl₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 160.9, 158.1 (CH), 112.4 (CH), 103.1, 82.5 (CH).

ESI-MS⁺ (*m/z*): 242 [M+H]⁺, 264 [M+Na]⁺.

4.3 Sintesi di N-(1,2,2,2-tetracloroetil)pirimidin-2-ammina (4)



4

Una soluzione di composto **3** (0.24 g, 1.0 mmol) in 20 mL di THF anidro è posta in un pallone a tre colli anidrificato munito di condensatore a ricadere e raccordo per il gas inerte. SOCl₂ (80 μL, 1.0 mmol) è aggiunto goccia a goccia con l'ausilio di una micropipetta. La miscela è fatta reagire sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore; l'azoto è fatto gorgogliare direttamente nella miscela di reazione. Il prodotto è stato utilizzato per la reazione successiva senza purificazione.

Resa= Quantitativa

P.f.= 116 – 119 °C

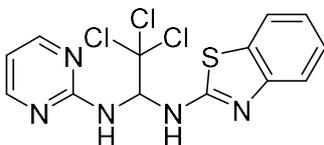
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 8.46 (d, *J* = 4.9 Hz, 2 H), 7.77 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, NH), 6.85 (t, *J* = 4.9 Hz, 1 H), 6.21 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, CHCCl₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 160.2, 158.0 (CH), 112.3 (CH), 102.9, 82.4 (CH).

ESI-MS⁺ (*m/z*): 224 [M-Cl]⁺.

GC-MS (*m/z*): 189 (18, M-70), 154 (100, M-105), 119 (10, M-140), 79 (20).

4.4 Sintesi di *N*-(benzo[*d*]tiazolo-2-il)-2,2,2-tricloro-*N'*-(pirimidin-2-il)-1,1-diammino-etano (**6a**)



6a

Il prodotto **4** (0.5 mmol) è sciolto in 5 mL di THF anidro e la soluzione è addizionata con una soluzione del 2-amminobenzotiazolo corrispondente (**5a**, 1.0 mmol) disciolto in 5 mL di THF anidro. La miscela è scaldata mediante bagno ad olio e fatta reagire a temperatura di riflusso *overnight*. La miscela di reazione è separata con cromatografia su gel di silice disattivata con Et₃N utilizzando la miscela eluente EtOAc/DCM = 1:1. Il prodotto ottenuto è purificato con distillazione bolla a bolla a 60°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa= 7%

Aspetto: Solido beige

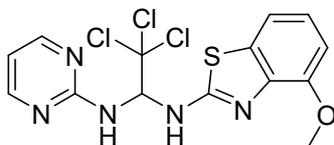
P.f.= 153-155 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ, ppm = 8.87 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, NH), 8.44 (d, *J* = 4.6 Hz, 2 H), 7.86 (d, *J* = 9.4 Hz, 1 H, NH), 7.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.33 (t, *J* = 8.9 Hz, 1 H, CHCl₃), 7.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 6.81 (t, *J* = 4.6 Hz, 1 H)

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ, ppm = 164.9, 160.8, 158.1 (CH), 151.3, 130.8, 125.6 (CH), 121.8 (CH), 121.1 (CH), 118.8 (CH), 112.5 (CH), 102.2, 71.2 (CH).

ESI-MS⁺ (*m/z*): 374 [M+H]⁺, 396 [M+Na]⁺.

4.5 Sintesi di 2,2,2-tricloro-*N*-(4-metossibenzo[d]tiazolo-2-il)-*N'*-(pirimidin-2-il)-1,1-diammino-etano (**6b**)



6b

Il prodotto **4** (0.75 mmol) è sciolto in 5 mL di THF anidro e la soluzione è addizionata con una soluzione del 2-amminobenzotiazolo corrispondente (**5b**, 1.50 mmol) disciolto in 5 mL di THF anidro. La miscela è fatta reagire sotto irraggiamento microonde (300W) per 2 ore a 70 °C. La miscela di reazione è separata con cromatografia su gel di silice disattivata con Et₃N utilizzando la miscela eluente EtOAc/n-esano = 7:3. Il prodotto ottenuto è purificato con distillazione bolla a bolla a 70°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa= 8%

Aspetto: Solido giallino

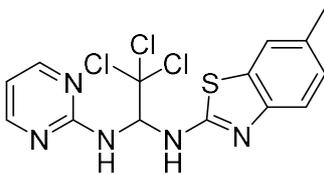
P.f.= 108.7-110.3 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 8.79 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, NH), 8.43 (d, *J* = 4.9 Hz, 2 H), 7.82 (d, *J* = 9.4 Hz, 1 H, NH), 7.32 (dd, *J* = 7.9, 1 H), 7.28 (t, *J* = 8.9 Hz, 1 H, CHCl₃), 7.04 (t, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.87 (dd, *J*₁ = 8.1, 1 H), 6.81 (t, *J* = 4.9 Hz, 1 H), 3.87 (s, 3 H).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 163.4, 160.8, 158.1 (CH), 150.3, 134.2, 132.0, 122.6 (CH), 113.4 (CH), 112.6 (CH), 108.7 (CH), 102.4, 71.3 (CH), 55.9 (CH₃).

ESI-MS⁺ (*m/z*): 404 [M+H]⁺, 426 [M+Na]⁺.

4.6 Sintesi di 2,2,2-tricloro-*N*-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)-*N'*-(pirimidin-2-il)etano-1,1-diammina (**6c**)



6c

La soluzione del prodotto **4** (1.0 mmol) in 15 mL di THF anidro è trasferita in un reattore per microonde e addizionata del 2-amminobenzotiazolo corrispondente (**5c**, 1.6 mmol). La miscela è fatta reagire sotto irraggiamento microonde (300W) per 4 ore a 70 °C. Al termine della reazione il THF è allontanato e la miscela è sciolta in DCM e filtrata su Buchner. La fase liquida è stata concentrata all'evaporatore rotante quindi il residuo è stato sottoposto a cromatografia su gel di silice con miscela eluente EtOAc/*n*-esano 6:4. Il prodotto ottenuto è purificato con distillazione bolla a bolla a 90°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa = 22%

Aspetto: Solido bianco

P.f. = 157 - 159 °C

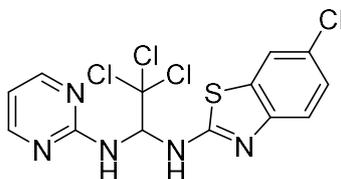
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ , ppm = 8.74 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, NH), 8.43 (d, J = 4.7 Hz, 2 H), 7.82 (d, J = 9.4 Hz, 1 H, NH), 7.53 (s, 1 H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.29 (t, J = 9.0 Hz, 1 H, CHCl₃), 7.07 (dd, J_1 = 8.0, J_2 = 1.1 Hz, 1 H), 6.81 (t, J = 4.7 Hz, 1 H), 2.32 (s, 3 H).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ , ppm = 164.1, 160.9, 158.1 (CH), 149.2, 131.0, 130.9, 126.7 (CH), 120.9 (CH), 118.6 (CH), 112.6 (CH), 102.4, 71.3 (CH), 20.8 (CH₃).

ESI-MS⁺ (m/z): 388 [M+H]⁺, 410 [M+Na]⁺.

ESI-MS⁻ (m/z): 386 [M-H]⁻.

4.7 Sintesi di 2,2,2-tricloro-*N*-(6-clorobenzo[d]thiazol-2-il)-*N'*-(pirimidin-2-il)etano-1,1-diammina (6d)



6d

La soluzione del prodotto **4** (1.0 mmol) in 15 mL di THF anidro è trasferita in un reattore per microonde e addizionata del 2-amminobenzotiazolo corrispondente (**5d**, 1.6 mmol). La miscela è fatta reagire sotto irraggiamento microonde (300W) per 4 ore a 70 °C. Al termine della reazione il THF è allontanato e la miscela è sciolta in DCM e filtrata su Buchner. La fase liquida è separata con cromatografia su gel di silice con miscela eluente DCM/EtOAc = 7:3. Il prodotto ottenuto è purificato con distillazione bolla a bolla a 90°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa = 19%

Aspetto: Solido bianco

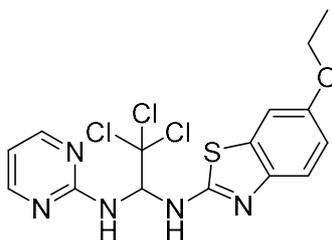
P.f. = 158 - 160 °C

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ , ppm = 9.01 (d, J = 9.1 Hz, 1 H, NH), 8.44 (d, J = 4.8 Hz, 2 H), 7.97 (d, J = 9.6 Hz, 1 H, NH), 7.86 (s, H =1.9 Hz, 1 H), 7.44 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.32 (t, J = 9.2 Hz, 1 H), 7.07 (dd, J_1 = 8.6, J_2 = 1.9 Hz, 1 H), 6.80 (t, J = 4.6 Hz, 1 H).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ , ppm = 165.7, 160.9, 158.1 (CH), 150.2, 132.6, 125.8 (CH), 125.6, 120.8 (CH), 119.8 (CH), 112.6 (CH), 102.1, 71.3 (CH).

ESI- MS^- (m/z): 406 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

4.8 Sintesi di 2,2,2-tricloro-*N*-(6-etossibenzo[d]tiazolo-2-il)-*N'*-(pirimidin-2-il)-1,1-diammino-etano (**6e**)



6e

Il prodotto **4** (0.5 mmol) è sciolto in 5 mL di THF anidro e la soluzione è addizionata con una soluzione del 2-amminobenzotiazolo corrispondente (**5e**, 1.0 mmol) disciolto in 5 mL di THF anidro. La miscela è scaldata mediante bagno ad olio e fatta reagire a temperatura di riflusso *overnight*. La miscela di reazione è separata con cromatografia su gel di silice disattivata con Et₃N utilizzando la miscela eluente EtOAc/DCM = 2:8. Il prodotto ottenuto è purificato con distillazione bolla a bolla a 60°C per 2 ore (residuo nella bolla iniziale).

Resa = 18%

Aspetto: Solido giallo

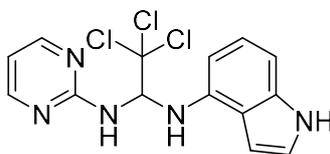
P.f.= 166.5-168.5 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 8.63 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, NH), 8.43 (d, *J* = 4.9 Hz, 2 H), 7.80 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, NH), 7.36 (t, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.34 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H), 7.27 (t, *J* = 9.2 Hz, 1 H, CHCl₃), 6.84 (dd, *J*₁ = 8.8, *J*₂ = 2.6 Hz, 1 H), 6.80 (t, *J* = 4.9 Hz, 1 H), 3.99 (q, *J* = 7.0, 2 H, CH₂), 1.30 (t, *J* = 7.00 Hz, 3 H, CH₃).

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 163.1, 160.8, 158.1 (CH), 154.0, 145.3, 131.8, 119.2 (CH), 113.8 (CH), 112.5 (CH), 106.1 (CH), 102.4, 71.3 (CH), 63.5 (CH₂), 14.6 (CH₃).

ESI-MS⁺ (*m/z*): 418 [M+H]⁺, 440 [M+Na]⁺.

4.9 Sintesi di 2,2,2-tricloro-*N*-(1*H*-indol-4-il)-*N'*-(pirimidin-2-il)etano-1,1-diammina (**10**)



10

La soluzione del prodotto **4** (1.0 mmol) in 15 mL di THF anidro è trasferita in un reattore per microonde e addizionata di 4-amminoindolo (**9**, 2.0 mmol). La miscela è fatta reagire sotto irraggiamento microonde (300W) per 4 ore a 70 °C. Al termine della reazione il THF è allontanato e la miscela è sciolta in DCM e filtrata su Buchner. La fase liquida è concentrata e il prodotto purificato mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando la miscela eluente *n*-esano/EtOAc = 6:4. Il prodotto pulito è presente nella frazione di coda. Da analisi TLC del grezzo di reazione confrontato con il 4-amminoindolo l' R_F del prodotto **10** corrisponde a quello dell'indolo **9** usato come riferimento, quindi durante l'esecuzione della colonna cromatografica è stato necessario prestare attenzione nel raccogliere quello che dall'analisi TLC risulta come il 4-amminoindolo di partenza. il prodotto **4** è solubile in DCM, Et₂O, EtOAc, MeOH ed è stato conservato a 4°C e lontano dalla luce.

Resa = 26.3%

Aspetto: Solido bianco

P.f. = >80 °C dec.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 11.0 (s, 1 H, NH), 8.44 (d, *J* = 4.0 Hz, 2 H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, NH), 7.22 (t, *J* = 2.9 Hz, 1 H), 6.88 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 6.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H), 6.66 (t, *J* = 9.6 Hz, 1 H, CHCl₃), 6.51 (t, *J* = 2.5 Hz, 1 H), 6.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 5.66 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ, ppm = 161.1, 138.1, 136.6, 123.2 (CH), 122.0 (CH), 117.4, 112.2 (CH), 104.0, 103.1 (CH), 100.1 (CH), 97.9 (CH), 72.0 (CH).

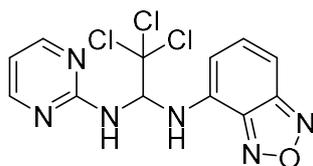
ESI-MS⁺ (*m/z*): 358 [M+H]⁺, 380 [M+Na]⁺.

ESI-MS⁻ (*m/z*): 356 [M-H]⁻.

4.10 Sintesi di 12a e 12b

La soluzione del prodotto **4** (1.0 mmol) in 15 mL di THF anidro è trasferita in un reattore per microonde e addizionata del 4-amminobenzofurazano corrispondente (2.0 mmol). La miscela è fatta reagire sotto irraggiamento microonde (300 W) per 4 ore a 70 °C. Al termine della reazione il THF è allontanato e la miscela è sciolta in DCM e filtrata su setto poroso. La fase liquida è separata con cromatografia su gel di silice. Per il derivato **12a** è utilizzata la miscela eluente DCM/*n*-esano = 7:3; per il derivato **12b** è utilizzata la miscela eluente *n*-esano/EtOAc = 1:1. I prodotti puliti sono presenti nelle frazioni di coda.

N-(benzo[*c*][1,2,5]ossadiazol-4-il)-2,2,2-tricloro-*N'*-(pirimidin-2-il)etano-1,1-diammina (**12a**)



12a

Resa = 40%

Aspetto: Solido giallo-marrone

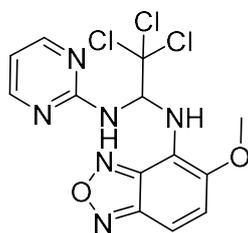
P.f. = >155 °C dec.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ, ppm = 8.40 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J*₁ = 8.9 Hz *J*₂ = 7.4 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.80 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ, ppm = 160.9 (C), 158.5 (CH), 149.8 (C), 144.5 (C), 134.8 (CH), 134.1 (C), 113.0 (CH), 105.5 (CH), 103.9 (CH), 103.0 (C), 71.3 (CH).

ESI-MS⁻ (*m/z*): 357 [M-H]⁻.

2,2,2-tricloro-N-(5-metossibenzo[c][1,2,5]ossadiazol-4-il)-N'-(pirimidin-2-il)etano-1,1-diammina (12b)



12b

Resa = 38%

Aspetto: Solido giallo-marrone

P.f. = > 158 °C dec.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ , ppm = 8.38 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.72 (dd, J_1 = 10.5 Hz J_2 = 9.0 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 6.73 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H)

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ , ppm = 160.8 (C), 158.1 (CH), 147.3 (C), 143.8 (C), 141.5 (C), 125.6 (CH), 119.5 (C), 112.4 (CH), 104.7 (CH), 104.3 (C), 72.1 (CH), 57.9 (CH $_3$).

ESI-MS $^-$ (m/z): 388 [M-H] $^-$.

4.11 Metodi di esecuzione dei saggi biologici

I test di crescita cellulare, vitalità e ciclo cellulare sulla linea cellulare KG-1 sono stati eseguiti dalla Dott.ssa Giorgia Simonetti dell'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (I.R.S.T.) di Meldola (FC).

Le cellule KG-1 sono state cresciute in terreno DMEM addizionato di FBS 10%, L-glutamina e penicillina-streptomicina in incubatore al 20% O₂, 5% CO₂ e alla temperatura di 37°C. Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 0.5x10⁶ /mL in terreno completo, a cui è stato aggiunto il prodotto di sintesi (o DMSO come controllo) a concentrazioni crescenti fra 10 e 250 µM. La crescita cellulare è stata valutata alle 24h, 48h e 72h mediante saggio di esclusione di Trypan blue e conta al microscopio ottico.

Le prove di attività biologica su altre linee di cancro umano sono state effettuate nel laboratorio della Prof.ssa Natalia Calonghi del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna. I saggi si basano sul principio che le cellule proliferanti sono in grado di trasformare i sali di tetrazolio (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in formazano (cristalli blu-neri). Il risultato del test viene valutato misurando allo spettrofotometro l'assorbimento dei diversi pozzetti.

Le cellule HT-29 (adenocarcinoma del colon umano), HeLa (cancro della cervice uterina umana), MCF7 (cancro mammario umano) e le U2OS (osteosarcoma umano) sono state inoculate alla densità di 15 x 10³ in multiwell da 96 pozzetti. Dopo 24 ore vengono trattate con le diverse molecole in un range di concentrazione compreso tra 10nM e 500 nM per 24 ore. Alla fine del trattamento si aspira il surnatante e si aggiungono 100 µL di una soluzione 0.2 mg/mL di MTT in PBS in incubatore a 37 °C per 2 ore. Successivamente si aspira il surnatante e si aggiungono 200 µL di isopropanolo per 20 minuti prima di leggere l'assorbimento a 570 nm in un lettore multiplastrato. Si costituisce infine con Graph Pad la curva dose/risposta da cui si ricava l'IC₅₀.

5. BIBLIOGRAFIA

1. <https://il-corpoumano.it/leucemia-mieloide-acuta/>; ultimo accesso 02/09/2020.
2. <https://together.stjude.org/en-us/about-pediatric-cancer/types/leukemia/acute-myeloid-leukemia-aml.html>; ultimo accesso 02/09/2020.
3. Griffiths, E. A.; Carraway, H. E.; Chandhok, N. S.; Prebet, T. *Leuk. Res.*, **2020**, *91*, 106339.
4. Roskoski, R. J. *Pharmacol. Res.*, **2020**, *155*, 104725.
5. Stirewalt, D. L.; Radich J. P. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 650-665.
6. Grafone, T.; Palmisano, M.; Nicci, C.; Storti, S. *Oncol. Rev.*, **2012**, *6*, e8.
7. El-Nahass, Y. H.; Badawy, R. H.; El-Refaey, F. A.; Nooh, H. A.; Ibrahim, D.; Nader, H. A.; Mahmoud, H. K.; El-Metnawy, W. H. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2020**, *21*, 721-725.
8. Chan, S. M.; Thomas, D.; Corces-Zimmerman, M. R.; Xavy, S.; Rastogi, S.; Hong, W-J.; Zhao, F.; Medeiros, B. C.; Tyvoll, D. A.; Majeti, R. *Nat. Med.*, **2015**, *21*, 178-184.
9. Figueroa, M. E.; Abdel-Wahab, O.; Lu, C.; Ward, P. S.; Patel, J.; Shih, A.; Li, Y.; Bhagwat, N.; Vasanthakumar, A.; Fernandez, H. F.; Tallman, M. S.; Sun, Z.; Wolniak, K.; Peeters, J. K.; Liu, W.; Choe, S. E.; Fantin, V. R.; Paietta, E.; Lowenberg, B.; Licht, J. D.; Godlev, L. A.; Delwel, R.; Valk, P. J. M.; Thomson, C. B.; Levine, R. L.; Melnik, A. *Cancer Cell*, **2010**, *18*, 553-567.
10. Liu, X.; Gong, Y. *Biomarker Res.*, **2019**, *7*, 22-30.
11. Moore, L. D.; Le, T.; Fan, G. *Neuropsychopharmacology*, **2013**, *38*, 23-38.
12. Xu, Q-Y.; Yu, L. *Chin. Med. J.*, **2020**, *133*, 699-715.
13. Pollyea, D. A.; Amaya, M.; Strati, P.; Konopleva, M. Y. *Blood Adv.*, **2019**, *3*, 4326-4335.
14. Levenson, J. D.; Sampath, D.; Souers, A. J.; Rosenberg, S. H.; Fairbrother, W. J.; Amiot, M.; Konopleva, M.; Letai, A. *Cancer Discov.*, **2017**, *7*, 1376-1393.
15. Gutman, J. A.; Pollyea, D. A. *Curr. Opin. Hematol.*, **2020**, *27*, 76-80.
16. Hoy, S. M. *Drugs* **2019**, *79*, 207-213.
17. Cortes, J. E.; Dombret, H.; Merchant, A.; Tauchi, T.; Di Rienzo, C. G.; Sleight, B.; Zhang, X.; Leip, E. P.; Shaik, N.; Bell, T.; Chan, G.; Sekeres, M. A. *Future Oncol.*, **2019**, *15*, 3531-3545.
18. Eberharter, A.; Becker, P. B. *EMBO Reports*, **2002**, *31*, 224-229.

19. <https://www.quora.com/Why-does-histone-acetylation-generally-increase-protein-transcription>; ultimo accesso 31/08/2020.
20. Johnstone, R. W. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 287-299.
21. Yamano, Y. *F1000 Research*, **2019**, *8*, 725-740.
22. Whang, L.; Zhang, L.; Wan, L.; Zhou, X.; Wang, Z.; Wei, W. *Pharmacol. Ther.*, **2015**, *151*, 141-151.
23. Gao, Y.; Zhang, B.; Wang, Y.; Shang, G. *Oncol. Rep.*, **2018**, *40*, 841-848.
24. Sackton, K. L.; Dimova, N.; Zeng, X.; Tian, W.; Zhang, M.; Sackton, T. B.; Meaders, J.; Pfaff, K. L.; Sigoillot, F.; Yu, H.; Luo, X.; King R. W. *Nature*, **2014**, *514*, 646-649.
25. Ram, V. J.; Sethi, A.; Mahendra, N.; Pratap, R. *The Chemistry of Heterocycles*, **2017**.
26. Boga, C.; Micheletti, G.; Orlando, I.; Strocchi, E.; Vitali, B.; Verardi, L.; Sartor, G.; Calonghi, N. *Curr. Org. Chem.*, **2018**, *22*, 1649-1660.
27. Trapani, G.; Franco, M.; Latrofa, A.; Carotti, A.; Gerichi, G.; Serra, M.; Biggio, G.; Liso, G. *Eur. J. Med. Chem.*, **1996**, *31*, 575-587.
28. Yoshida, M.; Hayakawa, I.; Hayashi, N.; Agatsuma, T.; Oda, Y.; Tanzawa, F.; Iwasaki, S.; Koyama, K.; Furukawa, H.; Kurakatad, S.; Sugano, Y. *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3328–3332.
29. Nale, D. B.; Bhanage, B. M. *Synlett*, **2015**, *26*, 2835-2842.
30. Sharma, P. C.; Sinhmar, A.; Sharma, A.; Rajak, H.; Pathak, D. P. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2013**, *28*, 240-266.
31. Wolfe, L. S.; Calabrese, M. F.; Nath, A.; Blaho, D. V.; Miranker, A. D.; Xiong, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 16863-16868.
32. Noolvi, M. N.; Patel, H. M.; Kaur, M. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *54*, 447-462.
33. Lee, J-H.; Lee, J. *FEMS Microbiology Rev.*, **2010**, *34*, 426–444.
34. Nelson, D.L.; Cox, M. M. *Principles of Biochem.*, **2005**.
35. Dadashpour, S.; Emami, S. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *150*, 9-29
36. Fischer, E.; Jourdan, F. *Ber.*, **1883**, *16*, 2241
37. Madelung, W. *Ber.*, **1912**, *45*, 1128-1134.
38. Bartoli, G.; Palmieri, G.; Bosco, M.; Dalpozzo, R. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2129-2132.
39. Gassman, P. G.; Gruetzmacher, G.; Van Bergen, T. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 6508-6509.

40. Clarke K. A., Lynam M. J., Taylor R. J. K., Unsworth, W. P. *ACS Catal.*, **2018**, *8*, 6844-6850.
41. Chadha, N.; Silakari, O. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *134*, 159-184.
42. Singh, T. P.; Singh, O. M. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2018**, *18*, 9-25.
43. Axelrod J. *Science*, **1974**, *184*, 1341-1348.
44. <https://www.rcsb.org/> (PDB ID: 5EF8); ultimo accesso 02/09/2020.
45. Micheletti, G.; Boga, C.; Cino, S.; Bordoni, S.; Chugunova, E. *RSC Adv.*, **2018**, *8*, 41663.
46. Zincke, T.; Schwartz, P. *Ann. Chem.*, **1899**, *307*, 43.
47. Boyer, H; Ellzey, S. E. *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, 4684-4685.
48. Ghosh, P. B.; Whitehouse, M. W. *J. Med. Chem.*, **1968**, *11*, 305-311.
49. Scharnin et al. Method of obtaining 4-aminobenzofurazan RU Patent N. SU627128 (A1) — 1978-10-05 (Zh. Khim., **1979**, vol. *11*, O159P).
50. Samsonov, V. A.; Sal'nikov, G. E.; Volodarskii, L. B. *Chem. Het. Comp.*, **2010**, *46*, 868-878.
51. Kessler, U.; Castagnolo, D.; Pagano, M.; Deodato, D.; Bernardini, M.; Pilger, B.; Ranadheera, C.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 5575-5577.
52. Frizon, T. E. A.; Vieirs, A. A.; Da Silva, F. N.; Saba, S.; Farias, G.; De Souza, B.; Zapp, E.; Lopo, M. N.; Braga, H. C.; Grillo, F.; Curcio, S. F.; Cazati, T.; Rafique, J. *Frontiers Chem.*, **2020**, *8*, 360.
53. Bai, J.; Yang, X.; Qian, Y. *J. Lumin.*, **2020**, *221*, 117055.
54. Paul, S.; Roy, A.; Deka, S. J.; Panda, S.; Trivedi, V.; Manna, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *121*, 364-375.
55. Altintop, M. D.; Ciftci, H. I.; Radwan, M. O.; Sever, B.; Kaplancikli, Z. A.; Ali, T. F. S.; Koga, R.; Fujita, M.; Otsuka, M.; Ozdemir, A. *Molecules*, **2018**, *23*, 59.
56. Micheletti, G.; Iannuzzo, L.; Calvaresi, M.; Bordoni, S.; Telese, D.; Chugunova, E.; Boga, C. *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 34670-34680.
57. Micheletti, G.; Bordoni, S.; Chugunova, E.; Boga, C. *Molecules*, **2017**, *22*, 684.
58. Micheletti, G.; Boga, C.; Pafundi, M.; Pollicino, S.; Zanna, N. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 768-776.
59. Chugunova, E.; Boga, C.; Sazykin, I.; Cino, S.; Micheletti, G.; Mazzanti, A.; Sazykina, M.; Burilov, A.; Khmelevtsova, L.; Kostina, N. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *93*, 349-359.