

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

Nuovi coniugati fra acido azelaico e azaeterocicli: sintesi e valutazione dell'attività biologica

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Isabel Orlando

RELATORE

Prof. Carla Boga

CORRELATORE

Dott. Gabriele Micheletti

Prof. Natalia Calonghi

Sessione II

Anno Accademico 2014-2015

Abstract

The well-known antiproliferative properties of the 9-hydroxystearic acid (9-HSA) on human colon cancer cells (HT-29 cell line) have inspired this thesis work in order to obtain new derivatives maintaining the C1-C8 chain of the HSA linked to an heterocyclic moiety at the C-9 carbon atom and investigate their biological activity. First, thiazoles, thiadiazoles and benzothiazoles, that are compounds of interest in many fields for their biological activities, have been introduced through an amide bond starting from their 2-amino precursors. The products have been obtained by treatment with methyl 9-chloro-9-oxononanoate according to a Schotten-Baumann type reaction. The acylation reaction occurred at the endocyclic nitrogen atom of the heterocycle, as ascertained through NOESY-1D experiment. After, methyl 9-chloro-9-oxononanoate was reacted with indole, N-methylindole, and triptamine giving a serie of new indole derivatives. Finally, the biological activity of some compounds has been tested through assays on HT-29 cancer cells and bacterial and fungal microorganisms; *docking* calculations have also been performed to evaluate the possible interactions with the active site of histone deacetylase, which are molecular targets of the 9-HSA.

Indice

1. Introduzione.....	1
Epigenetica e cancro	1
1.1 Introduzione	1
1.2 Meccanismi epigenetici	2
1.3 Modificazioni istoniche: acetilazione e deacetilazione	4
1.4 Inibitori di istone deacetilasi.....	7
Attività biologica dell'acido idrossistearico	10
1.5 Stress ossidativo: perossidazione lipidica e cancro	10
1.6 Acido idrossistearico	13
Benzotiazoli: sintesi e applicazioni biologiche.....	14
1.7 Introduzione	14
1.8 Principali metodi di sintesi di benzotiazoli.....	15
1.9 Attività biologica dei derivati benzotiazolici e indolici.....	17
2. Risultati e discussione	19
Procedure sintetiche.....	20
2.1 Sintesi di derivati tiazolici, tiadiazolici e benzotiazolici	20
2.2 Sintesi di derivati indolici	26
Saggi cellulari	29
2.3 Determinazione dell'IC ₅₀ tramite test dell'MTT	29
2.4 Analisi in microscopia	32
Calcoli di <i>docking</i> molecolare.....	43
2.5 <i>Docking</i> molecolare: analisi dei composti 4a , 7 e 14	43
Valutazione dell'attività antibatterica/antifungina.....	48
2.6 Saggi sui composti 4a , 6a , 6e , 10 e sul 9(<i>R</i>)-9-HSA.....	48

3. Conclusioni	50
4. Parte sperimentale	511
Note generali.....	511
Procedure sintetiche.....	522
4.1 Sintesi dell'acido 9(<i>R</i>)-9- idrossistearico	522
4.2 Sintesi di 9-cloro-9-ossnonanoato di metile (2)	544
4.3 Sintesi di derivati 4a , 4b , 4c , 4d , 4e , 6a , 6b , 6c , 6d , 6e , 6f . Procedura tipica	555
4.4 Sintesi di acido 9-(2-imminobenzo[d]tiazol-3-2H-ile)-9-ossnonanoico (7)	666
4.5 Sintesi di derivati indolici	67
Test biologici	733
5. Bibliografia	777

1. Introduzione

Epigenetica e cancro

1.1 Introduzione

Il primo a postulare l'esistenza di fenomeni genetici che prescindono da modificazioni a carico del DNA è stato Aristotele, con il concetto di epigenesi contrapposto a quello di preformismo: l'idea secondo la quale lo sviluppo con formazione di strutture differenziate avviene a partire da materia non indifferenziata e non da un organismo già completamente delineato. In seguito, queste teorie secondo cui vi sono delle influenze esterne che controllano l'espressione genica hanno trovato applicazione anche in ambiti diversi, fino a giungere alla definizione di Conrad H. Waddington nel 1942, che definisce l'epigenetica come "la branca della biologia che studia le interazioni causali fra i geni e il loro prodotto e pone in essere il fenotipo".¹ Ad oggi sono note numerose alterazioni epigenetiche e l'interesse crescente nella comprensione di cause e meccanismi è dovuto alle evidenze sperimentali che ne svelano il ruolo fondamentale in una serie di processi, tra cui l'insorgenza di numerose patologie. L'attenzione nei prossimi paragrafi sarà rivolta in maniera specifica ad una modificazione epigenetica, l'acetilazione/deacetilazione istonica, fenomeno che determina, indirettamente, l'attività trascrizionale del DNA e quindi l'espressione genica. E' stato riscontrato che uno stato di acetilazione aberrante è implicato nella manifestazione di una serie di disfunzioni, tra cui diverse patologie tumorali. L'acetilazione degli istoni, proteine basiche attorno alle quali si trova avvolta l'elica del DNA, avviene ad opera di particolari enzimi, gli istone acetiltransferasi, mentre la deacetilazione è compito degli istone deacetilasi; una sovraespressione di questi ultimi è risultata essere, in una serie di lavori, correlata all'insorgenza di neoplasie di vario tipo. Tali esiti hanno condotto allo sviluppo di agenti in grado di inibirne l'attività ed esistono vari farmaci che hanno proprio come target gli istone deacetilasi.

1.2 Meccanismi epigenetici

"Lo studio dei cambiamenti mitotici e meiotici ereditabili che non possono essere spiegati tramite modifiche della sequenza di DNA"²: questa è la definizione che Arthur Riggs e colleghi hanno dato del termine epigenetica. Tra i meccanismi ascrivibili a tale disciplina, i più studiati sono senza dubbio la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche; una o più alterazioni di questo tipo possono condurre a espressione anomala o silenziamento dei geni e, di conseguenza, a patologie cosiddette epigenetiche.³

La metilazione del DNA avviene sulla posizione C-5 dei residui citosinici a carico delle DNA metil transferasi (DNMTs); le zone interessate sono risultate essere le isole dinucleotidiche CpG (notazione per C-phosphate-G, ossia due basi poste su uno stesso filamento e unite tramite legame fosfodiesterico, da non confondere con l'appaiamento di basi su due diversi filamenti), sequenze di DNA costituite da più di 500 pb (coppie di basi) con un contenuto di citosina e guanina superiore al 55%.⁴ A seguito della metilazione di una regione "promoter" si registra silenziamento genico, ovvero repressione della trascrizione a causa dei legami che si instaurano tra il DNA e alcune proteine note come MBD (methylbindingproteins, specifiche per i siti CpG metilati) e che quindi impediscono l'accesso ai fattori trascrizionali (TF).⁵

Rientrano tra le alterazioni di tipo epigenetico anche modificazioni istoniche post-traduzionali (PTM) quali fosforilazione, metilazione, isomerizzazione della prolina, acetilazione. Si tratta di aberrazioni che avvengono appunto a carico degli istoni, proteine altamente basiche costituenti, insieme a proteine non istoniche e a 147 pb di DNA, il nucleosoma, unità fondamentale della cromatina; in particolare, le zone coinvolte sono le "code" N-terminali istoniche, regioni basiche flessibili contenenti maggiori quantità di residui amminici (in particolare lisina e arginina) che fuoriescono dal nucleosoma ed interagiscono con il DNA.² A seguito del manifestarsi delle PTM si verificano variazioni strutturali della cromatina, le quali a loro volta determinano diversi stati trascrizionali: esistono infatti due possibili conformazioni in cui è possibile trovare la cromatina, l'eterocromatina, forma condensata e quindi inaccessibile ai TF, e l'eucromatina, forma rilassata che invece presenta attività trascrizionale (**Fig. 1.1**).

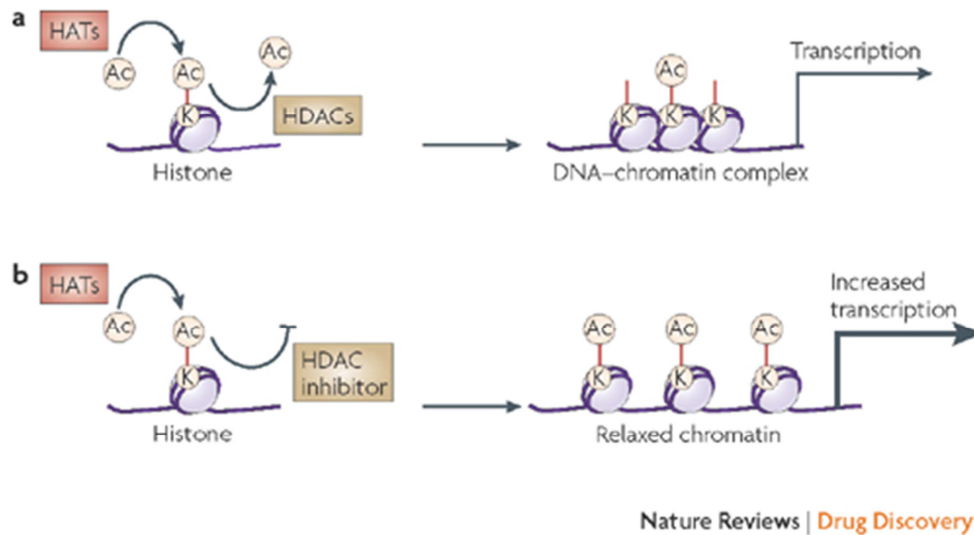


Fig. 1.1: Alterazioni strutturali della cromatina in seguito all'azione di HAT e HDAC.⁶

Studi effettuati su piante e funghi^{7,8,9} hanno evidenziato la stretta correlazione tra le modificazioni istoniche (in particolar modo l'acetilazione) e lo stato di metilazione del DNA, per cui si può affermare che è la complessa interazione tra i due meccanismi a determinare la trascrizione o, viceversa, la repressione trascrizionale di uno specifico gene coinvolto, ad esempio, nella differenziazione, la proliferazione o la sopravvivenza della cellula. Traformazioni epigenetiche alterate possono dar luogo ad una serie di patologie, ereditarie o acquisite somaticamente; tra queste, la sindrome ICF (immunodeficienza, instabilità centromerica e dismorfismi facciali), causata da mutazioni di un gene responsabile della metilazione del DNA, e la sindrome di Rett, disabilità intellettiva che colpisce giovani donne probabilmente correlata alla carenza di un gene generalmente soppresso tramite metilazione del DNA.² Particolare attenzione è stata inoltre rivolta alla comprensione del processo di sviluppo del cancro: si ritiene che variazioni epigenetiche aberranti rivestano un ruolo importante nelle fasi iniziali della patologia, essendo ricorrenti casi di ipometilazione o ipermetilazione di promoter in neoplasie benigne o in tumori ai primi stadi;¹⁰ è stato riscontrato che interi set di geni possono subire deregolamentazione di tipo epigenetico e promuovere le principali peculiarità del cancro ("hallmarks"), tra cui resistenza all'apoptosi, aumento del potenziale di proliferazione, angiogenesi, metastasi.^{11,12} Si è ipotizzato che una deregolamentazione dei meccanismi epigenetici possa indurre instabilità genetica, con conseguenti mutazioni nei geni oncosoppressori e negli oncogeni.

L'eziologia epigenetica di numerose patologie ha condotto allo sviluppo della cosiddetta "terapia epigenetica", e sono stati trovati una serie di agenti alteranti i pattern di

metilazione del DNA o le modificazioni istoniche, molti dei quali ancora in fase di studio tramite test clinici. Tra questi, gli azanucleosidi hanno evidenziato la capacità di inibire la metilazione del DNA e quindi riattivare l'espressione di geni che avevano subito silenziamento.^{13,14} Esistono, d'altra parte, molti dubbi riguardo a tale terapia, principalmente legati all'attivazione aspecifica di geni ed elementi trasponibili in cellule normali ed alla possibile mutagenicità e cancerogenicità; ad oggi, non sono stati effettuati studi approfonditi che analizzino il comportamento di agenti epigenetici su linee cellulari sane.²

1.3 Modificazioni istoniche: acetilazione e deacetilazione

Ciascuna delle modificazioni istoniche sopracitate contribuisce ad alterare la struttura della cromatina, tuttavia, solo la metilazione e l'acetilazione sono state associate clinicamente all'insorgenza di patologie tumorali.^{15,16} All'interno del nucleosoma si trovano gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 e l'istone linker H1, organizzati in forma di ottamero attorno al quale si avvolge in modo sinistrorso l'elica del DNA; l'ottamero istonico consiste in una struttura formata da due dimeri H3-H4 che formano un tetramero tramite l'interazione di un gruppo di quattro eliche degli istoni H3 e da due dimeri H2A-H2B (Fig. 1.2).¹⁷ Ogni istone possiede inoltre una lunga coda N-terminale che fuoriesce dal nucleosoma e che subisce appunto quelle modificazioni che influenzano l'impaccamento della cromatina; in particolare, l'acetilazione (reversibile) viene controllata da due famiglie di enzimi, le istone acetiltransferasi (HAT) e le istone deacetilasi (HDAC).

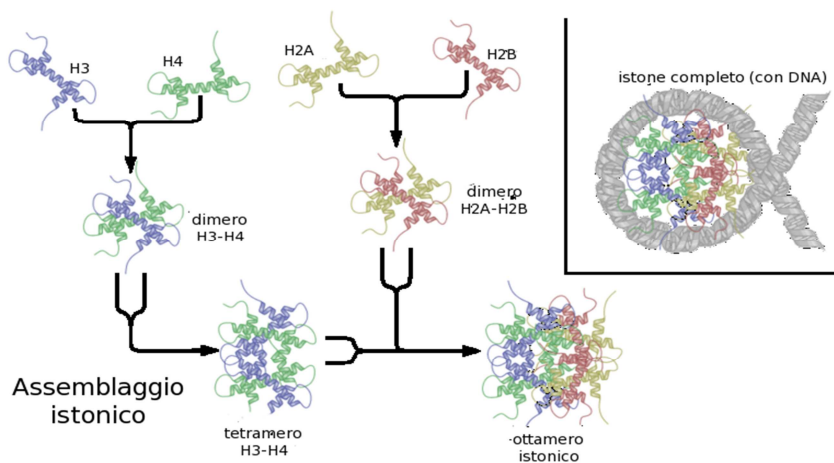


Fig. 1.2: Struttura del nucleosoma¹⁸

Le HAT promuovono l'acetilazione attraverso il trasferimento di un gruppo acetile dall'acetil-coenzima A al gruppo amminico dei residui lisinici: in questo modo si ottiene la neutralizzazione della carica positiva normalmente presente a pH cellulare sull'azoto con conseguente annullamento dell'interazione con i gruppi fosfato carichi negativamente del DNA. Tale processo, a sua volta, comporta il rilassamento del DNA e l'apertura della cromatina (eucromatina), favorendo così l'accesso ai TF e quindi promuovendo l'attività trascrizionale. D'altro canto, le HDAC si occupano della rimozione del gruppo acetile, con ripristino della forma condensata (eterocromatina) associata a silenziamento genico. La famiglia delle HDAC è composta da quattro classi, suddivise in base all'omologia con le deacetilasi lievito: le classi I, II e IV, simili per sequenza e struttura, possiedono attività catalitica zinco-dipendente, a differenza della classe III, le sirtuine, che richiede la presenza di NAD⁺ (nicotinammide adenina dinucleotide, coenzima ossidoriduttivo il cui ruolo è appunto il traferimento di elettroni).¹⁹ La classe I, localizzata principalmente nel nucleo e omologa all'enzima del lievito rpd3, è costituita dalle HDAC 1, 2, 3 e 8 ed è ritenuta essere particolarmente coinvolta nell'acetilazione istonica; ad oggi è chiaro che non tutte le HDAC di questa classe agiscono allo stesso modo, ed il knock-down (ossia l'abolizione delle funzioni senza l'eliminazione fisica) di HDAC diverse della I classe ha dato luogo ad effetti cellulari diversi. Uno studio, ad esempio, ha evidenziato come il knock-down delle HDAC 1 e 2 (ma non della 3) abbia un'azione antiproliferativa su linee cellulari di carcinoma del colon *in vitro*,²⁰ apparentemente in contrasto con i risultati ottenuti in seguito al knock-down di HDAC 3, che conducevano ad inibizione della crescita di un set di cellule di carcinoma del colon diverso;²¹ infine, il knock-down delle HDAC 2 e 3 induce danni al DNA ed apoptosi.²² Analisi svolte sulle HDAC della seconda classe (ossia HDAC 4, 5, 6, 7 e 9, localizzate particolarmente nel citoplasma) hanno portato alle stesse conclusioni: il knock-down di HDAC 4 provoca inibizione della proliferazione ed apoptosi²³ mentre se si abolisce l'attività di HDAC 7 in cellule endoteliali non si registrano effetti sulla crescita o la sopravvivenza ma sulla capacità migratoria e di formazione di strutture capillari.²⁴ Si può dunque affermare che l'attività di tali enzimi è funzione del tipo di cellula e del contesto, per cui è arduo cercare di predire l'effetto della disattivazione di ciascuna HDAC; è tuttavia possibile dedurre che le HDAC della classe I sono impegnate perlopiù nella regolazione dell'attività proliferativa e dell'apoptosi, mentre quelle della classe II appaiono coinvolte nella migrazione e nell'angiogenesi.²⁵

1 Introduzione

La deregolamentazione delle HDAC è fortemente implicata nel silenziamento genico e nella promozione della carcinogenesi, in particolare per quel che riguarda la leucemia: sono note da tempo correlazioni tra insorgenza di patologie e attività delle HDAC nella leucemia promielocitica acuta (APL), con evidenze di aberrante reclutamento delle deacetilasi in zone specifiche tramite interazione con proto-oncogeni. Non solo, è stata riscontrata anche un'alterata espressione di alcune HDAC in vari tumori: la HDAC 1, ad esempio, è sovraespressa nei carcinomi della prostata, del colon e del seno, la HDAC 2 in quelli gastrici, coloretali e della cervice e la HDAC 6 in alcuni tumori del seno. D'altro canto, sono state rilevate mutazioni a carico delle HDAC 2 in campioni di cellule tumorali con conseguente silenziamento dell'espressione e dell'attività della deacetilasi: tali risultati, che farebbero pensare ad una funzione di soppressore tumorale, appaiono essere in contrasto con larga parte dei lavori riportati. Al momento attuale, la natura della relazione che intercorre tra espressioni aberranti delle varie HDAC e insorgenza del cancro è puramente correlativa, nonostante esistano una serie di evidenze sperimentali a supporto della tesi per cui un aumento di attività delle deacetilasi sarebbe coinvolto nella carcinogenesi; tra queste, l'apoptosi indotta tramite knock-down delle HDAC 2 e l'inibizione della crescita causata dal knock-down delle HDAC 1 e 3 in cellule di cancro della cervice.²⁶

Nonostante gran parte dell'attenzione sia focalizzata sulle classi I, II e IV, anche le sirtuine sembrano ricoprire un ruolo importante per quel che concerne l'insorgenza e la progressione del tumore: si ritiene che oltre ad essere coinvolte nella regolazione della senescenza cellulare, nella riparazione del DNA, nella progressione cellulare e nell'attività trascrizionale di diverse importanti proteine, una deregolamentazione della loro espressione possa avere una funzione oncogenica. A sostegno di ciò, alcuni lavori hanno riscontrato sovraespressione delle sirtuine SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7 in una serie di tumori,^{27,28} mentre la SIRT1 pare essere direttamente implicata nei processi di sviluppo della patologia, come dimostrato dalla riattivazione di geni oncosoppressori a seguito di inibizione farmacologica di tale enzima. Ancora una volta, però, esistono studi contrastanti: la riespressione di SIRT2 in linee cellulari di glioma (in cui erano state abolite) ne riduce la capacità clonogenica.²⁹ Come per le altre classi di HDAC, non si riesce, ad oggi, a stabilirne l'esatta funzione nell'ambito dell'oncogenesi, ma si può senza dubbio affermare che un'alterata espressione delle sirtuine è da tenere in forte considerazione nella valutazione dei target per gli interventi terapeutici.

1.4 Inibitori di istone deacetilasi

L'indubbia centralità del ruolo ricoperto dalle HAT e HDAC nell'oncogenesi ha stimolato numerosi studi rivolti in tal senso; sono stati sviluppati ed analizzati una serie di inibitori delle HDAC (HDACi), in particolare per le classi I, II e III (SIRTi): si tratta di composti in grado di espletare una funzione antitumorale attraverso una serie di effetti biologici quali induzione di apoptosi, arresto del ciclo cellulare, inibizione della crescita e soppressione di angiogenesi e metastasi.³⁰ Gli HDACi hanno inoltre manifestato una maggiore specificità verso le cellule alterate rispetto a quelle normali, anche nel caso di cellule non proliferanti (come dimostrato in uno studio del 2010 effettuato su linee cellulari di leucemia³¹): quest'ultimo aspetto è di fondamentale importanza e li differenzia da altri agenti anticancro, dal momento che proprio la persistenza di tali cellule comporta il rischio di ricaduta dopo l'interruzione della terapia.

Le prime scoperte riguardavano l'abilità mostrata dagli HDACi nell'induzione della differenziazione cellulare,³² effetto associato alla capacità di provocare arresto del ciclo cellulare nelle fasi G₁ e/o G₂ e di conseguenza inibire la crescita (**Fig. 1.3**). L'arresto in G₁ sarebbe infatti da attribuire all'espressione di un gene, CDKN1A, che codifica per l'inibitore di chinasi dipendente da ciclina (CKI) WAF1, meglio noto come p21.³³ Le chinasi costituiscono l'organo di controllo del ciclo cellulare e svolgono la loro funzione a livello dei due checkpoint posti presso le transizioni G₁/S e G₂/M; esse si occupano di mantenere attivo il regolare avanzamento del ciclo grazie ad una particolare classe di proteine, le cicline, così chiamate a causa della variazione ciclica della loro concentrazione durante il ciclo cellulare. L'espressione di un gene che inibisce una chinasi indotta dalla somministrazione di HDACi, dunque, induce, indirettamente, arresto del ciclo cellulare. Successivamente, sono stati approfonditi gli aspetti antiangiogenici e antimetastatici degli HDACi: l'inibizione della vascolarizzazione risulterebbe essere la conseguenza della ridotta espressione di geni proangiogenici quali il fattore di crescita vascolare endoteliale; l'effetto di tale capacità è l'interruzione dell'afflusso ematico al tumore, che naturalmente ne impedisce lo spread metastatico. Non solo, in seguito a trattamento con HDACi sono stati registrati up-regolazione di geni soppressori di metastasi e down-regolazione di geni che la promuovono.¹⁶

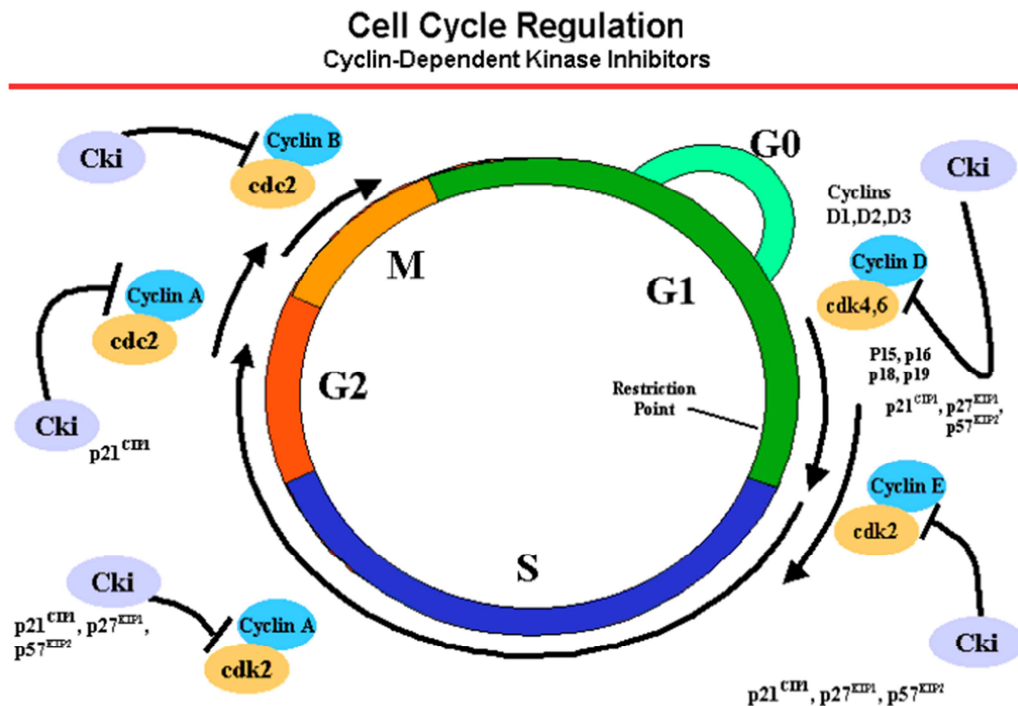


Fig. 1.3: Ciclo cellulare e cicline³⁴

Di considerevole importanza è infine la valutazione degli effetti indiretti degli HDACi: essendo infatti gli istoni solo uno dei target delle HDAC, è evidente la necessità di tenere conto di tutti gli altri substrati coinvolti. E' stato osservato che lo stato di acetilazione di varie proteine non istoniche varia in funzione dell'espressione delle HDAC; tra queste, alcuni fattori di trascrizione quali p53 e E2F1 coinvolti nella carcinogenesi, ma anche proteine che regolano la riparazione del DNA o chaperon come la Hsp90 (deacetilata da HDAC6), che in seguito ad acetilazione rilascia oncoproteine "clienti" che vanno quindi incontro a degradazione.²³

Sono note ad oggi sette classi di HDACi, tra queste, costituiscono oggetto di studi clinici gli acidi idrossammici, i peptidi ciclici, gli acidi grassi a corta catena e le benzammidi:

- Acidi idrossammici:

in questa categoria rientra il primo HDACi approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) per il trattamento di un particolare linfoma cutaneo, il Vorinostat (meglio noto con l'abbreviazione SAHA), ritenuto in grado di inibire indistintamente ogni HDAC zinco-dipendente ma in realtà avente solo deboli effetti sugli enzimi appartenenti alla classe IIa;³⁵ accanto ad esso, sono in fase di sviluppo il Belinostat (IC₅₀ nell'ordine del micromolare, induce acetilazione di H4), il Panobinostat (effetti su H3 e H4 e maggiore attività inibitrice) ed il Dacinostat (IC₅₀ pari a 0,15 μM).¹⁶

- Peptidi ciclici:

il Romidepsin (secondo HDACi ad essere stato approvato) è un peptide ciclico di origine naturale, isolato dal *Chromobacterium violaceum*, che tramite riduzione cellulare passa alla forma attiva, un ditiolo; risulta essere attivo su una serie di linee cellulari tumorali diverse e specifico nei confronti delle HDAC di classe I.¹⁶

- Acidi grassi a corta catena:

il primo acido ad essere stato sottoposto ad analisi è stato il valproico, da tempo utilizzato come antiepilettico e successivamente testato anche come antileucemico visti i blandi effetti collaterali evidenziati, che ha però manifestato bassa potenza inibitrice;³⁶ in seguito sono stati studiati anche l'acido butirrico ed il fenilbutirrato, ma con scarsi risultati.

- Benzammidi (o amminoanilidi):

il meccanismo d'azione delle benzammidi è stato a lungo oggetto di controversie, tuttavia, ad oggi, è stato mostrato che il gruppo ammino-anilidico agisce da chelante per lo zinco;³⁷ tra questi composti troviamo l'Entinostat (IC₅₀ di 2 µM), specifico per gli HDAC della I classe, induce acetilazione di H4 e causa arresto cellulare in diversi tumori,³⁸ e il Mocetinostat (IC₅₀ nell'ordine del submicromolare), con risultati positivi nell'ambito dell'induzione apoptotica e dell'attività antiproliferativa.³⁹

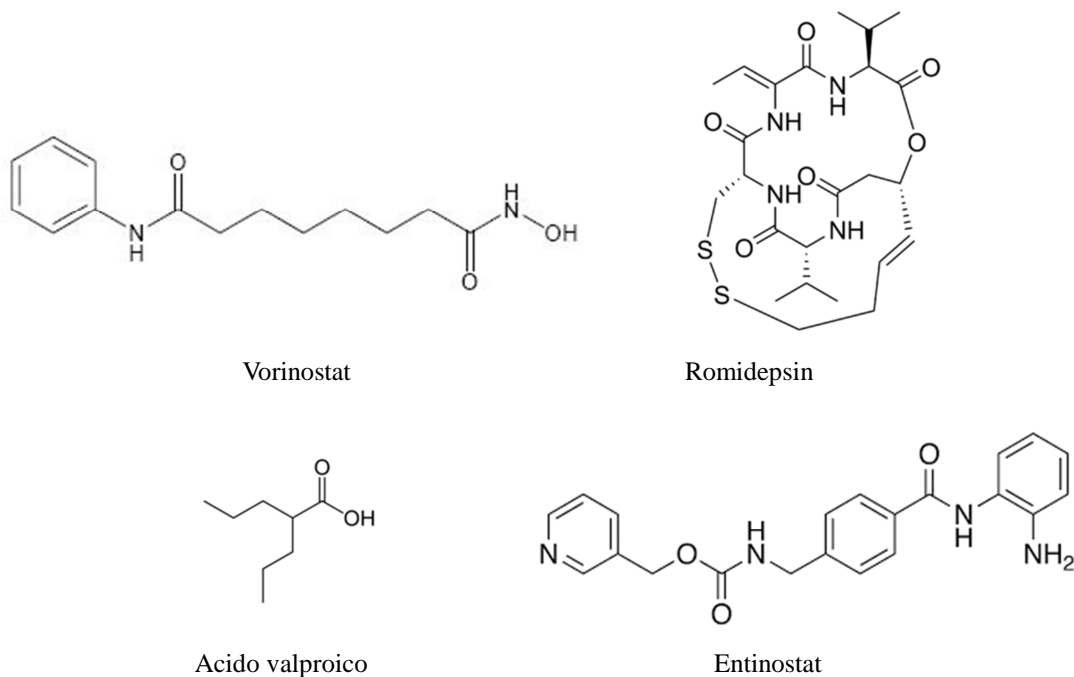


Fig. 1.4: Esempi di HDACi

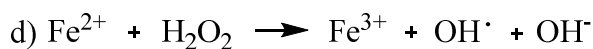
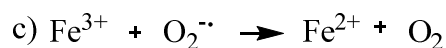
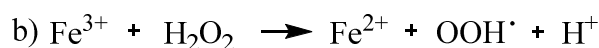
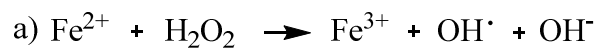
Attività biologica dell'acido idrossistearico

1.5 Stress ossidativo: perossidazione lipidica e cancro

Tra le numerose specie citotossiche note, quelle reattive dell'ossigeno (ROS) hanno ricevuto grande attenzione a causa delle importanti implicazioni biologiche manifestate.⁴⁰

I ROS sono radicali liberi contenenti ossigeno presenti all'interno dell'organismo principalmente in quanto sottoprodotti del normale metabolismo ossidativo.

La produzione dei ROS avviene nell'ambito della fosforilazione ossidativa, il meccanismo attraverso il quale l'ossigeno molecolare viene ridotto ad acqua secondo un procedimento che permette di sintetizzare, tramite fosforilazione di ADP, molecole di ATP che fungono da riserve di energia alle quali la cellula attinge per poter esplicare le proprie funzioni vitali. Durante il processo di trasporto degli elettroni vengono normalmente trasferite all'ossigeno due cariche negative, tuttavia può accadere, talvolta, che esso ne riceva solo una: in tal caso si genera una specie radicalica, l'anione superossido O_2^- . È stato osservato che una quantità compresa tra il 4% e il 5% dell'ossigeno molecolare viene convertita in una delle specie reattive all'ossigeno, tra queste la principale è appunto l'anione superossido. Il radicale generato può successivamente subire dismutazione ad opera dell'enzima antiossidante superossidodismutasi (SOD), che lo rende inattivo grazie alla conversione in perossido di idrogeno; tale specie, d'altra parte, non è completamente innocua: pur non essendo essa stessa un radicale, può generarne per reazione con uno ione metallico, in particolare il ferro (reazione di Fenton) oppure con un anione superossido (reazione di Haber-Weiss), in entrambi i casi viene prodotto un radicale idrossile, il ROS più dannoso per la cellula poiché in grado di penetrare attraverso la membrana (**Schema 1.5**).⁴¹



Schema 1.5: Reazioni di fenton (a e b) e ciclo catalitico di Haber-Weiss in due step (c e d)

Altre fonti endogene di specie reattive all'ossigeno sono il metabolismo del citocromo P450, un enzima appartenente alla famiglia delle ossidasi che opera su diversi substrati all'interno del reticolo endoplasmatico; i perossisomi, organelli cellulari contenenti enzimi in grado di prelevare idrogeno da diversi substrati e legarlo all'ossigeno al fine di formare H_2O_2 . Con riferimento alle fonti esogene, d'altra parte, è stato osservato che composti clorurati, radiazioni, ioni metallici possono condurre, direttamente o indirettamente, alla formazione di specie reattive all'ossigeno ed indurre stress ossidativo.⁴⁰

Il controllo della stabilità in relazione alla presenza dei ROS all'interno della cellula è affidato alle specie antiossidanti, le quali, in condizioni fisiologiche normali, riescono a rendere inattivi i radicali liberi. Tra gli enzimi che rivestono tale funzione, i più studiati sono il sopraccitato superossidodismutasi e due perossidasi, catalasi (localizzata nei perossisomi) e glutazione (presente nel citosol e nei mitocondri), il cui substrato principale è appunto il perossido di idrogeno. Esistono poi diverse molecole non enzimatiche in grado di svolgere una funzione antiossidante, le più note sono sicuramente la vitamina E, vitamina C, β -carotene e coenzima Q. Gli studi riguardanti il contenuto in antiossidanti di tipo enzimatico in cellule tumorali hanno evidenziato che i mitocondri di queste ultime sono carenti in SOD, come dimostrato dall'assenza di H_2O_2 ; in particolare, si osserva nei tumori a velocità di crescita elevata e poco differenziata un livello di protezione molto più basso nei confronti dei radicali liberi. Varie linee cellulari maligne hanno poi presentato livelli di glutazione inferiori, anche in questo caso in maniera inversamente correlata alla velocità di crescita dell'epatoma, ed anche per la catalasi è stato registrato lo stesso trend, con una diminuzione del numero di perossisomi in cellule tumorali.^{40,42}

I potenziali target dei radicali liberi sono principalmente tre: una serie di proteine e di amminoacidi hanno mostrato modificazioni chimiche dovute a reazioni ossidative che possono tramutarsi in modificazioni strutturali e causare alterazioni funzionali, tuttavia i maggiori danni registrati sono quelli a carico dei lipidi di membrana. Le cellule possiedono infatti una membrana costituita in prevalenza di lipidi, in particolare fosfolipidi (viene infatti chiamata "bilayer fosfolipidico") e, in misura minore, colesterolo: tali composti sono passibili di perossidazione da parte dei ROS, per cui si parla di perossidazione lipidica.⁴⁰

Numerosi studi sono stati effettuati sulle membrane di cellule tumorali, nell'ambito dei quali sono state analizzate principalmente composizione e risposta alla perossidazione: i

1 Introduzione

primi lavori hanno evidenziato una caratteristica comune a tutte le linee cellulari tumorali, ossia la resistenza a fattori perossidanti. Inizialmente è stato analizzato il comportamento di membrane subcellulari, in particolare mitocondriali: in seguito alla somministrazione di sistemi in grado di generare ossi-radicali si è osservato, in tutti i casi, un aumento del quantitativo di agenti antiossidanti esogeni quali vitamina E, β -carotene o ubiquinone nelle membrane che quindi impedivano che la perossidazione avesse luogo. Questo fenomeno, inoltre, era molto più marcato in cellule meno differenziate e con velocità proliferativa maggiore, con una correlazione inversa tra attività proliferativa e perossidabilità. Successivamente si è passati alla valutazione del contenuto di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) all'interno della membrana: i microsomi di diversi epatomi hanno mostrato un contenuto in fosfolipidi inferiore rispetto alle cellule normali ed il rapporto tra acidi poliinsaturi e monoinsaturi risultava molto più basso. È stata quindi formulata l'ipotesi che il fattore limitante per la perossidazione fosse la disponibilità di residui PUFA, target dei radicali liberi: vari lavori effettuati su epatomi di Morris diversi (9618A, lento; 44, velocità intermedia; 3924°, veloce) hanno evidenziato come all'aumentare della velocità di crescita del tumore diminuisse il contenuto di fosfolipidi ed il grado di insaturazione, indipendentemente dallo stimolo proossidante impiegato.⁴² Tale comportamento è stato quindi valutato in relazione alle caratteristiche chimiche e fisiche della membrana: oltre alla composizione, la struttura delle membrane degli epatomi mostrava fluidità notevolmente ridotta e maggior grado di ordine, fenomeno riconducibile alla diminuzione del rapporto fosfolipidi/proteine e all'aumento del rapporto colesterolo/fosfolipidi, sia nelle membrane plasmatiche che in quelle intracellulari. Si è quindi formulata l'idea che le cellule tumorali fossero cellule nelle quali le membrane avessero già subito danni perossidativi: l'inibizione dei sistemi enzimatici antiossidanti superossidodismutasi e catalasi aumenta la tossicità dell'ossigeno e in seguito all'esposizione a radicali superossido sono state registrate caratteristiche chimiche e fisiche simili a quelle delle membrane di cellule alterate.⁴⁰

In seguito a tali evidenze, sono stati approfonditi gli effetti dei prodotti di perossidazione a livello cellulare: essendo tali composti presenti in misura inferiore nelle linee tumorali, si è ipotizzato che potessero giocare un ruolo nell'ambito del controllo della proliferazione cellulare. È stato dimostrato come tali composti riescano ad inibire la divisione cellulare agendo sulla sintesi del DNA, ed in particolare bloccando i gruppi SH delle DNA-polimerasi, per cui si delinea una funzione regolatrice della perossidazione lipidica nei confronti dell'attività mitotica, esplicitata attraverso i suoi prodotti.⁴¹

1.6 Acido idrossistearico

I prodotti derivanti dalla perossidazione lipidica sono stati isolati e analizzati in diverse linee cellulari tumorali; tra questi, è stata evidenziata la presenza di idroperossi- e idrossiderivati di PUFA, generati tramite meccanismi enzimatici o non enzimatici e che hanno mostrato capacità di influenzare la sintesi del DNA e la proliferazione. Gli studi sono stati quindi rivolti in maniera più specifica alla valutazione del contenuto endogeno di acido 9 e 10 idrossistearico (9-HSA e 10-HSA), dimostratosi sensibilmente inferiore in cellule alterate rispetto alle cellule normali; ciò ha fatto supporre che il composto potesse rivestire un qualche ruolo nell'ambito del controllo della crescita cellulare, per cui sono stati svolti una serie di saggi al fine di testarne gli effetti in seguito a somministrazione esogena *in vitro*. In linee cellulari di carcinoma polmonare di Lewis (C108) è stato registrato un calo nella proliferazione in seguito all'aggiunta di concentrazioni uguali o superiori a 50 μM di HSA e sono stati osservati effetti citotossici solo a concentrazioni pari a 100 μM , inoltre l'inibizione della proliferazione è risultata essere reversibile, come dimostrato in seguito alla rimozione dell'acido. Tramite confronto con le cellule di controllo, infine, è stato possibile definire l'aumento percentuale di cellule in fase G₂/M, per cui è stata avanzata l'ipotesi di un blocco della mitosi.⁴³ E' stato poi dimostrato come l'isomero con il gruppo ossidrilico in posizione 9 manifesti attività inibitrice maggiore, per cui ulteriori ricerche sono state svolte al fine di risalire al meccanismo d'azione dell'HSA.⁴⁴ Le analisi effettuate su linee di carcinoma del colon umano HT29 hanno mostrato come il target principale del composto sia l'istone deacetilasi 1, la cui attività *in vitro* è risultata essere inibita del 66.4% circa al momento in cui la concentrazione nucleare di HSA era massima; tali dati sono correlabili con l'induzione dell'espressione del gene p21, che provoca, come già osservato, arresto del ciclo cellulare. Uno studio del 2012 ha infine approfondito i diversi effetti dei due enantiomeri (*R*)-9-HSA e (*S*)-9-HSA e ha investigato nel dettaglio l'attività biologica dei composti, utilizzando ancora una volta cellule HT29. I saggi hanno evidenziato nuovamente un incremento del livello di acetilazione dell'istone H4 e della trascrizione della proteina p21, contestualmente ad un decremento dell'espressione della ciclina D1; inoltre, l'enantiomero (*R*) ha prodotto una migliore interazione con il sito catalitico dell'HDAC1, dimostrandosi quindi più efficiente nell'inibizione dell'enzima, come anche nel blocco dell'attività di HDAC2 e HDAC3. Tramite la tecnica della citometria a flusso, poi, è stata identificata la fase del

ciclo cellulare in cui avviene l'arresto della crescita indotto dall'HSA: entrambi hanno provocato un blocco in fase G_0/G_1 e un decremento del numero di cellule in fase S.⁴⁵

Benzotiazoli: sintesi e applicazioni biologiche

1.7 Introduzione

I benzotiazoli rappresentano una classe di eterocicli che ha ricevuto grande attenzione nel mondo della ricerca grazie alle numerose attività biologiche dimostrate. Si tratta di basi deboli costituite da due anelli legati insieme attraverso le posizioni 4 e 5 del tiazolo (la numerazione nel tiazolo inizia dall'atomo di zolfo); quest'ultimo è strutturalmente riconducibile al tiofene e alla piridina, ma ha mostrato possedere proprietà simili perlopiù a quest'ultima (**Fig. 1.6**).

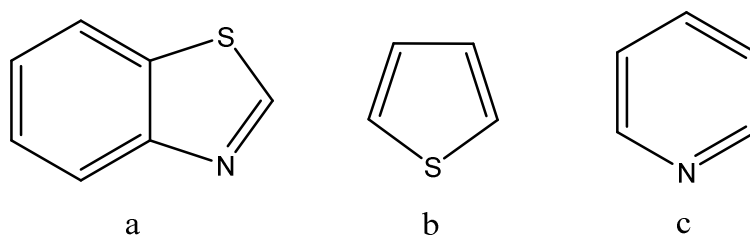


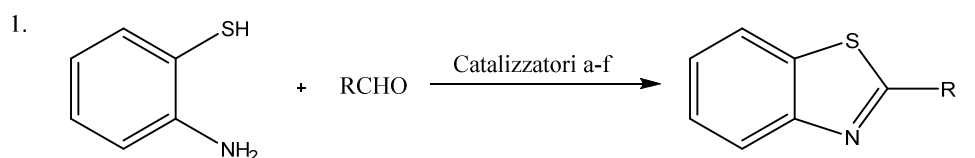
Fig. 1.6: Benzotiazolo (a), tiofene (b) e piridina (c)

Esistono in letteratura ampi riferimenti all'importanza in ambito medico e biologico di composti eterociclici; tra questi, i benzotiazoli si sono rivelati efficaci antimicrobici, antitumorali, antidiabetici, antielmintici, antiinfiammatori, anticonvulsivi, antipsicotici, diuretici e antiossidanti. Negli anni '50 sono stati studiati in maniera approfondita i 2-amminobenzotiazoli, che hanno evidenziato proprietà citotossiche nei confronti di cellule cancerose e sono stati analizzati in quanto rilassanti dei muscoli centrali. La combinazione di 2-amminobenzotiazoli con altri eterocicli, d'altra parte, è ormai un riferimento per quanto riguarda il design di nuove molecole di interesse farmaceutico: un esempio è rappresentato dai 2-(4-amminofenil) benzotiazoli, una classe di agenti antitumorali selettivi. Negli ultimi anni, infine, è stata confermata l'attività antimicrobica dei benzotiazoli e dei loro bioisosteri, sia nei confronti di batteri Gram-negativi che di batteri Gram-positivi.⁴⁶

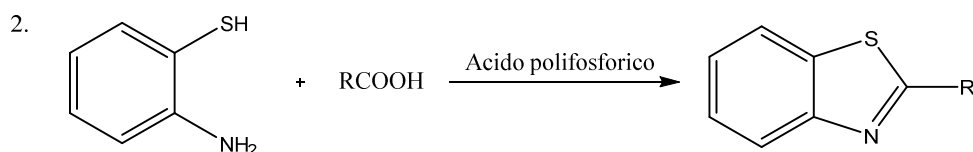
A causa delle diverse funzioni che i derivati benzotiazolici sono in grado di espletare in numerosi ambiti, nel corso degli anni sono state sviluppate una serie di procedure sintetiche che prevedono, tra le altre, condensazione tra aldeidi, acidi carbossilici, cloruri acilici o nitrili e *o*-amminotiofenoli (uno dei metodi più utilizzati per la sintesi di benzotiazoli sostituiti in posizione 2), ma esistono anche diversi metodi basati su ciclizzazioni o coupling tra aromatici e sintesi a partire da aniline.

1.8 Principali metodi di sintesi di benzotiazoli

Il metodo classico sviluppato per la sintesi di derivati benzotiazolici prevede la condensazione tra *o*-amminotiofenoli e aldeidi, e permette di ottenere benzotiazoli 2-sostituiti con diversi catalizzatori e in diverse condizioni di reazione; tra le diverse possibilità, è stata studiata la reazione in microonde senza solvente con P₄S₁₀ quale catalizzatore che ha portato a buoni risultati in termini di resa e tempi di reazione (3-4 minuti).⁴⁶ Il trattamento dello stesso substrato con acidi carbossilici in presenza di acido polifosforico conduce anch'esso a condensazione con formazione di benzotiazoli in rese piuttosto elevate ed è il principale metodo di sintesi di composti aventi sostituenti arilici in posizione 2.

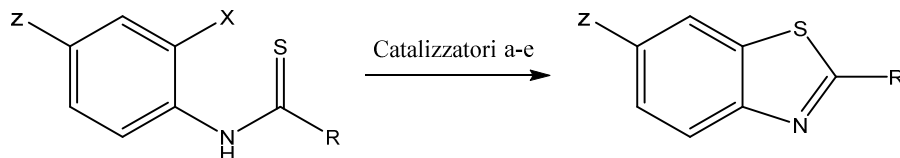


- a. Montmorillonite, SiO₂/Grafite/; microonde, ps-TsOH
- b. Dietil bromofosfonato/ *tert*-Butil ipoclorito; acetoneitrile
- c. Ammonio nitrato di Cerio (IV)
- d. H₂O₂/HCl in etanolo
- e. AcOH/Aria; Microonde/Calore
- f. Lievito di birra, diclorometano



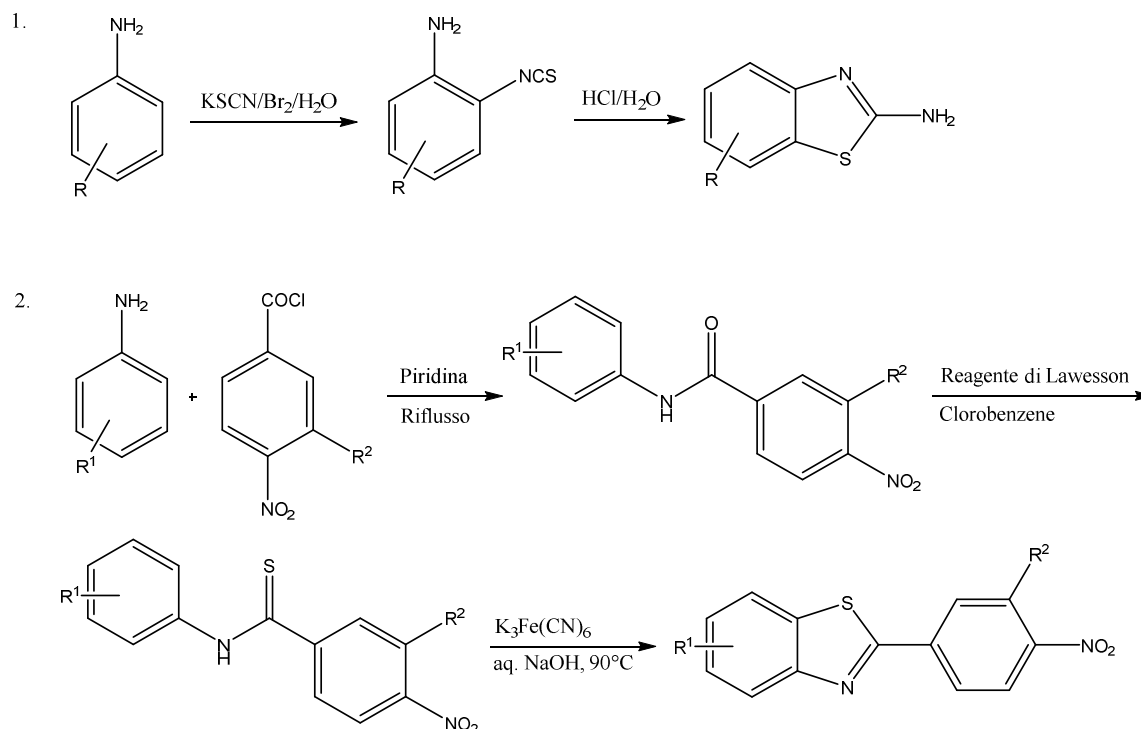
1 Introduzione

La sintesi di benzotiazoli 2-sostituiti può inoltre essere effettuata attraverso la ciclizzazione di tioformanilidi, realizzata in seguito alla formazione di un legame intramolecolare C-S.

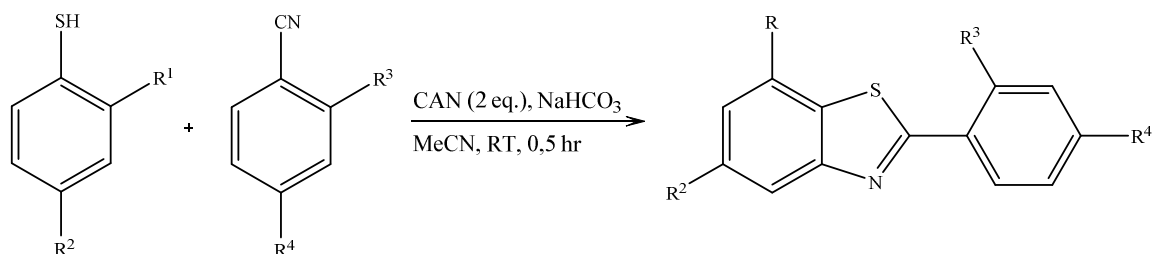


- a. CuI; 1,10-Fenantrolina, CS_2CO_3 , refluxo
- b. Manganese triacetato
- c. CS_2CO_3 , diossano
- d. Ciclizzazione fotochimica indotta da cloranile
- e. $\text{Pd}/(\text{PPh}_3)_4/\text{MnO}_2$ in atmosfera di ossigeno

Un'altra importante procedura è quella che coinvolge la presenza di aniline variamente sostituite, trattate con KSCN in presenza di acido acetico glaciale (3); una particolare variante del metodo permette di sintetizzare benzotiazoli arilici per reazione con nitrobenzoyl cloruro in piridina a refluxo, successivo trattamento con reagente di Lawesson ed infine ciclizzazione radicalica di Jacobsen tramite potassio ferrocianuro (4).



Esistono infine processi che passano attraverso coupling tra tiofenoli sostituiti e nitrili aromatici in presenza di nitrato cerico ammonico per la sintesi di arilbenzotiazoli e conducono ad eccellenti rese.⁴⁷



1.9 Attività biologica di derivati benzotiazolici e indolici

I derivati benzotiazolici manifestano attività biologica in una serie di differenti ambiti: le proprietà di tali composti sono note da diversi anni e sono tutt'oggi oggetto di numerose ricerche.

L'attività antimicrobica dei benzotiazoli è stata indagata attraverso vari approcci e su numerosi microrganismi, tra cui funghi e batteri. I pirimido [2,1-b] benzotiazoli (variamente sostituiti) sono risultati attivi nei confronti di batteri quali *E. coli* e *Enterobacter*; diversi benzotiazoli 2-sostituiti, contenenti anche un gruppo 5-mercapto-1,3,4-triazolico, sono stati testati come antibatterici su *E. coli* e *S. aureus* e su funghi quali *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e hanno fornito buoni risultati. Una serie di composti contenenti un atomo di cloro in posizione 6 o 7 sono stati sintetizzati ed esaminati quali inibitori di vari batteri, tra cui *B. subtilis*, *S. typhi*, *E. coli* e *S. aureus*. Anche composti con strutture meno complesse come 2-amminobenzotiazoli sostituiti in vario modo hanno rivelato attività antifungina *in vitro*, su ceppi quali *C. albicans*, *A. niger* e *A. flavus*.⁴⁷

Negli ultimi anni sono state studiate le proprietà antinfiammatorie di derivati 2-amminobenzotiazolici, ed in particolare è stato osservato che in presenza di sostituenti elettronattrattori quali Cl, NO₂ o OCH₃ in posizione 4 o 5 l'efficacia aumentava. Sono stati inoltre testati dei benzotiazoli O-sostituiti in posizione 4, che hanno mostrato una forte capacità inibitoria nei confronti del recettore B₂ della bradichinina, un neurotrasmettitore peptidico la cui eccessiva concentrazione causa i tipici sintomi dell'infiammazione.

1 Introduzione

Numerosi derivati sono stati valutati come anticonvulsivanti e molti sono risultati attivi su convulsioni derivanti da elettroshock o indotte da un analettico, il pentilentetrazolo (PTZ). Una serie di 1,3-benzotiazol-2-il benzammidi è stata analizzata, rivelando che alcuni composti sono attivi e non neurotossici o epatotossici; in particolare, composti con gruppi quali F, CH₃ o OCH₃ in posizione 6 hanno evidenziato maggiore efficienza durante i test.⁴⁷

Esistono infine diversi studi relativi all'attività antitumorale manifestata da substrati benzotiazolici, con test biologici effettuati su cellule tumorali di vario tipo. Tra i composti analizzati, è stato trovato che i derivati 2-(4-amminofenil)benzotiazolici sono particolarmente potenti nell'inibizione della topoisomerasi di tipo 2, con la massima attività riportata dal 2-(3-ammino-4-fenil)benzotiazolo. Sono stati inoltre sintetizzati degli analoghi fluorurati che si sono rivelati attivi su diverse linee cellulari: il 2-(3,4-dimetossifenil)-5-fluorobenzotiazolo possiede una eccellente capacità di inibire la proliferazione; in generale, è stato osservato che complessi di questo tipo contenenti più di un alogeno possiedono citotossicità nei confronti di cellule cancerogene. Derivati chinolinici sostituiti con residui benzotiazolici hanno riportato buoni risultati nell'attività su cellule di cancro del colon e del seno.⁴⁸

L'utilizzo di composti contenenti residui benzotiazolici in ambito biomedico è oggetto tutt'oggi di ricerca, con studi su substrati di tipo diverso; oltre alle attività sopraccitate, tali prodotti hanno mostrato di essere efficaci antidiabetici, antielmintici, antitubercolari, antileishmaniotici.⁴⁷

Così come i derivati azolici, quali il tiazolo e i suoi benzocondensati, anche i derivati indolici rivestono una fondamentale importanza in campo biologico; molti composti contenenti il nucleo indolico hanno infatti mostrato, a seconda della loro struttura, attività biologica di diverso tipo, come ad esempio attività antinfiammatoria, analgesica, antifungina, antimicrobica e antitumorale.⁴⁹

2. Risultati e discussione

I nuovi composti sintetizzati nell'ambito di questo lavoro di tesi mantengono una parte della struttura iniziale dell'acido 9-idrossistearico, ed in particolare la sezione della catena alifatica che va dalla funzionalità acida terminale al C-8, ma si differenziano per la presenza di sostituenti eterociclici legati al C-9 quali derivati azolici e indolici. Alcuni dei prodotti di sintesi sono stati sottoposti a saggi cellulari presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna, su linee cellulari di tumore del colon umano (HT-29). I test hanno permesso, ove possibile, di determinare l'IC₅₀, ossia la dose necessaria all'inibizione del 50% delle cellule, e di valutare attraverso analisi microscopiche se effettivamente si sviluppasse una inibizione della proliferazione in seguito alla somministrazione dei composti. Successivamente, due derivati amminobenzotiazolici (**4a** e **7**) ed un derivato indolico (**12**) sono stati studiati attraverso calcoli di *docking* molecolare al fine di valutare se le deacetilasi istoniche rappresentassero un possibile target molecolare così come accade nel caso dell'acido 9-idrossistearico, e quindi fornire indicazioni per ulteriori studi *in vitro*. Infine, alcuni composti sono stati testati, presso lo stesso Dipartimento, su microrganismi batterici e specie fungine. Di seguito è riportata la descrizione dei risultati ottenuti e la loro discussione, suddivise in sezioni relative all'aspetto sintetico e a quello biologico.

Procedure sintetiche

2.1 Sintesi di derivati tiazolici, tiadiazolici e benzotiazolici

La modificazione strutturale dell'acido 9-idrossistearico è stata progettata a livello della posizione C-9, in modo da mantenere parte della catena metilenica e, soprattutto, la funzione acida o esterea, che costituirebbero, in base a quanto emerso da studi precedenti, elementi fondamentali per l'attività antiproliferativa del composto.⁴⁵ Si è quindi deciso di introdurre il residuo eterociclico attraverso la formazione di un legame ammidico in posizione C-9 rispetto al 9-idrossistearato di metile (**Fig. 2.1**).

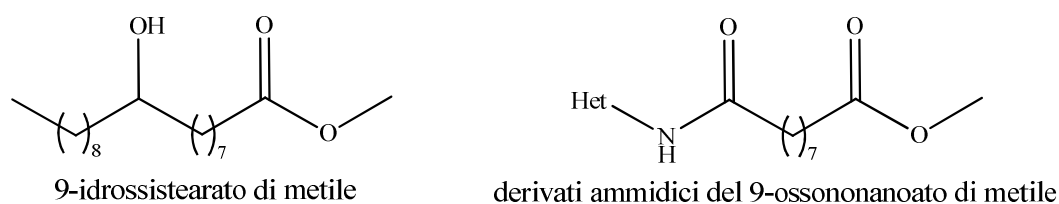
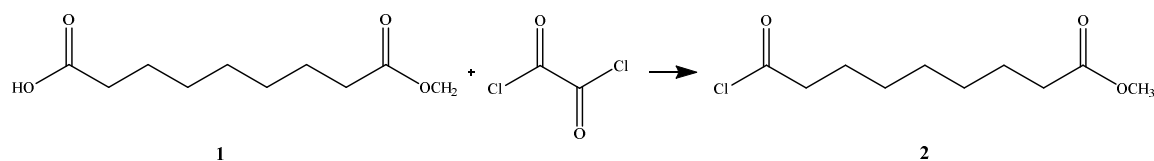


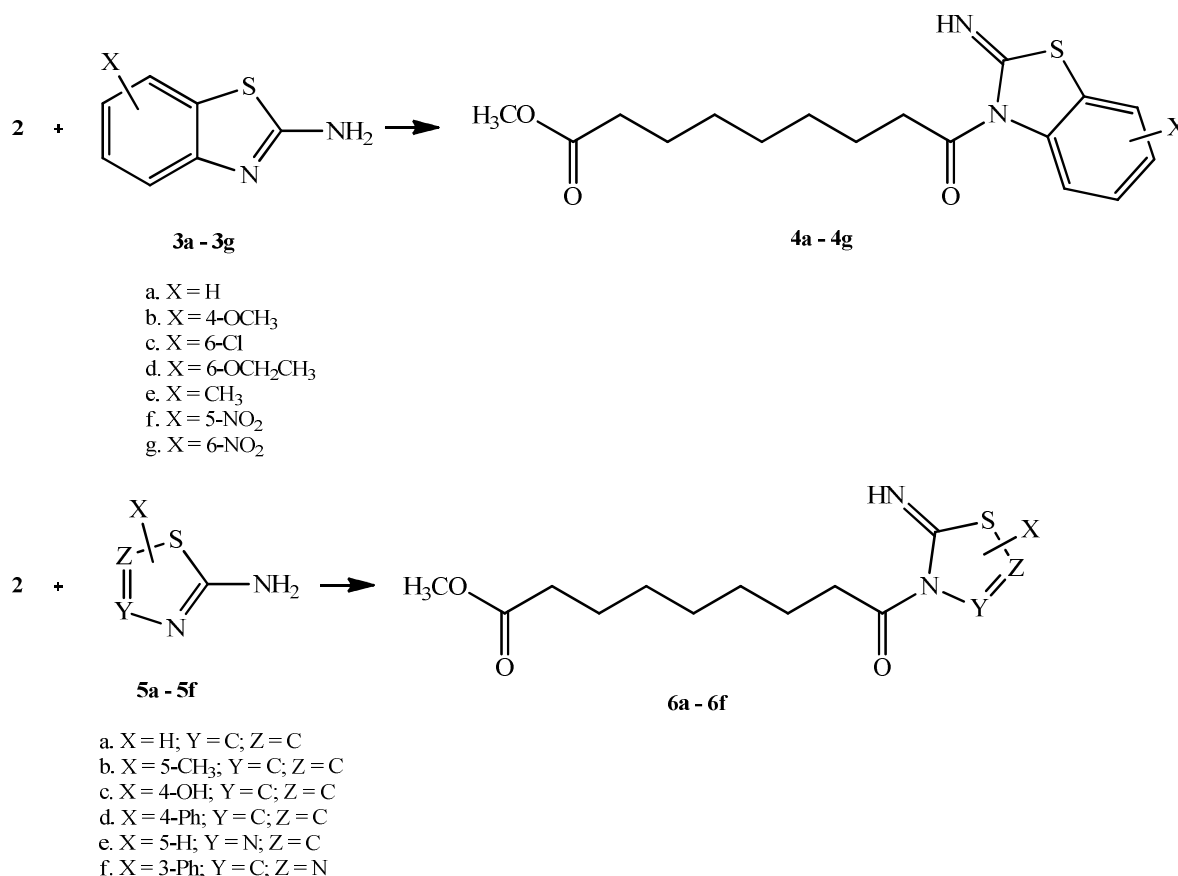
Fig. 2.1: Confronto tra le strutture dei composti sintetizzati e il 9-idrossistearato di metile

La sintesi dei derivati benzotiazolici, tiazolici e tiadiazolici è stata effettuata secondo una reazione tipo Schotten-Baumann che permette di ottenere una ammido a partire da un'ammina ed un cloruro acilico, in presenza di una base che neutralizzi il protone che si libera in seguito all'attacco nucleofilo al carbonio elettronepovero e alla successiva eliminazione del cloruro con ripristino della funzione acilica. Ciò ha richiesto uno step sintetico (**Schema 2.2**) per la preparazione del 9-cloro-9-ossnonanoato di metile ottenuto dal monometil estere dell'acido azelaico mediante reazione con cloruro di ossalile in CH_2Cl_2 anidro. L'avvenuta conversione del reagente è stata verificata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ del grezzo di reazione, che ha mostrato, come segnale diagnostico del prodotto, la comparsa di un tripletto relativo al gruppo metilenico adiacente alla funzione cloroacilica risonante a campo più basso rispetto a quello del composto di partenza.



Schema 2.2: Sintesi del cloruro acilico del monometilestere dell'acido azelaico

Il cloruro acilico è stato poi impiegato tal quale nelle reazioni con i derivati amminici scelti (**Schema 2.3**), condotte in ambiente anidro al fine di evitare l'idrolisi dello stesso; per tale motivo, il sistema è stato tenuto sotto battente di azoto per tutta la durata della reazione e come solvente è stato utilizzato, anche in questo caso, CH_2Cl_2 anidro, precedentemente distillato su anidride fosforica. I reagenti sono stati aggiunti in rapporto 1:2 (con il cloruro acilico in difetto), dal momento che i benzotiazoli e i tiazoli agivano anche da base per neutralizzare l'HCl che si formava *in situ*.



Schema 2.3: Reazione di Schotten-Baumann su 2-amminobenzotiazoli e 2-amminotiazoli

Una prima serie di prodotti è stata ottenuta utilizzando quali substrati i 2-amminobenzotiazoli **3a-f** contenenti sostituenti diversi sull'anello carbociclico. I prodotti sono stati purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice e caratterizzati attraverso spettrometria NMR al protone e al carbonio 13 e di massa.

I prodotti sono stati ottenuti con rese che variano dal 30 al 60%; in alcuni casi è stato recuperato, dopo *work-up*, il composto **1**, segno di una non completa reazione di **2** che potrebbe anche essere ascritta ad una sua parziale idrolisi prima della reazione con il

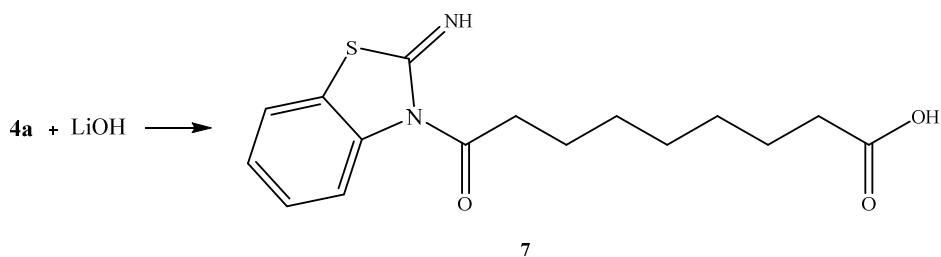
2. Risultati e discussione

substrato amminico. In questa fase, tuttavia, non ci si è focalizzati sulla messa a punto delle condizioni sperimentali per ottimizzare le rese, bensì sull'ottenimento di prodotti ad elevata purezza: lo stadio di purificazione, infatti, è stato condotto con estrema attenzione, dal momento che eventuali impurezze avrebbero potuto falsare i risultati dei saggi cui dovevano essere sottoposti i prodotti al fine di ricavare informazioni sulla loro attività biologica. Riguardo alle reazioni con i derivati benzotiazolici sostituiti in posizione 6 con i gruppi cloro, etossile e nitro (rispettivamente **3c**, **3d** e **3g**), è stato osservato che la resa più elevata è stata ottenuta con **3d**, mentre nel caso di **3g** (2-ammino-6-nitrobenzotiazolo) non è stata osservata alcuna conversione: questo, se pur in maniera qualitativa, può essere correlato con l'effetto del sostituente in posizione coniugata che può disattivare l'attacco al carbonio acilico ($\sigma_p = -0.25, +0.23, +0.78$ per OEt, Cl, NO₂, rispettivamente).⁵⁰

La reazione è stata provata, poi, sia con 2-mercaptobenzotiazolo che con il corrispondente tiolato: l'analisi spettroscopica ¹H-NMR della miscela di reazione ha evidenziato la presenza di segnali compatibili con la formazione di una esigua quantità di un prodotto, che non è stato possibile isolare.

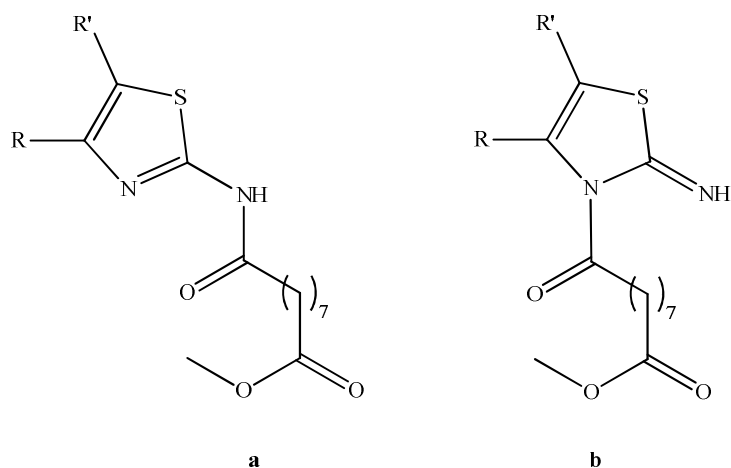
Al fine di ottenere indicazioni sull'effetto dell'anello carbociclico benzocondensato sull'attività biologica dei prodotti sono stati sintetizzati i composti **6a-f**. Le reazioni sono state condotte in maniera analoga a quelle con i 2-amminobenzotiazoli, e anche in questo caso i prodotti sono stati purificati per via cromatografica e caratterizzati spettroscopicamente.

Dal momento che, nell'ambito di studi passati, indagini condotte sull'attività biologica sia dell'acido 9-idrossistearico che del suo estere metilico avevano permesso di stabilire che entrambi possiedono attività antiproliferativa nei confronti di linee cellulari appartenenti a formazioni tumorali di origine umana (in particolare su cellule di adenocarcinoma del colon, HT29) ma con diverso target molecolare (come descritto nella sezione introduttiva), si è deciso di provare ad effettuare un analogo confronto fra il derivato estereo **4a** ed il corrispondente acido. A questo scopo, è stato necessario utilizzare una base in grado di idrolizzare selettivamente la funzione esterea senza agire su quella amidica: in seguito a trattamento con LiOH in miscela H₂O/MeOH è stato possibile ottenere (dopo neutralizzazione) il derivato **7** (**Schema 2.4**).



Schema 2.4: Idrolisi del derivato benzotiazolico non sostituito

Riguardo alla struttura dei composti **4** e **6**, è necessario fare alcune considerazioni: i reagenti **3a-f** e **4a-f**, essendo nucleofili bidentati, possono reagire sia all'azoto esociclico che a quello endociclico; in linea di principio, quindi, la reazione effettuata può dar luogo alla formazione di strutture diverse come **a** (e/o la sua forma tautomerica) e **b** (**Fig. 2.5**).

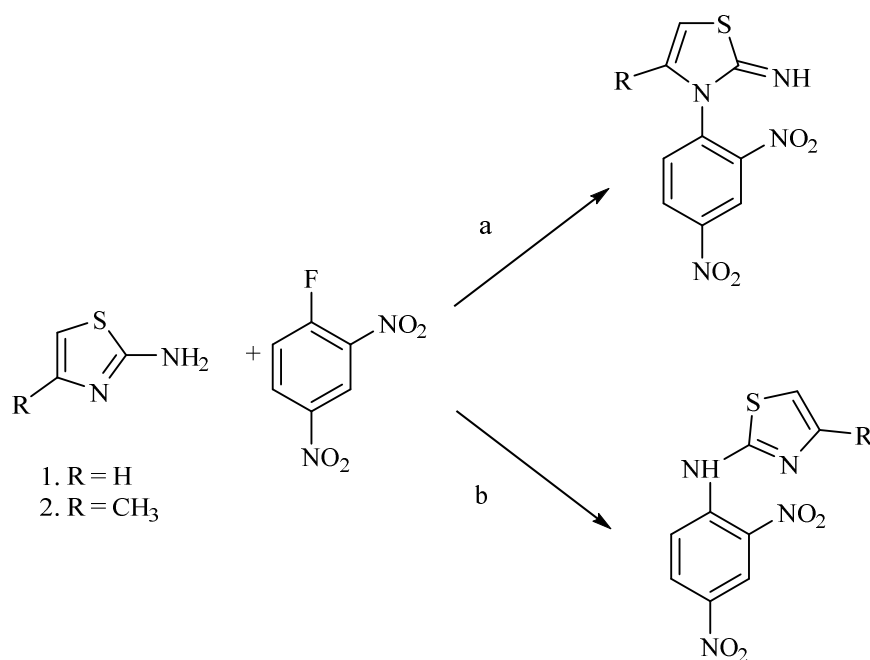


- I. R = R' = H
 II. R-R' = -CH=CH-CH=CH-

Fig. 2.5: Possibili strutture per i derivati **4** e **6**

In letteratura, ad esempio, è stato riportato che il 2-amminotiazolo ed il 4-metil-2-amminotiazolo agiscono come nucleofili bidentati verso il 2,4-dinitrofluorobenzene in dimetilsolfossido (**Schema 2.6**). In particolare, in assenza di ingombro sterico l'atomo di azoto endociclico del 2-amminotiazolo è il sito reattivo preferito nella reazione di sostituzione nucleofila aromatica (via a), mentre quando l'approccio dell'elettrofilo è stericamente impedito (come nel caso del 4-metil-2-amminotiazolo), la reazione avviene all'azoto amminico endociclico (via b).⁵¹

2. Risultati e discussione



Schema 2.6. Reazioni fra 2-amminotiazoli e 2,4-dinitrofluorobenzene

Di recente, inoltre, è stato riportato che il 2-amminobenzotiazolo reagisce con 2-((4-cloro-6-metilpirimidin-2-iltio)metil)benzotiazolo all'ammino gruppo esociclico,⁵² mentre con glicidilfenil etere la reazione avviene sia all'azoto esociclico che a quello endociclico, dando un diaddotto.⁵³ Alcuni tra gli ultimi risultati del gruppo di ricerca in cui è stato svolto questo lavoro di tesi hanno mostrato come derivati 2-amminobenzotiazolici con 7-cloro-4,6-dinitrobenzofurossano possano dare sia prodotti di mono attacco all'azoto esociclico che, ancora una volta, dei diaddotti, con rapporto relativo modulabile a seconda delle condizioni sperimentali (**Fig. 2.7**).⁵⁴

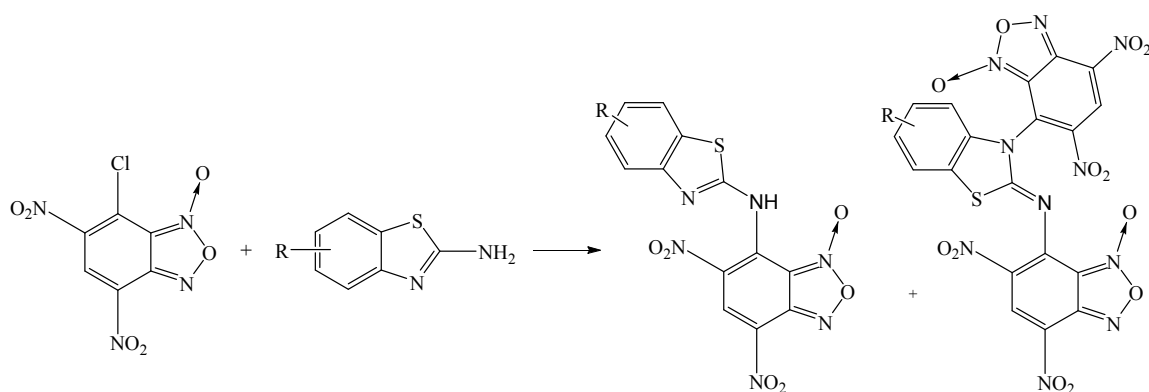


Fig. 2.7: Reazione tra 7-cloro-4,6-dinitrobenzofurossano e 2-amminobenzotiazoli

Considerate tali premesse non era da escludere la possibilità di ottenere diversi isomeri o addirittura più prodotti nelle reazioni fra **2** e **3a-g** o **5a-f**. Per tale motivo, la struttura dei composti ottenuti è stata accertata tramite NMR con esperimenti NOESY-1D, che hanno permesso di evidenziare come la reazione non avvenga ad opera dell'azoto amminico esterno ma di quello del ciclo tiazolico (**Fig. 2.8**).

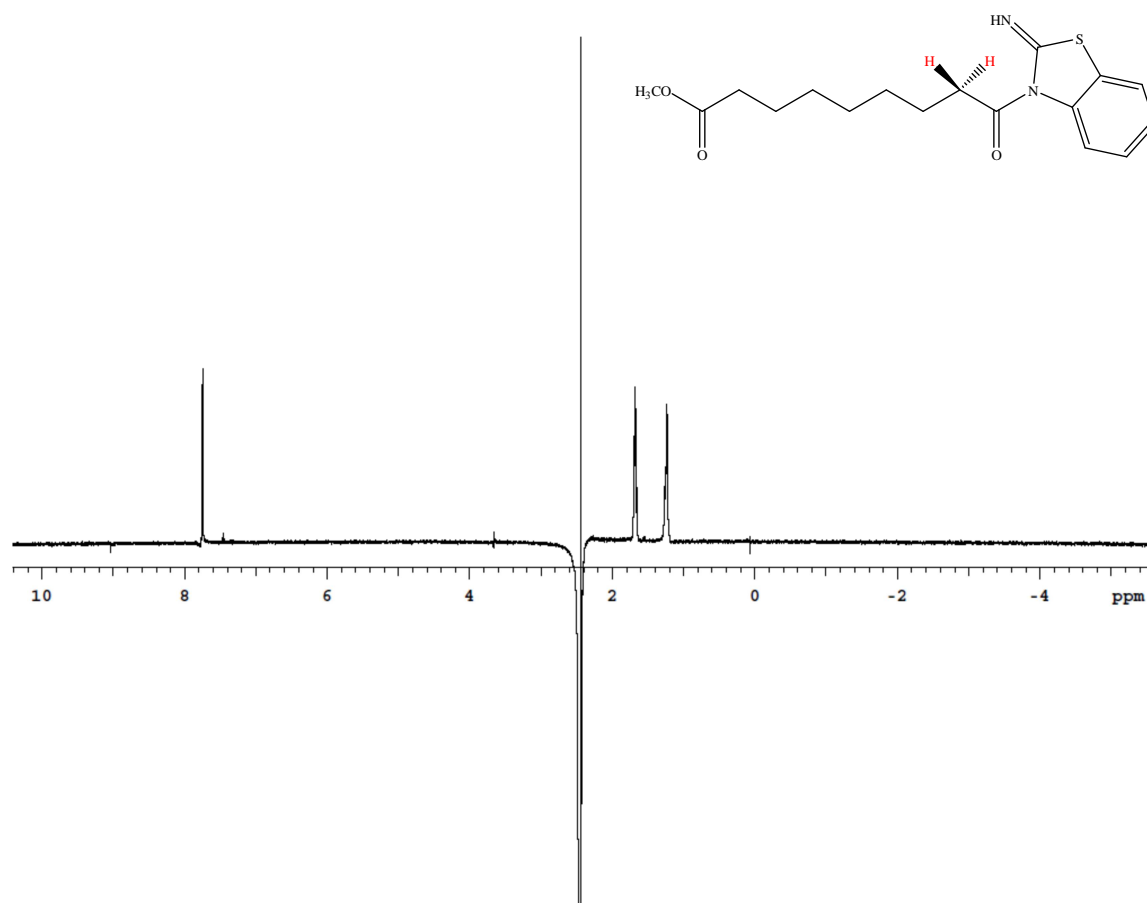
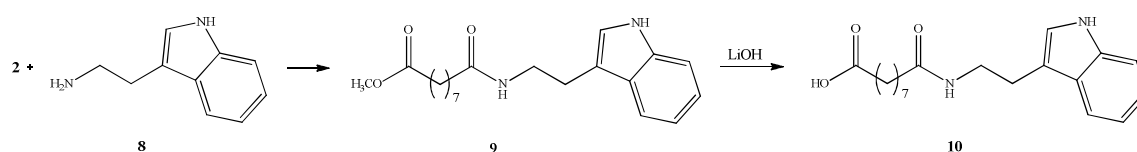


Fig. 2.8: NOESY-1D sul prodotto **4a**. In seguito ad irraggiamento del picco a 2.46 ppm relativo al CH₂ in alfa al gruppo ammidico, si vede effetto su uno dei protoni aromatici: se l'attacco fosse avvenuto sull'azoto esociclico, non ci sarebbe stato effetto sui protoni benzenici, troppo lontani.

2.2 Sintesi di derivati indolici

Poichè il nucleo indolico riveste una notevole importanza in una lunga serie di composti biologicamente attivi, è stata progettata anche la sintesi di alcuni derivati contenenti tale eterociclo.

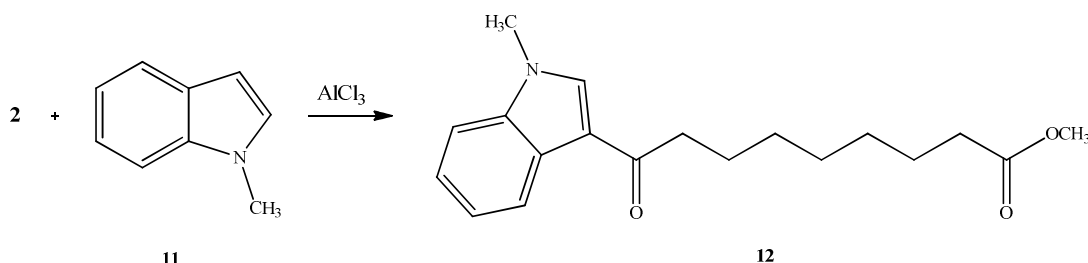
Il primo reagente preso in considerazione è stato la triptamina: la sintesi del suo derivato per reazione con il cloruro acilico **2** è stata condotta seguendo le stesse modalità adottate per gli amminobenzotiazoli (**Schema 2.9**).



Schema 2.9: Reazione di **2** con triptamina

La struttura del prodotto purificato è stata indagata, come al solito, tramite analisi spettroscopiche. Anche in questo caso si potevano ottenere due isomeri, ma la presenza, nello spettro $^1\text{H-NMR}$, di due segnali di singoletto distinti ed allargati che integrano ciascuno per un protone ascrivibili a due protoni mobili legati ai due atomi di azoto ha permesso di dedurre che l'attacco fosse avvenuto sull'atomo di azoto esociclico del reagente. Il prodotto, inoltre, è stato sottoposto ad idrolisi per trattamento con LiOH monoidrato⁵⁵ al fine di ottenere il corrispondente acido (composto **10**).

Un altro nuovo derivato è stato ottenuto per acilazione di Friedel-Crafts dell'*N*-metilindolo, che ha fornito il prodotto di acilazione **12**, come mostrato nello **Schema 2.10**:



Schema 2.10: Reazione con *N*-metil indolo

Sempre nell'ambito dei derivati indolici, si è deciso di preparare, a partire dall'indolo (**13**), i derivati **14**, **15** e **16** (Fig. 2.11), al fine di poterne in futuro valutare l'attività biologica ed eventualmente definire una relazione struttura-attività.

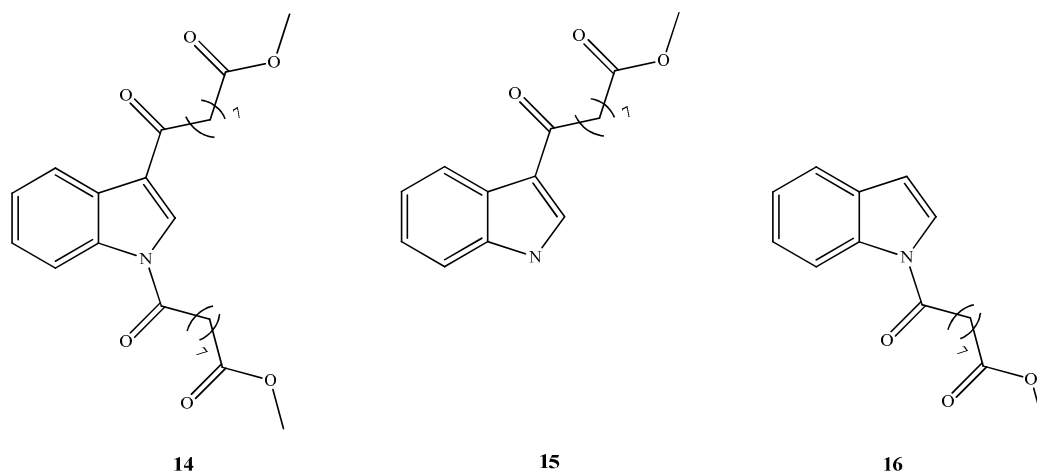
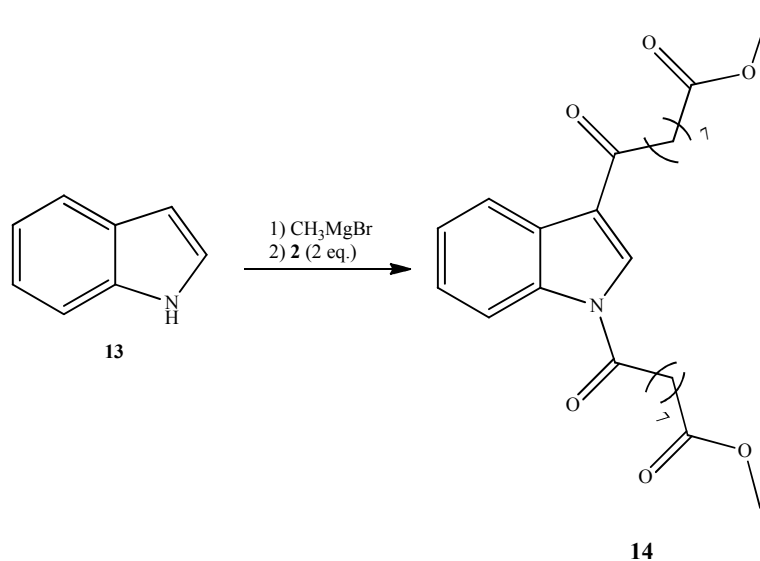


Fig 2.11: Derivati indolici ottenuti attraverso le reazioni tra **2** e **13**

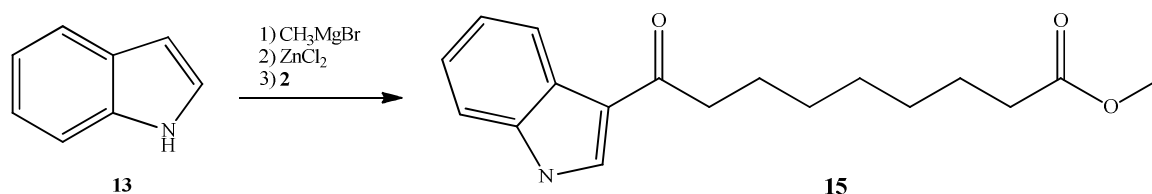
In letteratura è stato riportato che a partire da indoli, in seguito a metallazione con bromuri di metil magnesio e trattamento con un cloruro acilico, si può ottenere la formazione di diaddotti,⁵⁶ ciò ha suggerito di provare ad effettuare la reazione fra l'indolo ed il cloruro acilico **2**, aggiunto in eccesso al fine di creare condizioni tali da permettere il diattacco, che è in effetti avvenuto (Schema 2.12).



Schema 2.12: N e C-3 acilazione dell'indolo in presenza di un eccesso di **2**

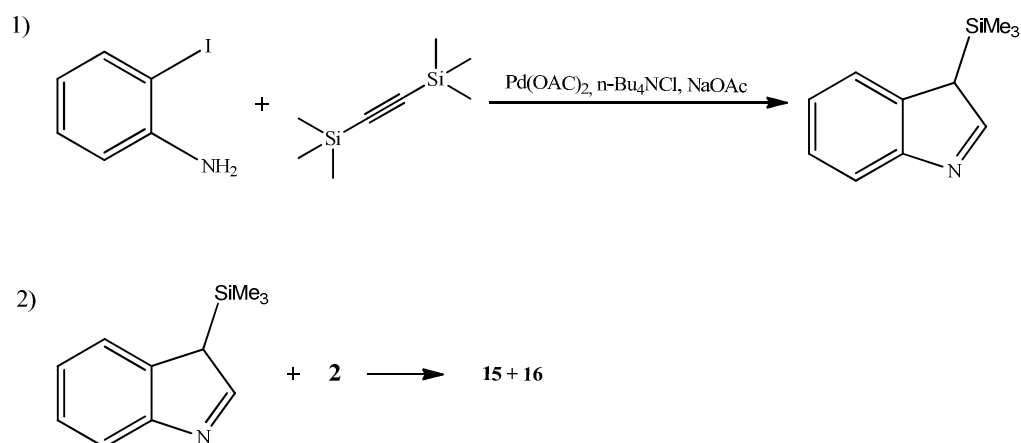
2. Risultati e discussione

La preparazione di **15** e **16** ha richiesto invece una serie di prove effettuate seguendo diverse procedure riportate per la preparazione di derivati indolici: è noto, da dati di letteratura,⁵⁷ che l'indolo subisce acilazione in posizione 3 con ottime rese se trattato dapprima con cloruro di dietilalluminio (Et_2AlCl) a 0 °C in diclorometano anidro e successivamente con cloruri acilici a corta catena; in questo caso, tuttavia, la reazione effettuata con il reagente **2** ha portato alla formazione del prodotto **15** con rese molto basse. L'ottenimento dello stesso è stato possibile seguendo una procedura riportata in letteratura che prevede un primo step in cui avviene la reazione fra l'indolo **13** e un reagente di Grignard (CH_3MgBr) seguito dalla successiva aggiunta di cloruro di zinco ed infine del cloruro acilico (**Schema 2.13**); il prodotto è stato caratterizzato e sottoposto ad analisi spettroscopica per la determinazione della struttura finale, la quale ha confermato che l'attacco è avvenuto sulla posizione 3 dell'indolo. E' stata anche effettuata la reazione di salificazione dell'indolo tramite idruro di sodio seguita da trattamento con **2** ma nelle condizioni utilizzate non è stata riscontrata formazione di **16**.



Schema 2.13: Sintesi del derivato di acilazione al carbonio

E' stato poi sintetizzato il 3-trimetilsililindolo per ciclizzazione fra 2-iodoanilina e bis(trimetilsilil)acetilene, secondo una procedura descritta in letteratura.⁵⁸ Al derivato sililato sintetizzato è stato quindi aggiunto il composto **2** in condizioni "solvent free"; la reazione è stata effettuata in un distillatore in modo da allontanare per distillazione il cloruro di trimetilsilile man mano che si formava (**Schema 2.14**). E' stata in tal modo ottenuta una miscela dei composti **15** e **16**, che sono stati separati mediante cromatografia su colonna di gel di silice.



Schema 2.14: Sintesi del 3-(trimetilsilil)-3*H*-indolo e successiva reazione con il cloruro acilico **2**

E' verosimile che le difficoltà riscontrate durante la sintesi del derivato 3-acilindolico siano dovute alla presenza dell'azoto non "protetto", dal momento che nel caso dell'*N*-metilindolo la reazione non aveva causato gli stessi problemi.

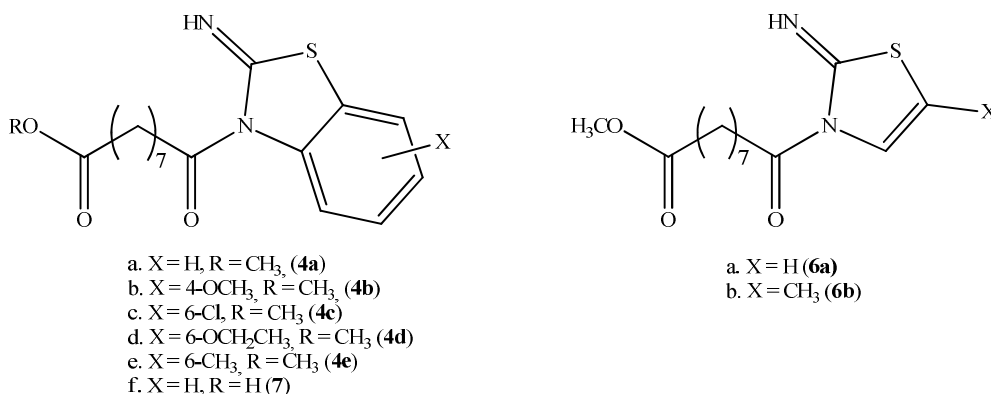
Saggi cellulari

2.3 Determinazione dell'IC₅₀ tramite saggio MTT

Il primo saggio effettuato, descritto dal punto di vista procedurale nella sezione Parte sperimentale, aveva come finalità la valutazione della concentrazione citostatica e/o citotossica che inibisce il 50% della popolazione cellulare, ossia l'IC₅₀. Il valore di tale concentrazione è stato stimato mediante il saggio cellulare citotossico colorimetrico noto come saggio MTT, basato sull'utilizzo di un agente, il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Si tratta di un test che rileva la tossicità dei prodotti in esame saggiando l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, il quale riduce l'MTT, di colore giallo, a formazano, viola; la lettura spettrofotometrica, successivamente, permette di risalire alla concentrazione di formazano e quindi al livello di vitalità.⁵⁹ Le cellule, appartenenti ad una linea di cancro del colon umano (HT-29), sono state inizialmente trattate con un range di concentrazioni standard (1-100 μM) ma, non avendo riscontrato una diminuzione nella vitalità cellulare, l'intervallo utilizzato è stato aumentato a 300 μM.

2. Risultati e discussione

Sono stati sottoposti ad analisi sei derivati del 2-amminobenzotiazolo (**4a-4e** e **7**) e due derivati amminotiazolici (**6a** e **6b**):



In alcuni casi non sono stati ottenuti valori certi e attendibili di IC₅₀ per problemi spesso riconducibili ad interferenze nella lettura spettrofotometrica (**Tab. 2.1**). Sono state infatti riscontrate difficoltà nella somministrazione delle molecole, in parte dovute alla loro scarsa solubilità in DMSO già alle basse concentrazioni, in parte alla precipitazione delle stesse nel mezzo (**Fig. 2.10**). In tali condizioni, inoltre, il composto in forma solida, non è accessibile alla cellula e quindi la concentrazione effettiva in soluzione diminuisce. Il problema della formazione di cristalli, d'altra parte, non è stato risolto neppure con la sostituzione del DMSO con etanolo, solventi che, opportunamente diluiti, sono veicoli molecolari inerti per le cellule.

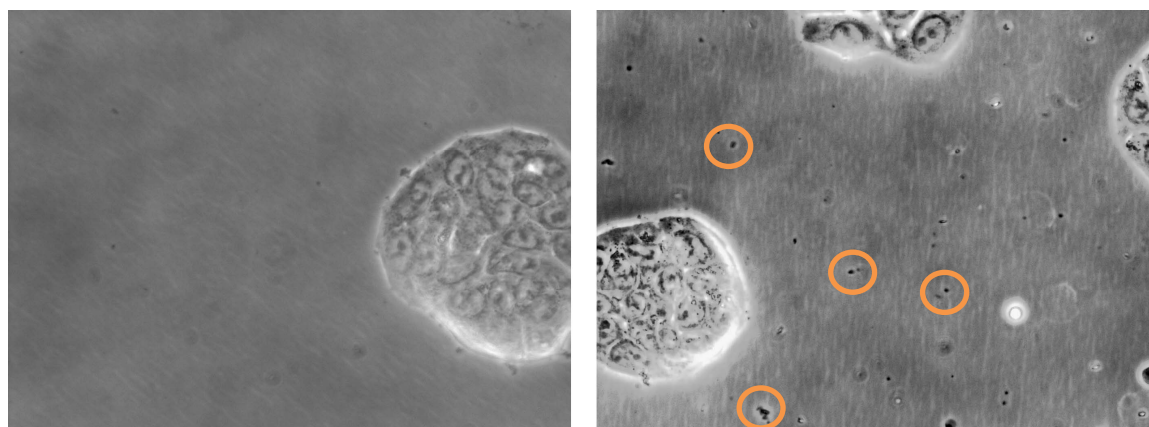


Fig. 2.10: La prima immagine è relativa alle cellule di controllo, ossia quelle a cui non è stato somministrato alcun prodotto, mentre nella seconda si può notare come, dopo l'aggiunta di **4e** (soluzione 50 μ M), si formi un precipitato, visibile sotto forma di punti neri (alcuni sono stati cerchiati in rosso) su fondo grigio.

Nella tabella 2.1 sono riportati i valori indicativi di IC₅₀ ottenuti mediante saggio MTT:

Composto	Solvente	IC ₅₀	Concentrazione a cui precipitano i cristalli
4a	DMSO	37 µM	100 µM
	Etanolo 96%	> 300 µM	50 µM
4b	DMSO	100-200 µM	100 µM
	Etanolo 96%	> 300 µM	200 µM
4c	DMSO	~100 µM	200 µM
4d	Etanolo 96%	~250 µM	-
4e	Etanolo 96%	>100 µM	-
7	DMSO	60-80 µM	-
6a	DMSO	>100 µM	-
6b	DMSO	>100 µM	-

Tab. 2.1: Risultati ottenuti mediante saggio MTT su HT-29, cellule cancerose di colon umano

Analizzando in maniera più dettagliata, si è visto che i due tiazoli **6a** e **6b**, nonostante non avessero problemi di solubilità, non fornivano risultati soddisfacenti dal punto di vista dell'attività antiproliferativa, per cui si è deciso di sottoporre ad ulteriori analisi solo i benzotiazoli. Tale differenza può essere dovuta a vari motivi, fra cui il fatto che la cellula potrebbe manifestare minori difficoltà ad internalizzare il gruppo benzotiazolico rispetto a quello tiazolico poiché più apolare e quindi più facilmente assimilabile attraverso la membrana lipidica cellulare.

Come si può osservare dai dati in tabella 2.1, il valore di IC₅₀ migliore è stato ottenuto con il 2-amminobenzotiazolo non sostituito (**4a**): è probabile che l'assenza di gruppi sull'anello benzenico favorisca la penetrazione all'interno della cellula, ma non si può

2. Risultati e discussione

affermare con certezza che il motivo sia puramente una sorta di “ingombro sterico”. Poiché l'estere (**4a**) aveva fornito risultati incoraggianti, si è deciso di testare anche il corrispondente acido (**7**) utilizzando come solvente DMSO: è stato ottenuto un valore di IC₅₀ nel range di 60-80 µM, dello stesso ordine di grandezza dell'estere; essendo tali dati affetti da grande incertezza, legata ad una serie di fattori tra cui, ad esempio, la concentrazione delle cellule, si può affermare che i due intervalli (considerando l'errore) sono sovrapponibili e quindi confrontabili.

2.4 Analisi in microscopia

La definizione della concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto antiproliferativo, ovvero l'IC₅₀, costituisce il passaggio preliminare per la valutazione dell'inibizione della crescita cellulare: le concentrazioni efficaci determinate, infatti, dovevano essere utilizzate, in una fase successiva, per il trattamento delle cellule HT-29. In questo caso, non avendo ottenuto dei valori di IC₅₀ attendibili, si è deciso di indagare gli effetti biologici dei prodotti utilizzando la microscopia di fluorescenza.

L'analisi consiste, nello specifico, nel trattare le cellule con i composti in esame per 24 ore, utilizzando delle concentrazioni di 50 µM e 200 µM (scelte sulla base dei precedenti risultati); trascorse le 24 ore viene aggiunto il DAPI (2-(4-ammidinofenil)-1*H*-indolo-6-carbossammidino) e le cellule vengono preparate per l'analisi in microscopia.

Il DAPI è un colorante fluorescente specifico per il nucleo e vitale, ossia in grado di oltrepassare la membrana plasmatica intatta e colorare sia le cellule vive che quelle fissate; una volta addizionato alle cellule, esso forma dei complessi con la doppia elica del DNA, con una maggiore specificità per le sequenze ricche in basi A-T. Quando si trova nella forma complessata mostra un assorbimento massimo a 358 nm, ossia nella regione UV, mentre la massima emissione si ha a 461 nm: in tal modo, la fluorescenza emessa nel blu permette di poter caratterizzare il nucleo delle cellule. Poiché è necessaria l'eccitazione con luce ultravioletta, per la rilevazione viene utilizzato un laser specifico o una lampada a vapori di mercurio.⁶⁰

Le immagini vengono acquisite sia in campo chiaro che in fluorescenza: il campo chiaro permette di rilevare gli effetti dei prodotti sulla morfologia cellulare, mentre la colorazione nucleare con DAPI permette di avere informazioni sulla organizzazione strutturale del DNA. In particolare, il saggio consente di osservare la morfologia dei

2. Risultati e discussione

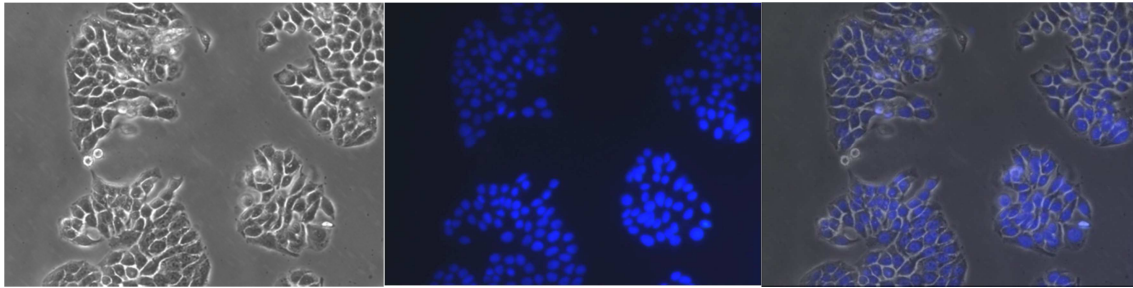
nuclei cellulari, per cui i nuclei con fenotipo normale emettono segnali luminosi omogenei, mentre quelli appartenenti a cellule apoptotiche vengono identificati tramite la frammentazione del nucleo stesso e la condensazione della cromatina che si localizza alla periferia della membrana cellulare.

Di seguito sono riportate le immagini ottenute mediante questa tecnica.

2. Risultati e discussione

- **4a:**

I. Cellule di controllo

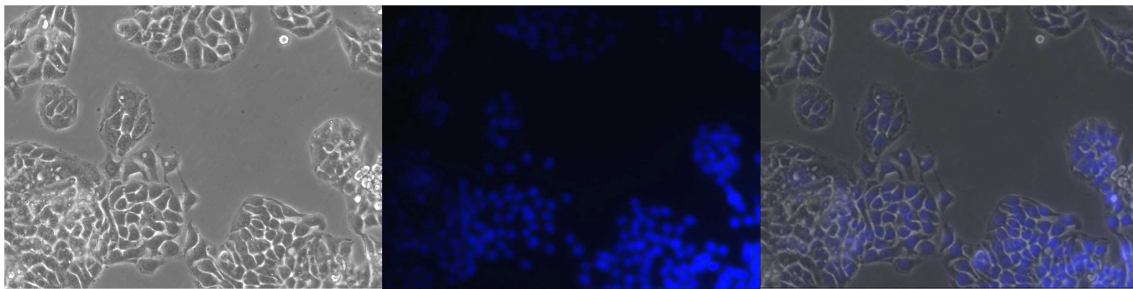


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M in DMSO

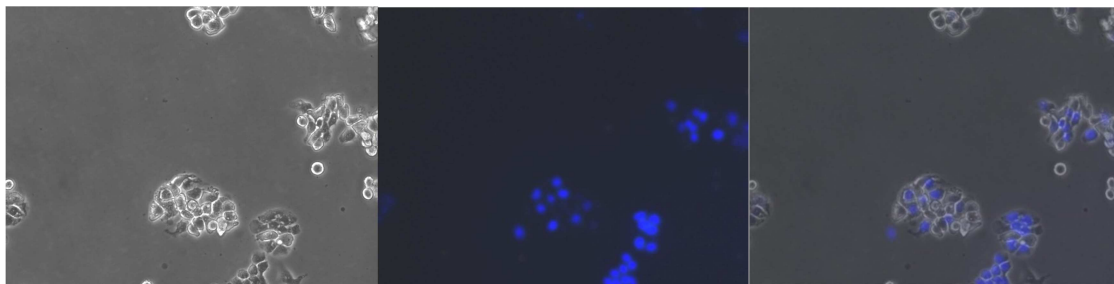


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M in DMSO



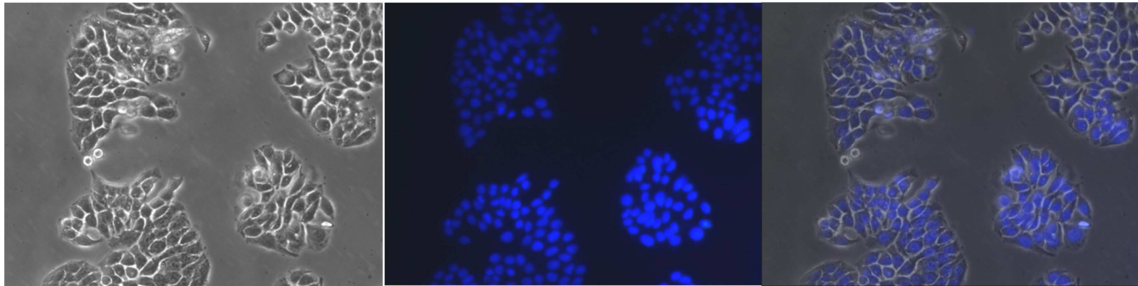
Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

- **4b:**

I. Cellule di controllo

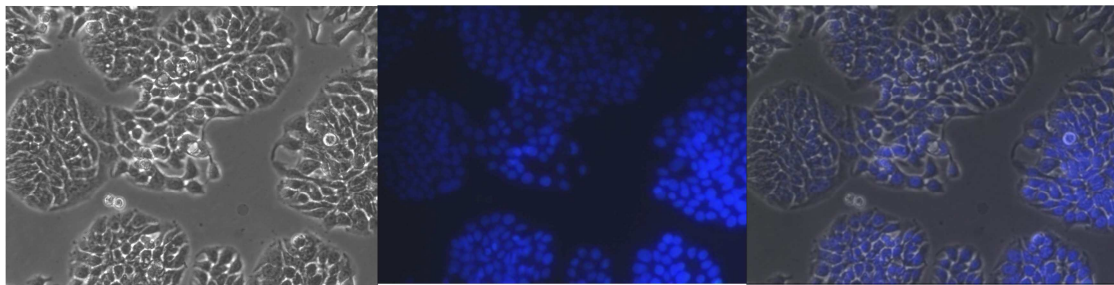


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M in DMSO

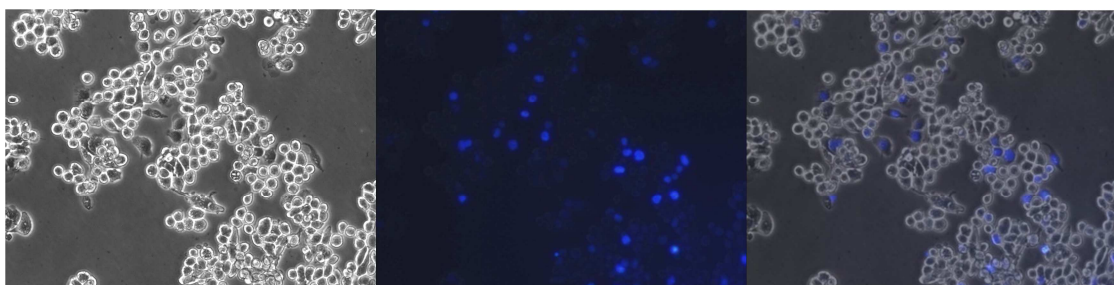


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M in DMSO



Campo chiaro

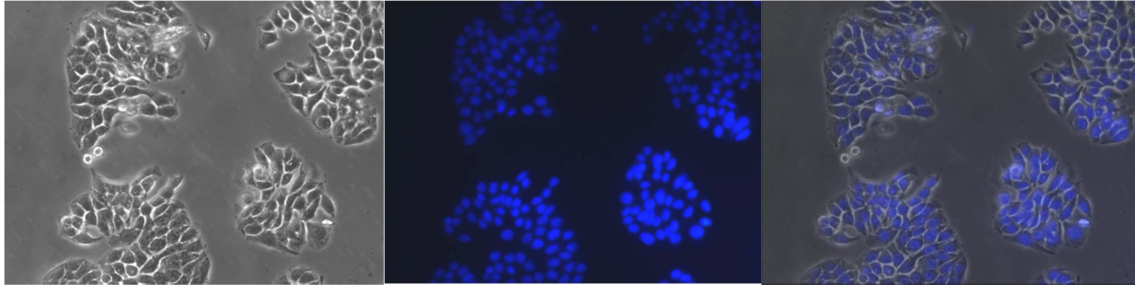
Fluorescenza

Merge

2. Risultati e discussione

- **4c:**

I. Cellule di controllo

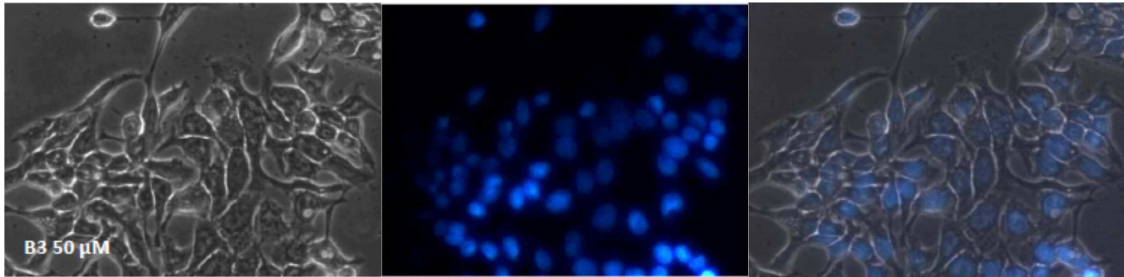


Campo chiaro

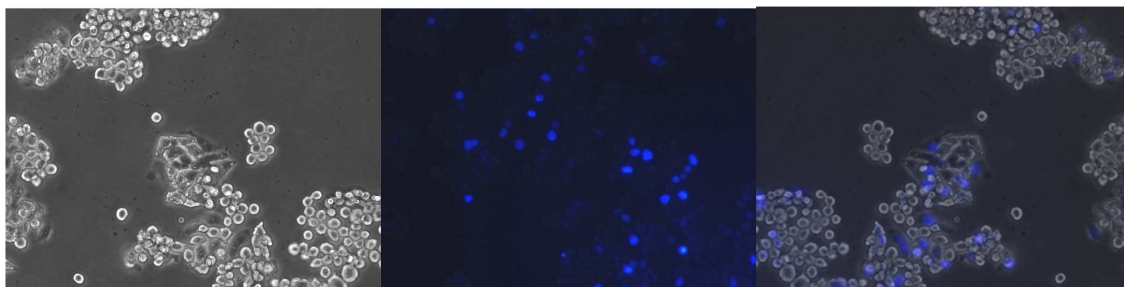
Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M in DMSO



III. Concentrazione = 200 μ M in DMSO



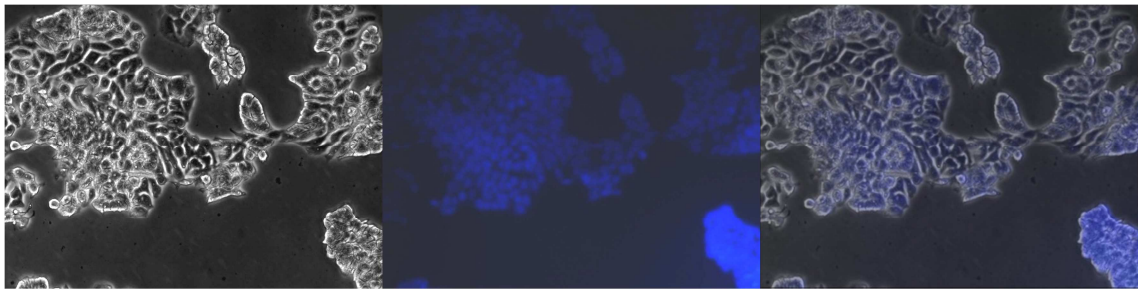
Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

- 4d:

I. Cellule di controllo

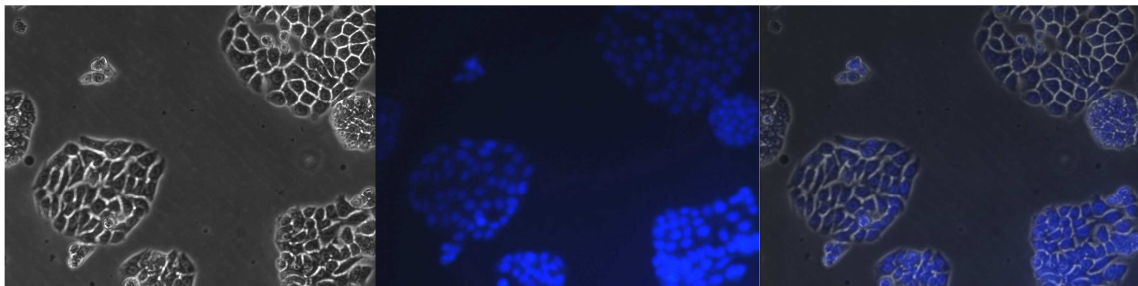


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M in DMSO

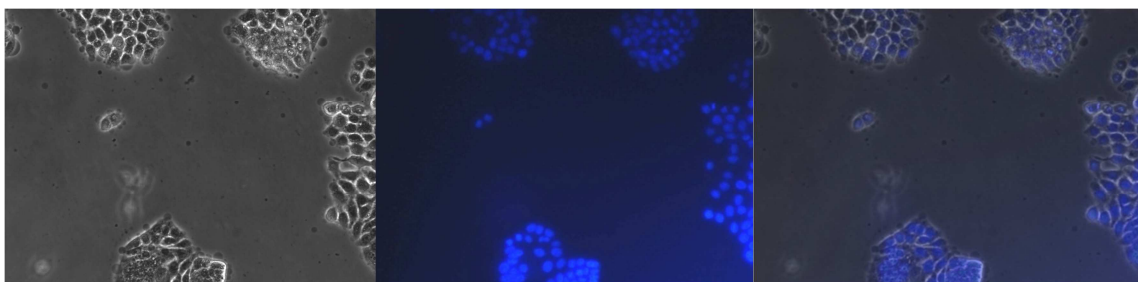


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M in DMSO



Campo chiaro

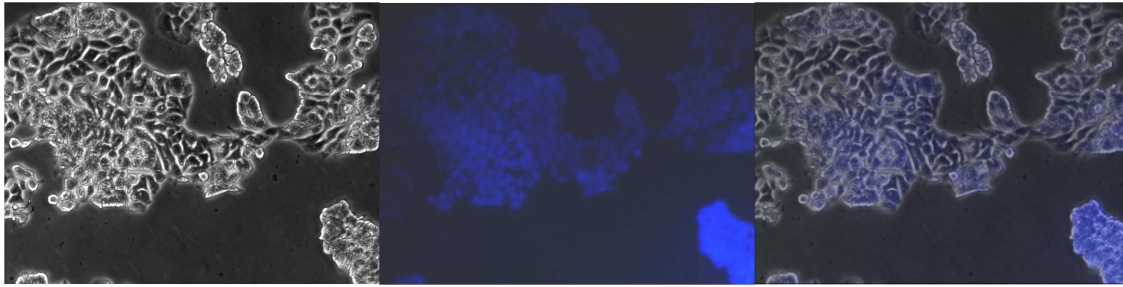
Fluorescenza

Merge

2. Risultati e discussione

- **4e:**

I. Cellule di controllo

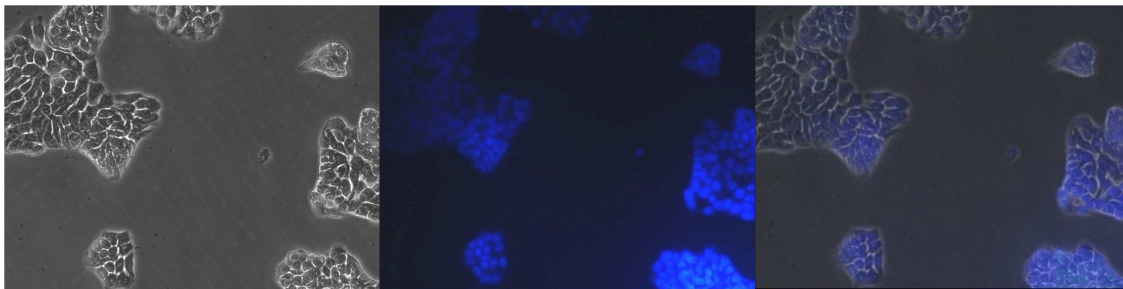


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M

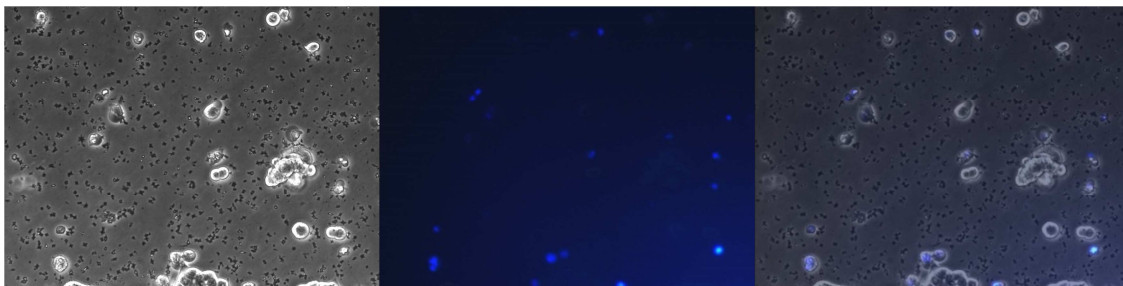


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M



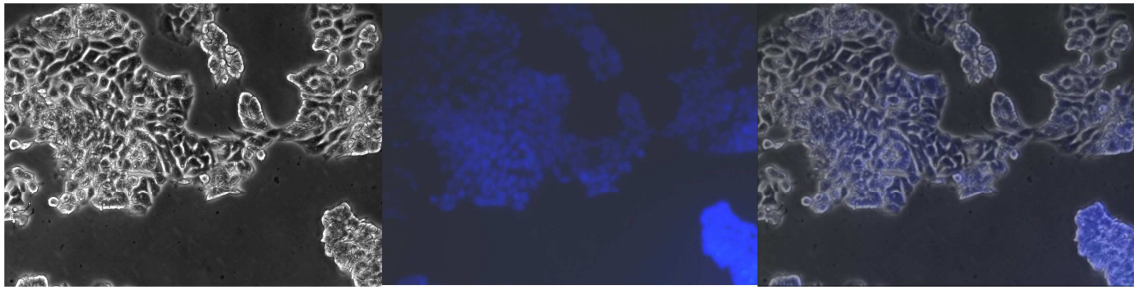
Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

• 7:

I. Cellule di controllo

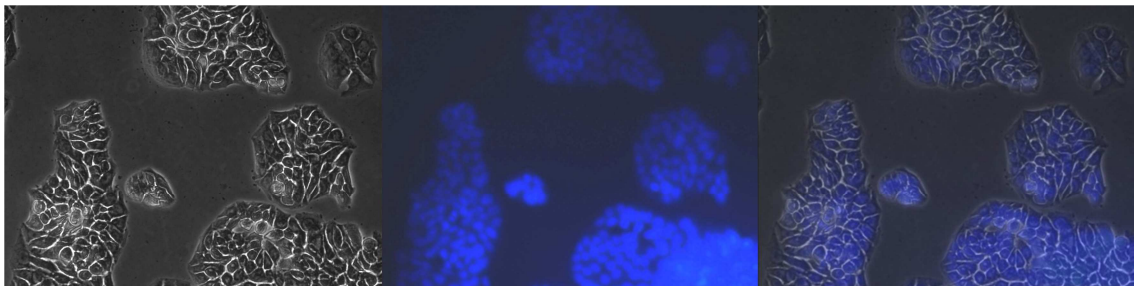


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M

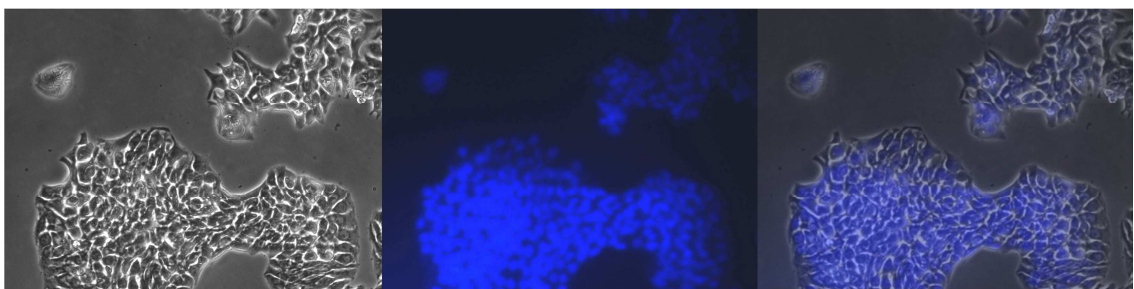


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M



Campo chiaro

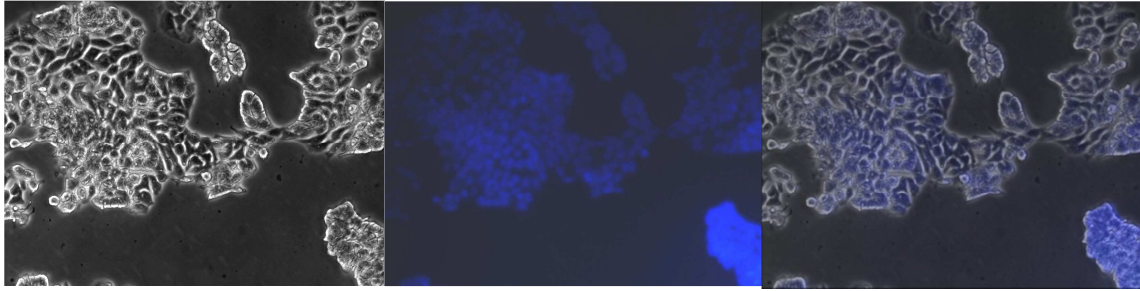
Fluorescenza

Merge

2. Risultati e discussione

- **6a:**

I. Cellule di controllo

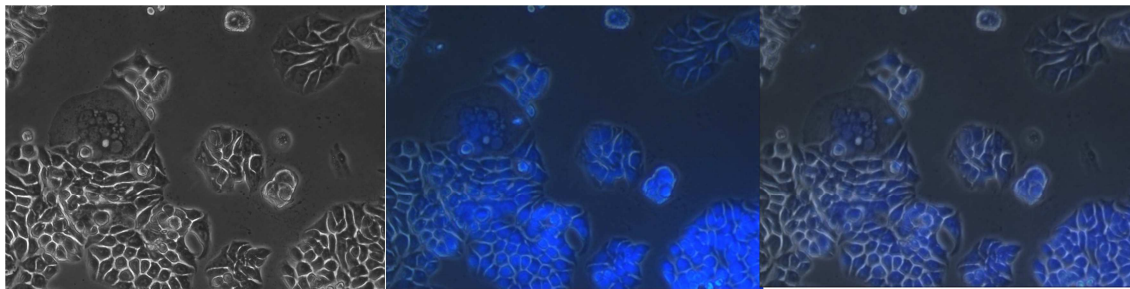


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M

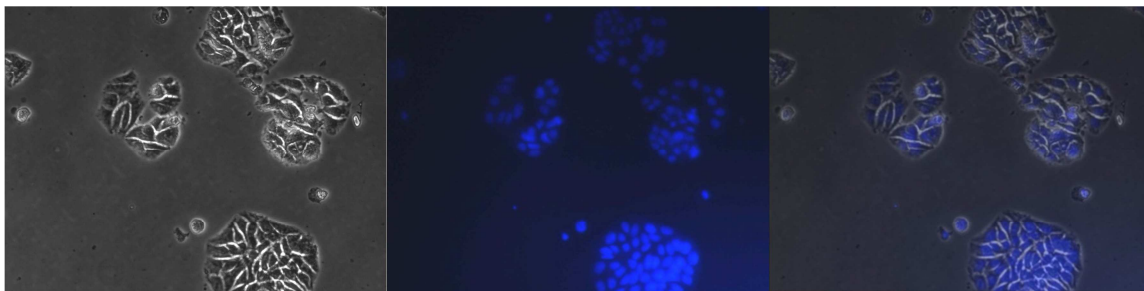


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M



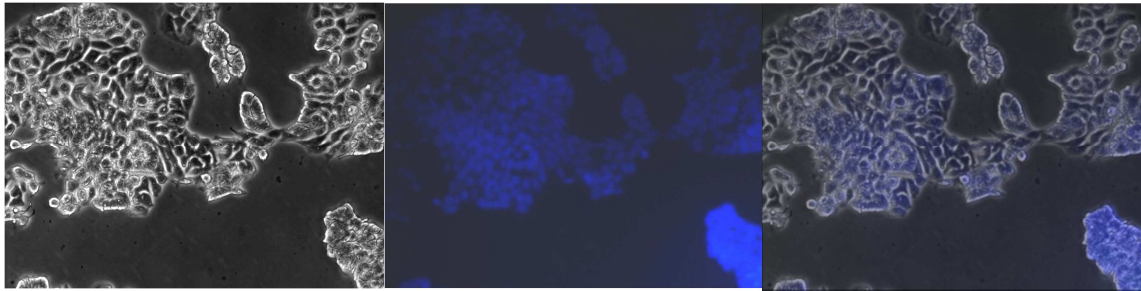
Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

- **6b:**

I. Cellule di controllo

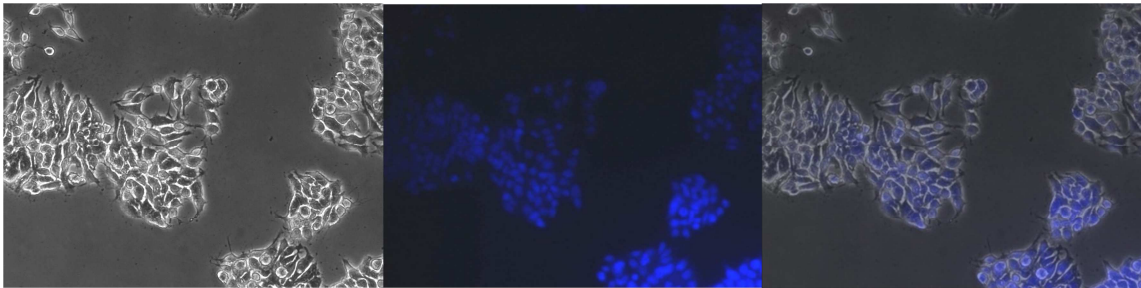


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

II. Concentrazione = 50 μ M

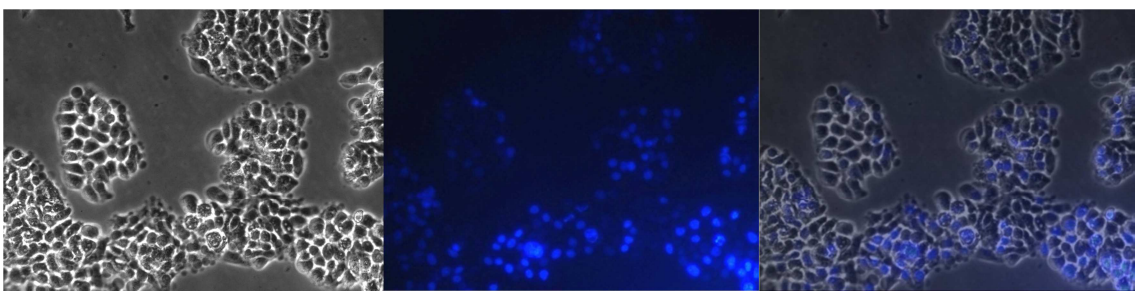


Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

III. Concentrazione = 200 μ M



Campo chiaro

Fluorescenza

Merge

2. Risultati e discussione

Per quel che riguarda la serie benzotiazolica, si può vedere come nel controllo le cellule di adenocarcinoma crescano in aggregati organizzandosi in una struttura ghiandolare, caratteristica che viene persa in seguito al trattamento con concentrazioni di 200 μM dei composti **4a**, **4b**, **4c** e **4e**; allo stesso modo si nota una diminuzione nell'intensità di fluorescenza nucleare, indice della perdita di organizzazione strutturale del DNA, che quindi non permette al DAPI di intercalare tra le basi. Si nota anche come la presenza dei gruppi funzionali sull'anello benzenico influenzi la tossicità: nel caso del composto **4d**, ad esempio, la presenza del gruppo $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ comporta una notevole diminuzione della tossicità anche rispetto al prodotto con il metossile in posizione 4 (**4b**), come evidenziano le immagini riportate. E' interessante sottolineare, inoltre, come la derivatizzazione di **4a** nel corrispettivo acido (**7**) provochi un forte calo nell'attività citotossica. I trattamenti a 50 μM , d'altra parte, non hanno mostrato segni di tossicità così rilevanti, nonostante si possano comunque notare segni di modificazione morfologica e sofferenza nucleare, evidenziati dalla ridotta capacità del DAPI di intercalare nel DNA; tale indicazione, potrebbe essere dovuta ai limiti legati alla tecnica utilizzata, per cui non è possibile accertarne le motivazioni.

In merito alla serie tiazolica, invece, si osserva come il composto **6a** manifesti un effetto tossico che viene perso nel derivato **6b**; in generale, si può affermare che entrambi i prodotti risultano meno attivi dei 2-amminobenzotiazoli: la presenza dell'anello benzenico potrebbe rivestire un qualche ruolo nei confronti dell'internalizzazione da parte della cellula.

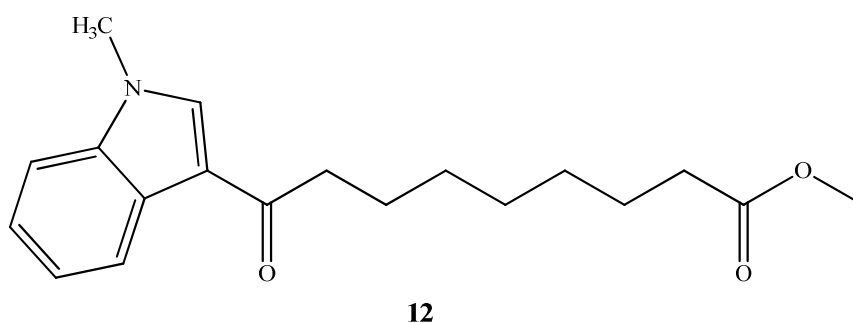
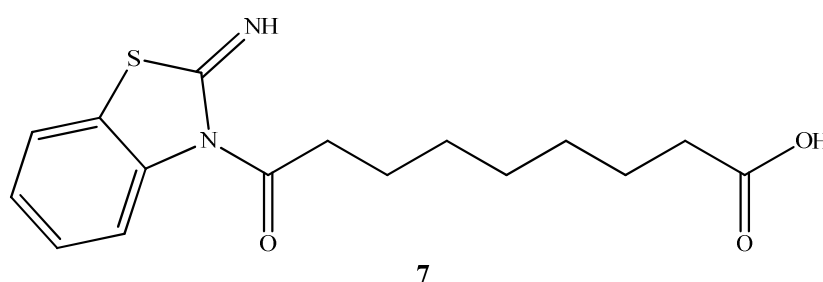
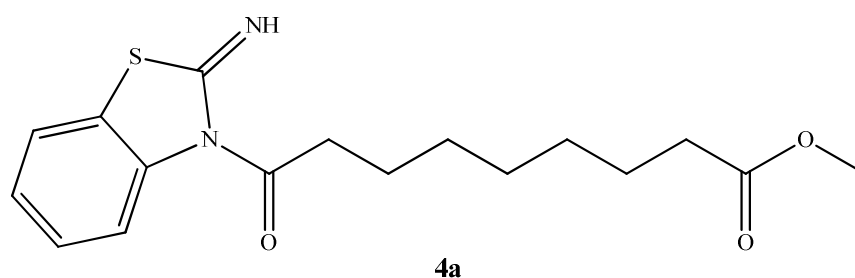
La microscopia è una tecnica ampiamente utilizzata nell'ambito della rilevazione di modificazioni morfologiche importanti ma non permette di ricavare informazioni dettagliate riguardo alla sofferenza molecolare; per tali motivi, si ritiene importante approfondire gli studi al fine di indagare gli effetti biologici indotti da **4a**, **4b**, **4c**, **4e** e **6a**, in particolare a concentrazioni di 50 μM .

Calcoli di *docking* molecolare

2.5 *Docking* molecolare: analisi dei composti 4a, 7 e 14

Nell'ambito della modellistica molecolare, la branca relativa ai metodi e modelli per la simulazione di sistemi chimici, il *docking* riveste un ruolo importante e viene spesso utilizzato in fase di progettazione di una molecola attiva dal punto di vista farmacologico, poiché permette di predire l'orientamento del legame tra il composto di interesse ed il target molecolare, e di conseguenza di ricavare informazioni riguardo all'affinità e all'attività. In particolare, per questo lavoro di tesi è stata indagata la capacità di alcuni dei prodotti sintetizzati di inserirsi nel sito attivo di alcune deacetilasi istoniche.

Si è deciso di sottoporre a tale analisi tre composti: 9-(2-imminobenzotiazol-3-2*H*-ile)-9-ossnonanoato di metile (**4a**), acido 9-(2-imminobenzotiazol-3-2*H*-ile)-9-ossnonanoico (**7**) e 9-(1-metil-1*H*-indol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (**12**) (**Fig. 2.11**), dei quali sono state calcolati l'energia libera di legame e la costante di inibizione.



2. Risultati e discussione

Fig. 2.11: Strutture dei composti analizzati

Le macromolecole target esaminate sono state scelte in seguito alla valutazione del meccanismo d'azione di alcuni farmaci antitumorali che rientrano nella categoria degli inibitori delle istone deacetilasi (HDACi); nel caso specifico, si è scelto di analizzare l'interazione con tre istone deacetilasi appartenenti a due diverse classi: HDAC 2 e HDAC 8, che rientrano nella classe I, e HDAC 4, facente parte invece della classe II.

I calcoli, eseguiti presso il Dipartimento di Chimica Industriale dalla Dott. ssa Elena Strocchi, hanno previsto una prima fase di preparazione dei ligandi, ossia i composti di sintesi, ed una di preparazione delle proteine bersaglio. Per quel che riguarda i composti di sintesi, è stato necessario ottimizzarne la geometria al fine di trovare la conformazione di minima energia; tale procedura è stata effettuata utilizzando il programma Gaussian 3. Le strutture delle macromolecole HDAC2, HDAC4 e HDAC8, invece, sono state ottenute dalla Protein Data Bank (PDB) (caratterizzate rispettivamente dalle sigle 4LXZ, 2VQM e 4QA3), e sono state predisposte ai calcoli: sono stati eliminati i ligandi originali e l'acqua di cristallizzazione e sono stati ottimizzati gli assegnamenti per i legami idrogeno. La presenza dei ligandi è stata fondamentale al fine di caratterizzare il sito di legame delle istone deacetilasi, in modo da concentrare l'attenzione sulla regione specifica costituente il sito attivo e limitare così il numero di interazioni da calcolare; è stata quindi scelta una "griglia" delle dimensioni di 70 x 70 x 70 Å, sufficientemente grande da permettere che il ligando ruoti liberamente, anche nella sua conformazione più estesa. Il *virtual docking* è stato condotto tramite i programmi AutoDock 4.2e AutoGrid 4.0 (che calcola le griglie sulle quali viene valutata l'interazione del ligando), utilizzando l'algoritmo genetico di Lamarckian per la ricerca locale.

Sono stati analizzati i "*binding modes*", ossia le possibili orientazioni dei vari ligandi rispetto al recettore, e le interazioni che essi possono generare con il sito di legame; è stata quindi identificata la conformazione cui era associata la minore energia di legame calcolata (che include l'energia libera intermolecolare e torsionale), che rappresentava il "migliore risultato" dell'analisi di *docking*.

Di seguito sono riportati i risultati e le immagini che mostrano l'interazione con il sito di legame (**Fig. 2.12 e 2.13**).

2. Risultati e discussione

1) Molecola **4a** – logP = 3.82

Target	BE (kcal/mol)	KI	H-bond
HDAC2	68.08	-	-
HDAC4	-7.04	6.97 μ M	Arg37:HH11 Arg.154:HH11
HDAC8	-8.9	299.17 nM	Phe208:NH His142:He2 His143:He2 His180:He2

2) Molecola **7** – logP = 3.68

Target	BE (kcal/mol)	KI	H-bond
HDAC2	67.69	-	-
HDAC4	-7.29	4.5 μ M	Arg37:HH11 Arg.154:HH11
HDAC8	-7.47	3.36 μ M	Phe208:NH His142:He2 His143:He2 His180:He2

3) Molecola **12** – logP = 4.05

Target	BE (kcal/mol)	KI	H-bond
HDAC2	54.19	-	-
HDAC4	-6.91	8.54 μ M	Arg37:HH11 Arg.154:HH11
HDAC8	-8.68	431.97 nM	Phe208:NH His180:He2

BE = Binding Energy (somma di energia intermolecolare e torsionale)

KI = Inhibition constant (calcolata con Autodock secondo la formula: $K_i = \exp((\Delta G * 1000) / (Rcal * TK))$), in cui ΔG è l'energia di docking, Rcal è 1.98719 e TK è 298.15)

2. Risultati e discussione

I calcoli hanno evidenziato una buona affinità tra i composti d'interesse e le istone deacetilasi 4 e 8, con energie libere di legame sempre inferiori a -7 kcal/mol e costanti di inibizione dell'ordine di pochi μM ; per quanto riguarda la HDAC2, invece, non è stata rilevata una buona interazione, come dimostrato dall'aumento dell'energia di legame, per cui le indagini non sono state approfondite. Come si può notare dalle immagini (**Fig. 2.12**, **Fig. 2.13** e **Fig. 2.14**), le strutture molecolari dei ligandi entrano quasi completamente nella tasca di legame delle acetilasi target; in particolare, si formano delle interazioni tramite legami idrogeno tra i gruppi amminici e carbossilici dei composti ed alcuni residui amminoacidici (indicati nelle tabelle) del sito di legame delle proteine.

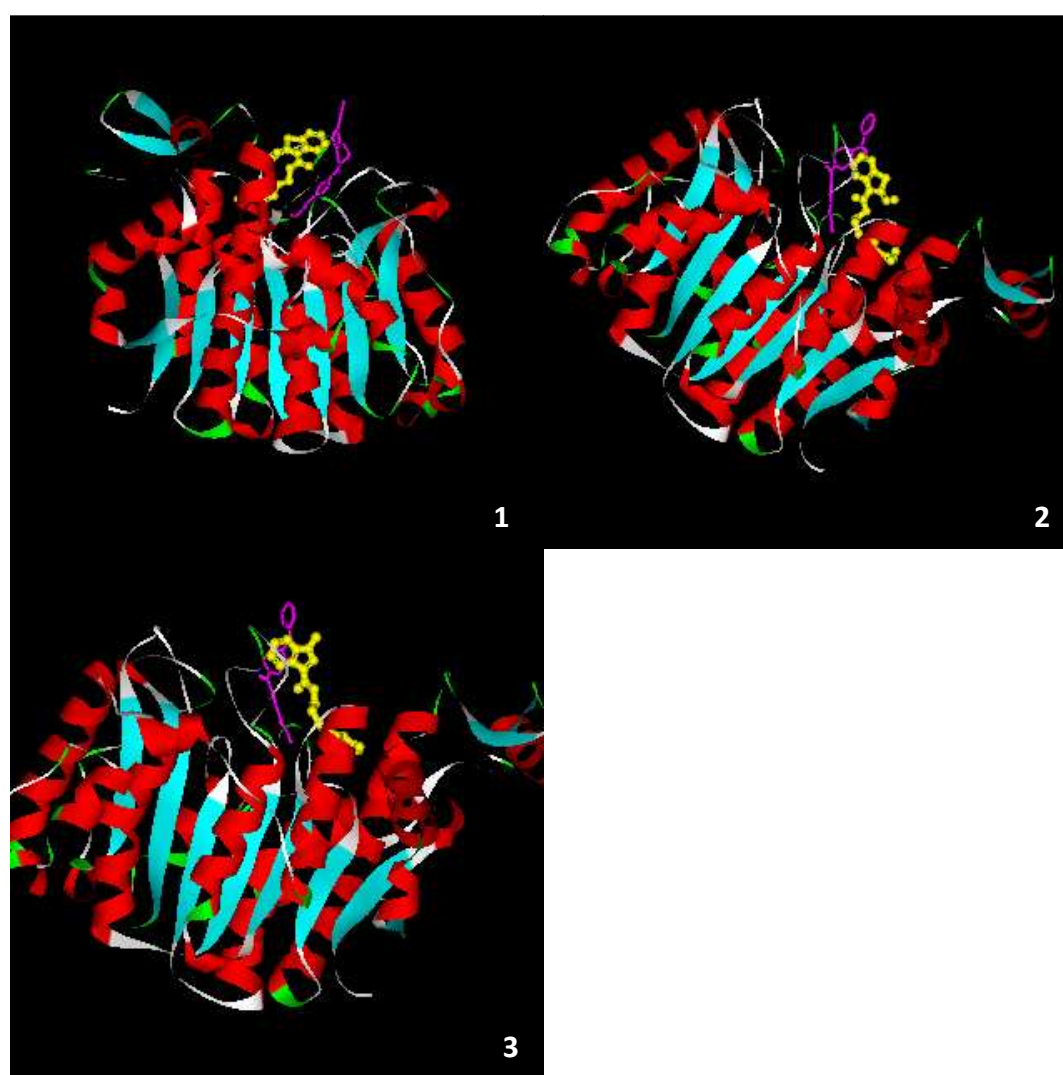


Fig. 2.12: Interazione tra i prodotti di sintesi e HDAC4; immagini elaborate tramite il programma DS Visualizer. La figura **1** è relativa al composto **4a**, la seconda al composto **7** e la terza al composto **12**; la struttura in giallo corrisponde al composto d'interesse mentre quella in violetto appartiene ad un inibitore cocristallizzato con la proteina.

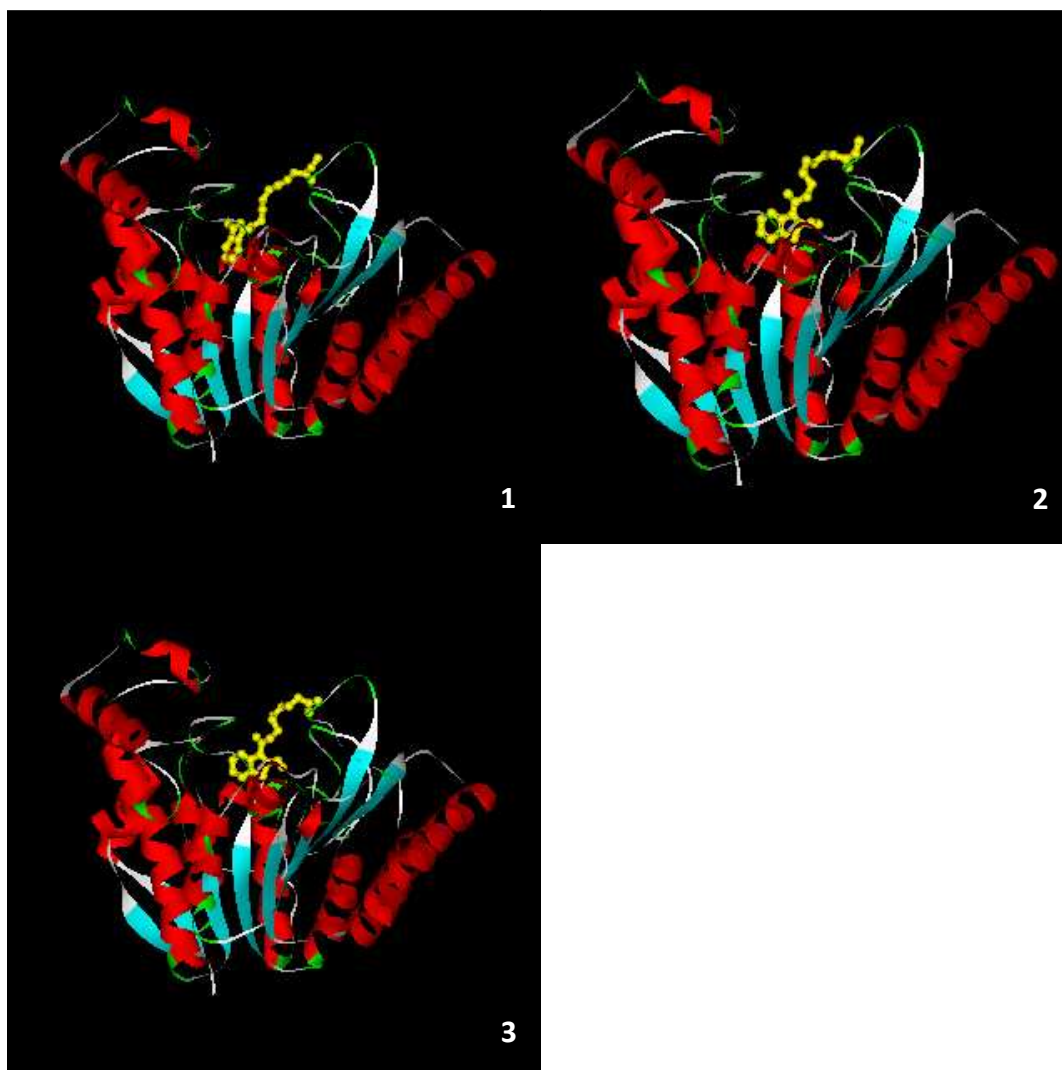


Fig. 2.13: Interazione tra i prodotti di sintesi e HDAC8; immagini elaborate tramite il programma DS Visualizer. Come per **2.12**, la figura **1** è relativa al composto **4a**, la seconda al composto **7** e la terza al composto **12**; la struttura in giallo corrisponde al composto d'interesse.

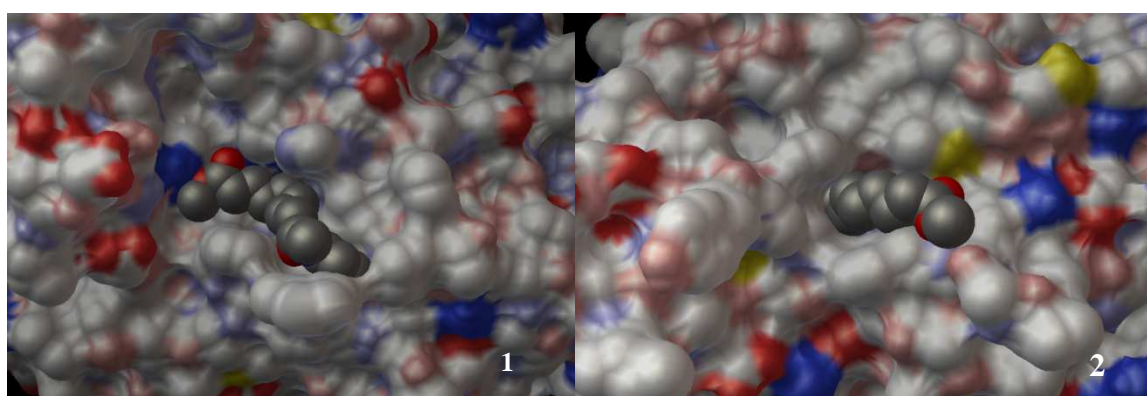


Fig. 2.14: Interazione tra il derivato indolico **12** e HDAC4 (immagine 1) e HDAC8 (immagine 2)

Valutazione dell'attività antibatterica/antifungina

2.6 Saggi sui composti 4a, 6a, 6e, 10 e sul 9(R)-9-HSA

Alcuni tra i prodotti sintetizzati sono stati inoltre sottoposti a saggi per la valutazione dell'attività biologica su microrganismi di tipo batterico e su funghi; in particolare, sono stati testati 9-(2-imminobenzo[d]tiazol-3-2*H*-ile)-9-ossononanoato di metile (**4a**), 9-(2-imminotiazol-3-ile)-9-ossononanoato di metile (**6a**), 9-(2-immino-1,3,4-tiadiazol-3-(2*H*)-ile)-9-ossononanoato di metile (**6e**), acido 9-((2-(1*H*-indol-3-ile)etil)ammino)-9-ossononanoico (**10**) e acido 9(*R*)-9-idrossistearico. L'utilizzo di quest'ultimo ha comportato la sua sintesi a partire da semi di *Dimorphoteca Sinuata* L., come riportato nella Parte sperimentale. I substrati sui quali sono state svolte le analisi sono quattro: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*; i primi due sono batteri, rispettivamente di tipo Gram negativo e Gram positivo, mentre gli ultimi due sono dei funghi.

Sono state effettuate due prove con metodi diversi: il primo consiste nella somministrazione dei composti su piastre contenenti agar (un solidificante per terreni di coltura utilizzato nelle analisi microbiologiche), mentre il secondo prevede la diffusione in agar (metodo "Kirby bauer").

Con il primo metodo i composti **4a**, **6a**, **6e**, **10** e (9*R*)-9-HSA sono stati disciolti in DMSO ed addizionati al terreno di coltura a concentrazioni crescenti; come controllo positivo sono stati utilizzati gli antibiotici ampicillina per i batteri e anfotericina B per i funghi, aggiunti alle concentrazioni di 25 µg/mL (ampicillina) e 50 µg/mL (anfotericina B); infine sul terreno è stata inoculata una sospensione batterica o fungina per ciascun microrganismo.

Dopo incubazione a 37 °C per 24 ore nel caso dei batteri e 48 ore nel caso dei funghi, il confronto con i rispettivi controlli non ha evidenziato inibizione nella crescita dei microrganismi per nessun composto alle concentrazioni utilizzate.

L'analisi mediante il secondo metodo, non ha rivelato alcun effetto antibatterico verso *E. coli* e *S. aureus*, tuttavia è stata riscontrata attività inibitoria nei confronti dei microrganismi fungini per concentrazioni di 5 mg/mL; in particolare, gli aloni di inibizione osservati sono i seguenti:

- **4a**: alone di inibizione di 7.5 mm contro *C. albicans*;
- **6a**: alone di inibizione di 7.25 mm contro *C. albicans*;

2. Risultati e discussione

- **6e**: alone di inibizione di 8.25 mm contro *C. albicans*;
- **10**: alone di inibizione di 10 mm contro *A. niger*;
- Acido 9(*R*)-9 idrossistearico: alone di inibizione di 9 mm contro *A. niger*, alone di inibizione di 9 mm contro *C. albicans*.

Nel caso del controllo con l'anfotericina B, invece, è stato registrato un alone di inibizione di 11 mm contro *A. niger* e di 18 mm contro *C. albicans*.

I composti analizzati si sono quindi rivelati inattivi nei confronti dei microrganismi procarioti, mentre si è registrata attività biologica su quelli fungini, seppure a concentrazioni elevate. Per avere informazioni più dettagliate, tuttavia, si dovrebbe procedere con le analisi su altri ceppi di *Candida* e con la valutazione della concentrazione minima inibitoria (MIC), ossia la più bassa concentrazione di una sostanza antimicrobica capace di inibire la crescita di un batterio.

3. Conclusioni

Nell'ambito di questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati nuovi composti caratterizzati dalla presenza di una parte eteroaromatica legata ad una catena alifatica terminante con una funzione metil esterea, che riprende una parte della struttura dell'acido 9-idrossistearico, già noto per la sua attività antiproliferativa su cellule tumorali. La parte alifatica è stata legata al sistema eterociclico sfruttando la reattività della funzione cloroacilica ottenuta per reazione dell'estere metilico dell'acido azelaico con cloruro di ossalile. In particolare, sistemi azolici quali benzotiazoli, tiazoli e tiadiazoli sono stati inseriti attraverso la formazione di legami ammidici fra i precursori 2-amminoazolici e la funzione cloroacilica, mentre derivati indolici sono stati ottenuti mediante acilazione al C-3 indolico, derivatizzazione in posizione 1 e anche doppia funzionalizzazione nelle posizioni 1 e 3.

La struttura dei composti è stata verificata mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e massa ESI; nel caso dei derivati tiazolici, tiadiazolici e benzotiazolici, inoltre, esperimenti NOESY-1D hanno permesso di accertare che l'attacco nucleofilo avviene ad opera dell'azoto endociclico. Alcuni di questi derivati sono stati sottoposti ad idrolisi del legame estereo al fine di valutare se questo potesse influenzare l'attività biologica.

I test biologici sono stati svolti presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna; in particolare, sono stati studiati gli effetti della somministrazione di derivati tiazolici e loro benzocondensati su cellule tumorali appartenenti ad una linea di cancro del colon umano (HT-29). L'analisi di tipo microscopico utilizzando un agente colorante, il DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo), che si intercala nei nuclei delle cellule vitali e organizzate, ha permesso di ottenere informazioni sull'azione antiproliferativa manifestata dai diversi composti. Calcoli di *docking* su tre prodotti sintetizzati hanno portato a prevedere una loro possibile attività come inibitori delle deacetilasi istoniche, che sarà in futuro verificata mediante esperimenti *in vitro*.

Infine, alcuni prodotti hanno indotto inibizione di alcune specie fungine ma non di specie batteriche.

4. Parte sperimentale

Note generali

I semi della pianta *Dimorphotheca sinuata* L. sono stati acquistati da Galassi sementi SNC a Gambettola (FC). I reagenti utilizzati, se non diversamente specificato, provengono dalla Sigma-Aldrich (Milano). La cromatografia su colonna (*Flash Chromatography*, FC) è stata effettuata utilizzando come fase stazionaria gel di silice (0.037-0.063 mm, Merck), mentre la cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata usando gel di silice 60 (FlukaAnalytical). Le macchie relative ai reagenti e ai prodotti sono state rivelate, nel caso della sintesi dell'acido idrossistearico, utilizzando una soluzione acquosa di $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$ (2.5%), $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ (1%) in 10% H_2SO_4 , mentre in quasi tutte le altre sintesi erano visibili all'UV; infine, per visualizzare l'eventuale monometil estere dell'acido azelaico residuo è stata utilizzata una soluzione al 10% di verde di bromocresolo in etanolo.

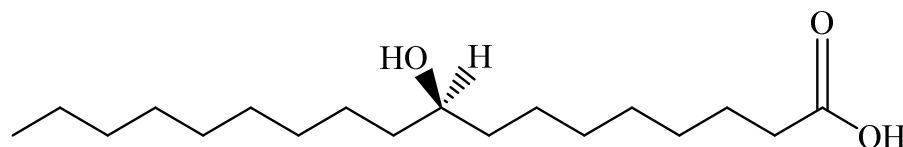
Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (^1H , ^{13}C , DEPT) sono stati effettuati con spettrometri Varian Gemini 300, Mercury 400 e Inova 600 (Varian, Palo Alto USA); le frequenze sono riportate in Hz e lo spostamento chimico δ è dato in ppm prendendo come riferimento il solvente CDCl_3 ($\delta = 7.27$ ppm per ^1H -NMR e $\delta = 77.0$ ppm per ^{13}C -NMR) o, per gli acidi, CD_3OD ($\delta = 3.31$ ppm per ^1H -NMR e $\delta = 49.3$ ppm per ^{13}C -NMR). Per l'idrogenazione è stato utilizzato un idrogenatore Parr modello 3911EKX. I punti di fusione dei prodotti sono stati determinati tramite un apparecchio Büchi 535 e non sono stati corretti. Gli spettri di massa (EI) sono stati registrati con uno spettrometro VG-7070E ad un potenziale di ionizzazione di 70 eV. gli spettri ESI-MS sono stati registrati con un apparecchio WATERS 2Q 4000. I solventi anidri sono stati preparati seguendo procedure standard.

Procedure sintetiche

4.1 Sintesi dell'acido 9(R)-9- idrossistearico

Per ottenere l'acido (9R)-9-idrossistearico si è attinto al *pool* chirale naturale, e in particolare ai semi di *Dimorphoteca sinuata* L.: 12 g di semi della margherita vengono grossolanamente macinati tramite macina-spezie elettrico e posti in pallone a tre colli anidrificato mediante riscaldamento con pistola essiccatrice ad aria e tenuto sotto flusso di N₂, quindi vengono aggiunti 210 mL di miscela CHCl₃/CH₃OH 2:1 v/v; il pallone viene coperto con alluminio per evitare la formazione di radicali (indotta dalla luce) in alfa ai doppi legami degli acidi grassi contenuti nell'olio. Dopo 24 ore la miscela viene filtrata su setto poroso sotto vuoto ed i semi rimasti vengono lavati con CHCl₃. L'estratto lipidico viene poi acidificato con circa 20 mL di soluzione 0,1 M in HCl e 0,1 M in NaCl, quindi la fase organica viene separata, anidrificata su MgSO₄ e concentrata, dando luogo ad un olio denso di colore giallo ambrato. A questo punto viene effettuata la transesterificazione (esotermica) a 0 °C: il grezzo ottenuto nell'operazione precedente è trattato con CH₃ONa (2,350 g; 43,52 mmol) in 40 mL di CH₃OH e posto sotto agitazione meccanica e in bagno di ghiaccio. Trascorse due ore, si acidifica con una soluzione di HCl 1 M fino a pH < 7 e si estrae con esano in imbuto separatore; le fasi organiche vengono anidificate su MgSO₄ anidro, filtrate e concentrate. L'olio ottenuto viene sottoposto ad idrogenazione: si scioglie in 30 mL di AcOEt e si trasferisce in bottiglia per idrogenatore Parr, quindi si aggiunge il catalizzatore di Adams, ossia PtO₂. Si tiene la miscela per circa 20 minuti sotto pressione di idrogeno (2 bar), dopo i quali la soluzione si presenta incolore. Il catalizzatore (polvere nera molto fine) viene separato dalla soluzione per filtrazione su setto poroso con celite [(CaO)₃·Al₂O₃], quindi si concentra la fase liquida ottenendo un solido quasi completamente bianco di consistenza cerosa contenente la miscela di esteri metilici di acidi grassi. Il prodotto d'interesse viene purificato via FC eluendo con una soluzione di etere di petrolio/etere etilico = 7/3: vengono separati 0,474 g (1,51 mmol) di (9R)-9-idrossiottadecanoato di metile, un solido ceroso bianco. L'ultimo step del processo sintetico è l'idrolisi ad acido: si scioglie l'estere in circa 40 mL di KOH metanolica e si tiene sotto agitazione la miscela per circa quattro ore, dopodiché si acidifica con HCl 4 M fino a persistenza del precipitato bianco, si scioglie tutto in AcOEt e si estrae. La fase organica raccolta viene infine concentrata ed il solido biancastro ottenuto viene ridisciolto nella minor quantità possibile di metanolo

al fine di permettere la cristallizzazione dell'acido e la separazione dalle impurezze, che restano in soluzione.



Aspetto: Solido bianco ceroso

P.f. = 76-77 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 4.73 (br.s, 1H, OH), 3.66-3.54 (m, 1H, CHOH), 2.37 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 1.63 (quint, 2H, $J=7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.60-1.23 (m, 27H, CH_2 alifatici e OH), 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3).

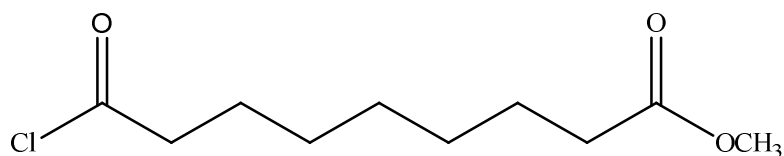
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 178.7, 72.0, 37.5, 37.4, 33.5, 31.9, 29.7, 29.65, 29.58, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 25.7, 25.5, 24.7, 22.7, 14.1.

MS (EI) m/z (%): 283 (M^+-OCH_3 , 0.5), 264 (2), 155 (100), 144 (15), 127 (11), 109 (16), 101 (10), 98 (22), 83 (24), 73 (20), 69 (22), 57 (13), 55 (37).

4. Parte sperimentale

4.2 Sintesi di 9-cloro-9-ossononanoato di metile (2)

La sintesi dei derivati amminobenzotiazolici e amminotiazolici prevede la preparazione del cloruro acilico del monometil estere dell'acido azelaico, che rappresenta lo starting material. La procedura avviene in ambiente anidro, in pallone a 3 colli sfiammato e posto sotto flusso di N₂, munito di imbuto gocciolatore dotato di equilibratore di pressione (detto anche "compensazione"). Allo scopo di ottenere circa 5 mmol di prodotto, la reazione viene effettuata su 1,12 mL di acido 9-metossi-9-ossononanoico all'85% (5,787 mmol), utilizzando 0,53 mL di cloruro di ossalile (6,075 mmol) e 50 mL di CH₂Cl₂ anidro (45 mL nel pallone e 5 mL nell'imbuto per disciogliere il (COCl)₂). Si tiene sotto agitazione e sotto battente di azoto per ~12-15 h, controllando l'andamento effettuando dei prelievi che vengono concentrati al rotavapor (munito di trappola per l'umidità a base di CaCl₂) ed analizzati per via spettroscopica (¹H-NMR); la reazione si considera terminata alla scomparsa dei segnali relativi al reagente. Si procede con l'evaporazione totale del solvente, quindi si discioglie in una quantità nota di CH₂Cl₂ calcolata al fine di ottenere una soluzione 0,5 M di cloruro acilico, tenendo conto delle frazioni sottratte per lo svolgimento delle analisi intermedie.



Aspetto: liquido incolore

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.87 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂COCl), 2.30 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.80-1.56 (m, 4H, CH₂CH₂COCl e CH₂CH₂COOCH₃), 1.43-1.23 (m, 6H, CH₂alifatici).

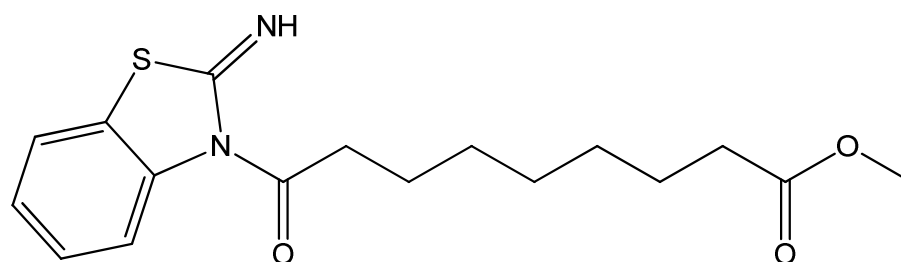
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 174.0, 173.6, 51.3, 46.9, 33.8, 28.7, 28.6, 28.1, 24.8, 24.6.

4.3 Sintesi dei derivati 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f.

Procedura tipica

Viene di seguito riportata la procedura eseguita per la sintesi di un derivato 2-amminobenzotiazolico *N*-acilato, utilizzata anche per l'ottenimento di tutti gli altri composti azolici.

La reazione viene condotta in ambiente anidro sotto battente di N₂ disciogliendo 150 mg (1 mmol) di 2-amminobenzotiazolo e 1 mL (0,5 mmol) di soluzione di cloruro acilico in 5 mL di CH₂Cl₂; l'andamento viene controllato via TLC eluendo con etere etilico ed utilizzando l'amminobenzotiazolo come riferimento. Dopo aver tenuto la miscela sotto agitazione per circa 3 ore si effettua il *quenching* aggiungendo 5 mL di acqua per idrolizzare eventuale cloruro acilico non reagito, quindi si estrae in imbuto separatore lavando la fase acquosa con CH₂Cl₂; la fase organica viene infine anidrificata su MgSO₄ anidro e concentrata al rotavapor. Il prodotto d'interesse viene purificato tramite FC con miscela eluente 8/2 = etere etilico/etere di petrolio e, una volta concentrato, si presenta come solido bianco.



9-(2-imminobenzo[d]tiazol-3-2H-ile)-9-ossnonanoato di metile (4a)

Aspetto: Solido bianco; resa 20%

P.f. = 106.6 – 106.8 °C

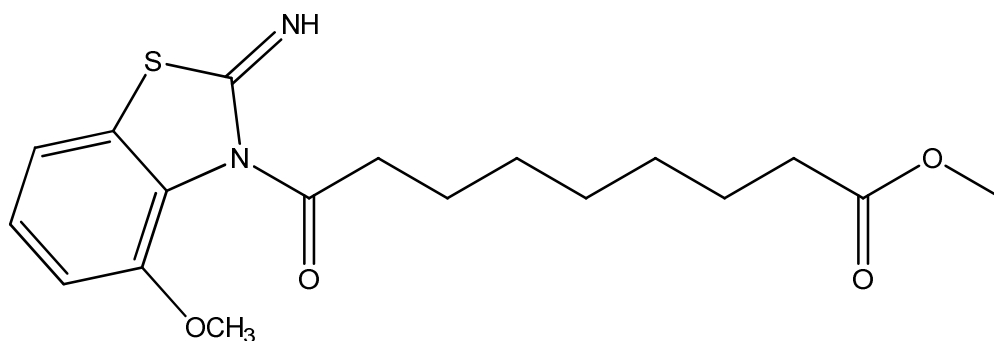
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, CH aromatico), 7.75 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, CH aromatico), 7.45 (dt, *J*₁=8.1 Hz, *J*₂=1.2 Hz, 1H, CH aromatico), 7.34 (dt, *J*₁=8.1, *J*₂=0.9 Hz, 1H, CH aromatico), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.46 (t, *J*=7.7 Hz, 2H, CH₂CON), 2.26 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.71-1.65 (m, 2H, CH₂CH₂CON), 1.59-1.52 (m, 2H, CH₂CH₂COOCH₃), 1.29-1.19 (m, 6H, CH₂ alifatici).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.2, 171.9, 159.9, 147.0, 131.6, 126.4, 124.1, 121.7, 120.1, 51.4, 36.4, 33.9, 28.8 (due segnali sovrapposti), 28.7, 24.8, 24.7.

ESI-MS (*m/z*): 335 [M+H]⁺; 357 [M+Na]⁺; 373 [M+K]⁺.

4. Parte sperimentale

9-(2-immينو-4-metossibenzo[d]tiazol-3-(2H)-ile)-9-ossnonanoato di metile (4b)



Aspetto: Solido bianco-marroncino; resa 21%

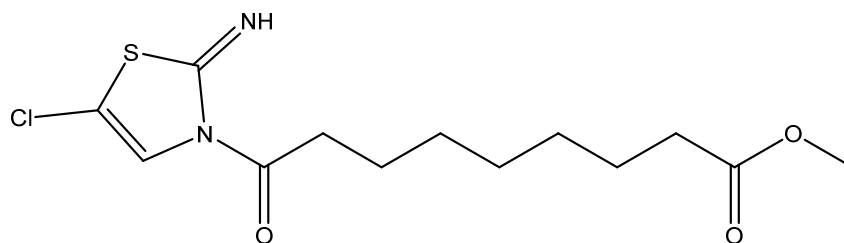
P.f. = 76.5 – 77.3 °C

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.41 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.26 (t, $J=8.2$ Hz, 1H, CH aromatico), 6.89 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, CH aromatico), 3.95 (s, 3H, CH_3OC), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.43 (t, $J=8.7$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.25 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.67-1.60 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.58-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.28-1.16 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.1, 172.0, 158.3, 151.5, 137.0, 132.9, 124.8, 113.5, 107.0, 55.6, 51.4, 36.0, 33.9, 28.83, 28.77, 28.7, 24.7 (due segnali sovrapposti).

ESI-MS (m/z): 365 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 387 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 403 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

**9-(6-cloro-2-imminobenzo[d]tiazol-3-(2H)-ile)-9-ossononanoato di metile
(4c)**



Aspetto: Solido bianco-giallino; resa 22%

P.f. = 132.1 – 132.6 °C

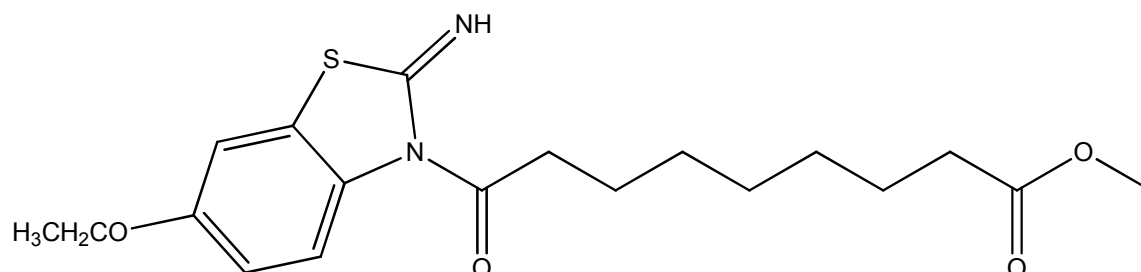
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.81 (d, $J=2.01$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.65 (d, $J=8.6$, 1H, CH aromatico), 7.40 (dd, $J_1=8.6$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, 1H, CH aromatico), 3.66 (s, 3H, COOCH_3), 2.45 (t, $J=7.9$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.28 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.74-1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.63-1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.34-1.20 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.2, 171.8, 159.7, 146.2, 133.2, 129.6, 127.0, 121.3, 121.1, 51.5, 36.4, 34.0, 28.82, 28.79 (due segnali sovrapposti), 24.8 (due segnali sovrapposti).

ESI-MS (m/z): 369 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 391 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 407 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

9-(6-etossi-2-imminobenzo[*d*]tiazol-3-(2H)-ile)-9-ossononanoato di metile (4d)



Aspetto: Solido bianco sporco; resa 40%

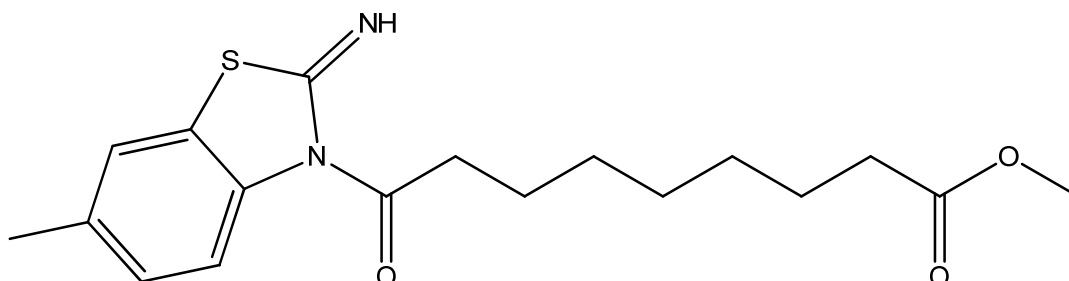
P.f. = 84.5 – 85.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.60 (d, $J=8.9$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.28 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.02 (dd, $J_1=8.9$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 1H, CH aromatico), 4.07 (q, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}$) 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.43 (t, $J=7.7$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.26 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.72-1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.60-1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.43 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}$), 1.29-1.20 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.2, 171.8, 157.9, 156.2, 141.4, 132.8, 120.7, 115.7, 105.1, 64.1, 51.4, 36.3, 33.9, 28.8 (tre segnali sovrapposti), 24.8, 24.7, 14.8.

ESI-MS (m/z): 379 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 401 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 417 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

9-(6-metil-2-imminobenzo[*d*]tiazol-3-(2H)-ile)-9-ossnonanoato di metile (4e)



Aspetto: Solido bianco; resa 38%

P.f. = 109.0 – 109.7 °C

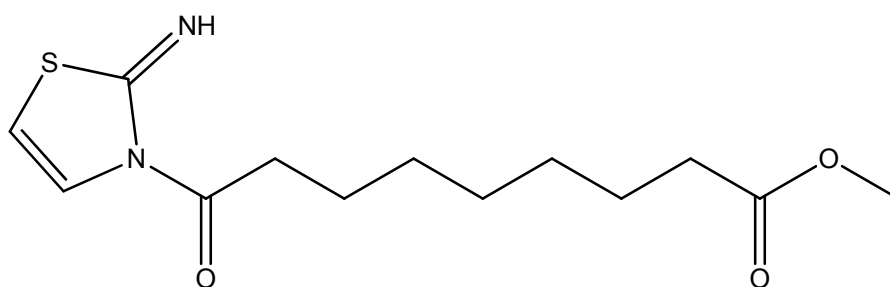
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.63 (s, 1H, CH aromatico), 7.62 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.25 (dd, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=1.6$ Hz, 1H, CH aromatico), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3CCH), 2.44 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.26 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.71-1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.59-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.30-1.18 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.1, 171.9, 159.2, 145.2, 134.1, 131.8, 127.8, 121.4, 119.7, 51.4, 36.3, 33.9, 28.80 (due segnali sovrapposti), 28.76, 24.8, 24.7, 21.4.

ESI-MS (m/z): 349 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 371 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 387 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

9-(2-imminotiazol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (6a)



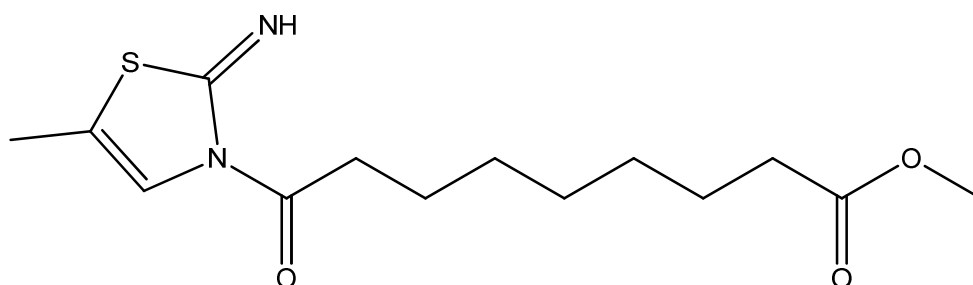
Aspetto: Solido bianco-giallino; resa 55%

P.f. = 105.5 – 105.8 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.42 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.00 (d, $J=3.6$ Hz, 1H, CH aromatico), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.55 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.81-1.72 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.65-1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.43-1.25 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.1, 171.2, 160.3, 135.8, 113.3, 51.4, 36.0, 33.9, 28.94, 28.86, 28.77, 24.9, 24.7.

ESI-MS (m/z): 285 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 307 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 323 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

9-(2-immينو-5-metiltiazol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (6b)

Aspetto: Solido bianco; resa 26%

P.f. = 108.9 – 109.3 °C

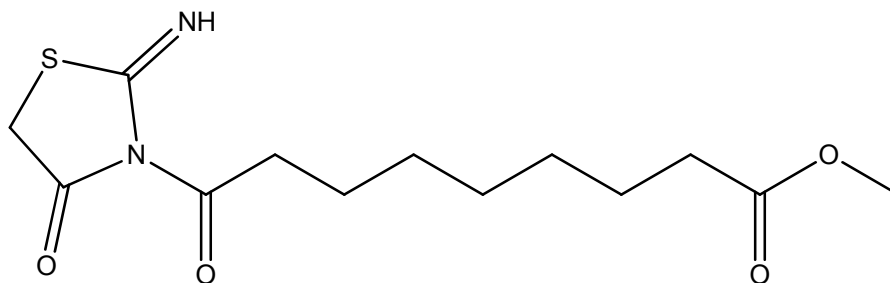
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.02 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, CH aromatico), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.50 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.40 (d, $J=1.2$ Hz, 3H, CH_3CS), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.79-1.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.65-1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.41-1.23 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.1, 171.0, 158.7, 132.5, 127.0, 51.3, 35.9, 33.9, 28.94, 28.89, 28.80, 24.9, 24.7, 11.5.

ESI-MS (m/z): 299 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 321 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 337 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

9-(2-immينو-4-ossotiazol-3-ile)-9-osso-nonanoato di metile (6c)

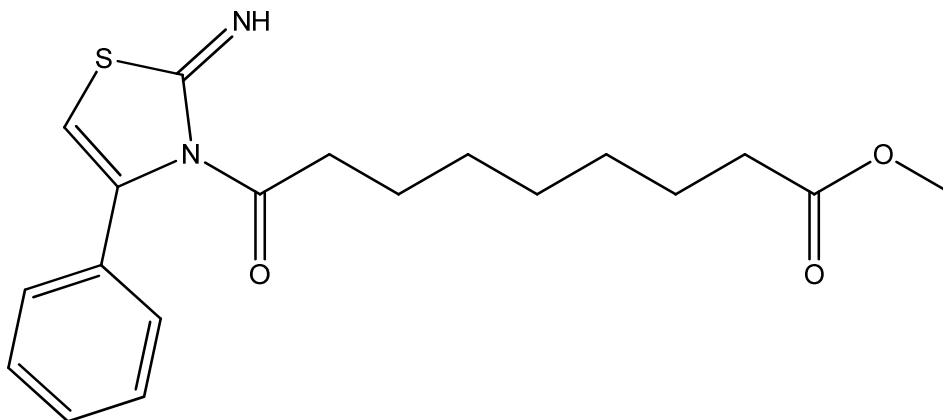


Aspetto: Solido bianco; resa 38%

P.f. = 48.1 – 49.5 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.99 (br.s, 1H, NH), 3.78 (s, 2H, CH_2S), 3.66 (s, 3H, COOCH_3), 2.77 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.29 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.74-1.66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.65-1.57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.41-1.27 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 184.9, 183.9, 175.4, 174.3, 51.5, 36.7, 36.1, 34.0, 28.85, 28.83, 28.6, 24.8, 24.2.

9-(2-immino-4-feniltiazol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (6d)

Aspetto: Solido bianco; resa 29%

P.f. = 114.9 – 115.4 °C

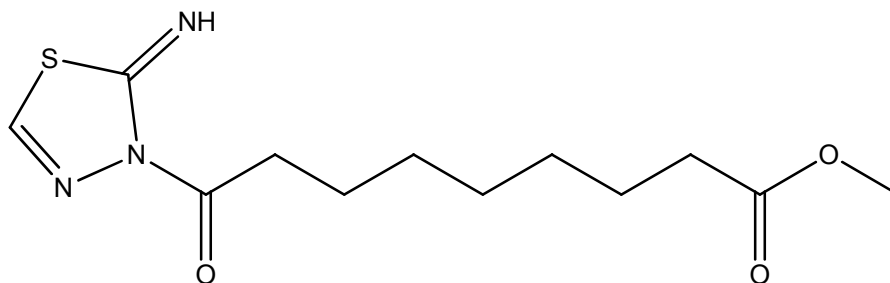
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 11.25 (br.s, 1H, NH), 7.82 (d, $J=7.9$ Hz, 2H, CH aromatici), 7.42 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, CH aromatici), 7.38-7.30 (m, 1H, CH aromatico), 7.15 (s, 1H, CH aromatico), 3.67 (s, 3H, COOCH_3), 2.28 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.96 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH_2CON), 1.63-1.50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.50-1.37 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.35-1.06 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.2, 171.4, 159.5, 149.3, 134.1, 128.9, 128.3, 126.2, 107.8, 51.4, 35.7, 34.0, 28.8, 28.70, 28.66, 24.8, 24.6.

ESI-MS (m/z): 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 383 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 399 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

9-(2-immينو-1,3,4-tiadiazol-3-(2H)-ile)-9-ossnonanoato di metile (6e)



Aspetto: Solido bianco; resa 55%

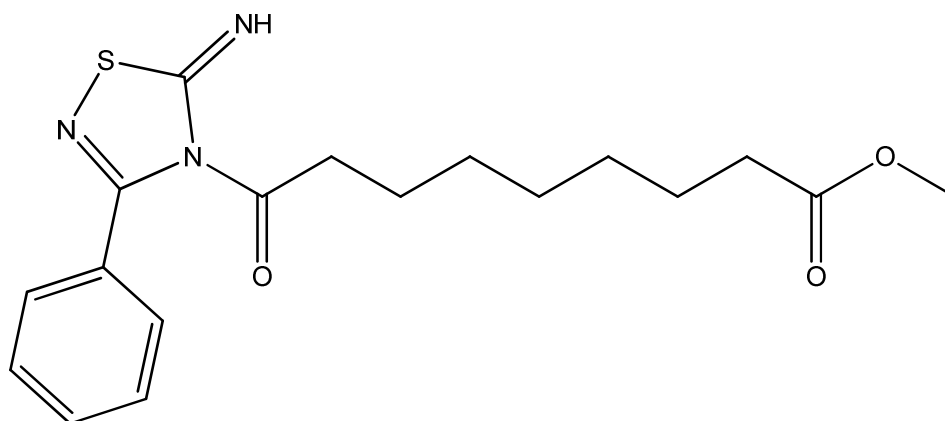
P.f. = 139.0 – 140.0 °C

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 13.46 (br.s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, CH aromatici), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 2.78 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2CON), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.84-1.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.65-1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.46-1.26 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.2, 172.2, 160.6, 147.2, 51.4, 36.1, 34.0, 28.8 (tre segnali sovrapposti), 25.1, 24.8.

ESI-MS (m/z): 286 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 308 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

9-(5-immino-3-fenil-1,2,4-tiadiazol-4-(5H)-ile)-9-ossnonanoato di metile (6f)



Aspetto: Solido bianco; resa 29%

P.f. = 114.9 – 115.4 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 11.02 (br.s, 1H, NH), 8.21-8.17 (m, 2H, CH aromatici), 7.50-7.46 (m, 3H, CH aromatici), 3.68 (s, 3H, COOCH_3), 2.30 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 2.25 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 1.64-1.54 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.31-1.09 (m, 6H, CH_2 alifatici).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 175.8, 174.3, 172.4, 167.0, 132.6, 130.4, 128.8, 127.9, 51.5, 35.6, 33.9, 28.7, 28.63, 28.61, 24.7, 24.5.

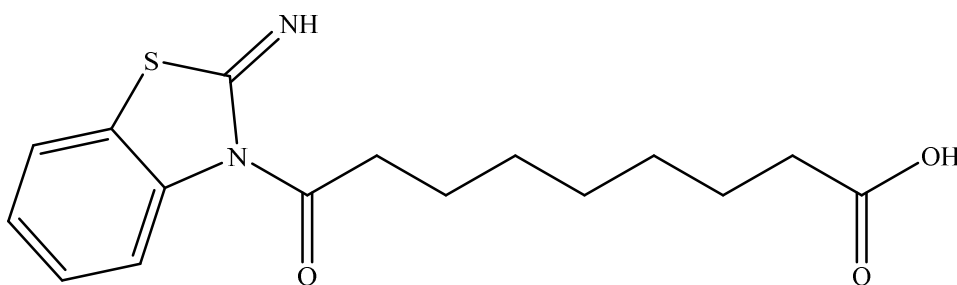
ESI-MS (m/z): 362 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 384 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 400 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

4.4 Sintesi di acido 9-(2-imminobenzo[d]tiazol-3-2H-ile)-9-ossanonanoico (7)

In seguito ai risultati promettenti ottenuti dai saggi biologici sul composto **4a**, si è deciso di sintetizzare per idrolisi il corrispondente acido.

Il composto **4a** viene sciolto in una miscela di 15 mL di CH₃OH e 5 mL di H₂O, quindi si aggiunge una quantità equimolare di LiOH idrato; si lascia sotto agitazione per 3 ore, quindi si controlla che la reazione sia terminata effettuando una TLC (eluente: miscela AcOEt/etere di petrolio = 1/1) e prendendo come riferimento **4a**. Si acidifica con HCl 1 M fino a pH acido che provoca la precipitazione dell'acido in forma di solido bianco. A questo punto si scioglie in AcOEt e si lava la fase organica con brine; si anidrifca e si concentra. Poiché l'analisi ¹H-NMR evidenzia la presenza di impurezze, si cristallizza da CH₃OH/CH₂Cl₂.



Aspetto: Solido bianco; resa 58%

P.f. = 177.9 – 178.4 °C

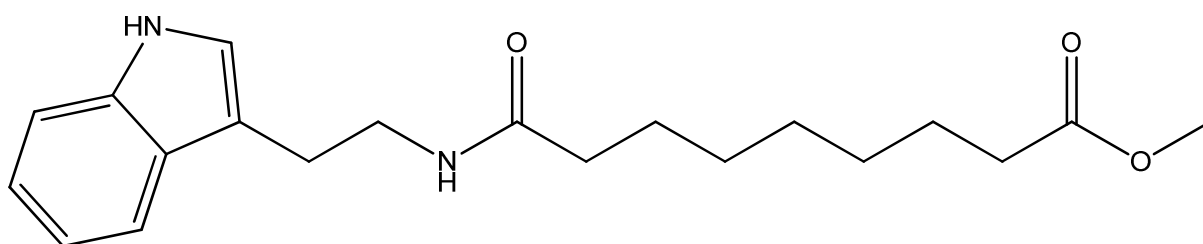
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.88 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, CH aromatico), 7.76 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, CH aromatico), 7.45 (dt, *J*₁=8.4 Hz, *J*₂=1.4 Hz, 1H, CH aromatico), 7.32 (dt, *J*₁=8.0 Hz, *J*₂=1.1 Hz, 1H, CH aromatico), 2.56 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂CON), 2.32 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.82-1.71 (m, 2H, CH₂CH₂CON), 1.70-1.59 (m, 2H, CH₂CH₂COOCH₃), 1.50-1.31 (m, 6H, CH₂ alifatici).

ESI-MS (*m/z*): 321 [M+H]⁺; 343 [M+Na]⁺.

4.5 Sintesi di derivati indolici

Oltre ai derivati azolici sono stati sintetizzati alcuni composti contenenti il nucleo indolico.

Tra questi, il primo ad essere stato sintetizzato è stato il derivato triptamminico: la sintesi è stata effettuata seguendo la stessa procedura utilizzata per gli amminobenzotiazoli e gli amminotiazoli, utilizzando due equivalenti di triptamina ed un equivalente di cloruro acilico.



9-((2-(1*H*-indol-3-ile)etil)ammino)-9-ossnonanoato di metile (**9**)

Aspetto: Solido ceroso; resa 37%

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (br.s, 1H, NH), 7.60 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.39 (d, $J=7.9$ Hz, CH aromatico), 7.21 (t, $J=7.9$ Hz, 1H, CH aromatico), 7.12 (t, 1H, $J=7.7$ Hz, CH aromatico), 7.04 (s, 1H, CH aromatico), 5.65 (br.s, 1H, NH), 3.67 (s, 3H, COOCH_3), 3.61 (q, $J=6.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.99 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.30 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.11 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.66-1.50 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}$), 1.34-1.20 (m, 6H, CH_2 alifatici).

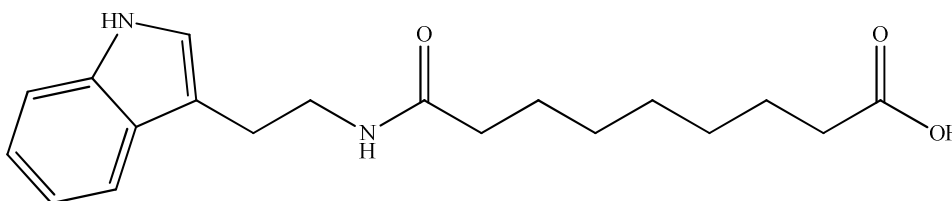
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 174.4, 173.5, 136.4, 127.3, 122.1, 122.0, 119.3, 118.5, 112.6, 111.3, 51.5, 39.7, 36.5, 34.0, 28.9 (due segnali sovrapposti), 28.8, 25.6, 25.2, 24.7.

ESI-MS (m/z): 345 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 367 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 383 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

4. Parte sperimentale

Acido 9-((2-(1H-indol-3-ile)etil)ammino)-9-ossnonanoico (10)

Il composto **9** è stato derivatizzato nel corrispondente acido per trattamento con LiOH monoidrato: la reazione è stata effettuata a temperatura ambiente aggiungendo un eccesso di LiOH al prodotto di partenza sciolto in 30 mL di una miscela di THF al 20% v/v in acqua. Trascorse 3 ore, si acidifica con HCl al 10% fino a pH < 7, quindi si estrae in etile acetato e si anidrifca; dopo concentrazione al rotavapor si ottiene un solido marroncino chiaro.



Aspetto: Solido marroncino; resa 86%

P.f. = 88.0 – 91.4 °C

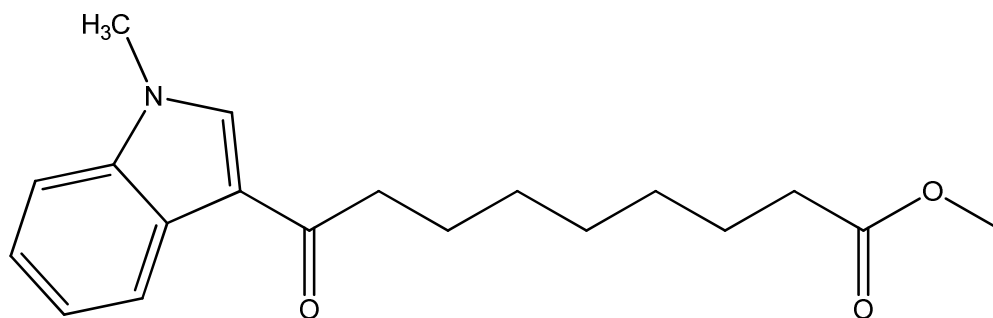
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (br.s., 1H, NH), 7.58 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.37 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, CH aromatico), 7.19 (dt, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, CH aromatico), 7.11 (dt, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, CH aromatico), 7.01 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, CH aromatico), 5.63 (br.s., 1H, $J = 5.6$ Hz, NHCH_2), 3.60 (q, 2H, $J = 6.2$ Hz), 2.96 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.38-2.28 (m, 4H), 2.09 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 1.69-1.48 (m, 6H, CH alifatici), 1.39-1.29 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 179.0, 173.5, 173.4, 127.3, 122.2, 122.1, 119.4, 118.6, 112.7, 111.3, 39.6, 36.7, 33.9, 30.3, 28.8, 28.7, 25.5, 25.2, 24.6.

ESI-MS (m/z): 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 353 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 369 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

9-(1-metil-1*H*-indol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (12)

Oltre ai tiazoli e ai benzotiazoli sono stati sintetizzati alcuni derivati indolici; il primo substrato utilizzato è stato l'*N*-metil-indolo, con una reazione mediata da catalisi acida con un acido di Lewis: 0,5 mmol di cloruro acilico preattivato per circa 15 minuti con AlCl₃ (80 mg). La reazione è stata condotta in 5 mL di CHCl₃ e l'avanzamento è stato monitorato via TLC (eluente: etere etilico) effettuata su un prelievo sottoposto ad estrazione con acqua basica (NaHCO₃ al 10%, pH=8) e diluizione in CH₂Cl₂. Dopo circa 3,5 ore la miscela di reazione è stata trattata con 5 mL di acqua e si basifica fino a pH=8 utilizzando una soluzione al 10% w/w di NaHCO₃. Il prodotto d'interesse è stato purificato tramite FC utilizzando una miscela eluente 7/3=etere etilico/etere di petrolio: dopo la concentrazione si presenta solido cristallino di colore rossastro.



Aspetto: Solido cristallino rossastro; resa 19%

P.f. = 43.4 - 44.9 °C

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.40-8.37 (m, 1H, CH aromatico), 7.72 (s, 1H, CH aromatico), 7.35-7.28 (m, 3H, CH aromatici), 3.84 (s, 3H, CH₃N), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.82 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂CON), 2.30 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.80-1.74 (m, 2H, CH₂CH₂CON), 1.66-1.59 (m, 2H, CH₂CH₂COOCH₃), 1.44-1.30 (m, 6H, CH₂ alifatici).

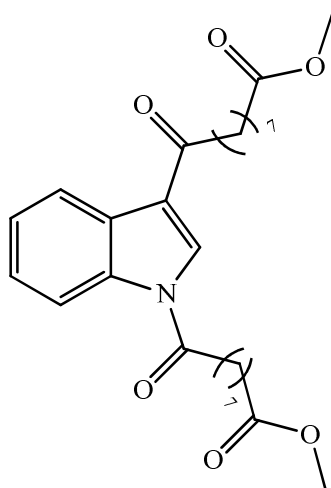
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 195.9, 174.3, 137.4, 135.2, 126.3, 123.2, 122.6, 122.5, 116.6, 109.5, 51.4, 39.8, 34.0, 33.4, 29.3, 29.1, 28.9, 25.1, 24.9.

ESI-MS (*m/z*): 315 [M+H]⁺; 338 [M+Na]⁺; 354 [M+K]⁺.

4. Parte sperimentale

9,9'-(1*H*-indol-1,3-diile)-bis(9-ossnonanoato di metile) (14)

La sintesi del diaddotto è stata effettuata per trattamento con un reagente di Grignard utilizzando il cloruro acilico in eccesso. In pallone a 3 colli anidrificato, munito di due imbuto gocciolatori e posto sotto battente di azoto viene aggiunto CH_3MgBr 2M in THF (0,65 mL; 1,3 mmol), mentre l'indolo (0,146 g; 1,25 mmol) sciolto in THF viene fatto gocciolare lentamente attraverso l'imbuto. La soluzione assume una colorazione azzurra che vira verso il giallo quando viene addizionato il cloruro acilico: dopo 20 minuti si lasciano gocciolare due equivalenti del composto **2** (5 mL; 2,5 mmol) in CH_2Cl_2 anidro. L'avanzamento della reazione viene controllato tramite TLC, prelevando una aliquota della miscela che viene diluita con etere etilico e acqua (al fine di spegnere il reagente di Grignard). Dopo circa due ore si effettua estrazione con una soluzione satura di NH_4Cl e due lavaggi con acqua; la fase organica viene anidrificata e concentrata, ottenendo un olio giallo. Il grezzo viene infine separato per via cromatografica su colonna di gel di silice, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etere etilico = 7/3.



Aspetto: Solido bianco; resa 15%

P.f. = 81.0 – 82.1 °C

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.42-8.38 (m, 1H, CH aromatico), 8.36-8.32 (m, 1H, CH aromatico), 8.10 (s, 1H, CHNCO), 7.42-7.37 (m, 2H, CH aromatici), 3.66 (s, 6H, COOCH_3), 3.00 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J=7.3$), 2.35-2.27 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 1.93-1.20 (m, 20H, CH alifatici).

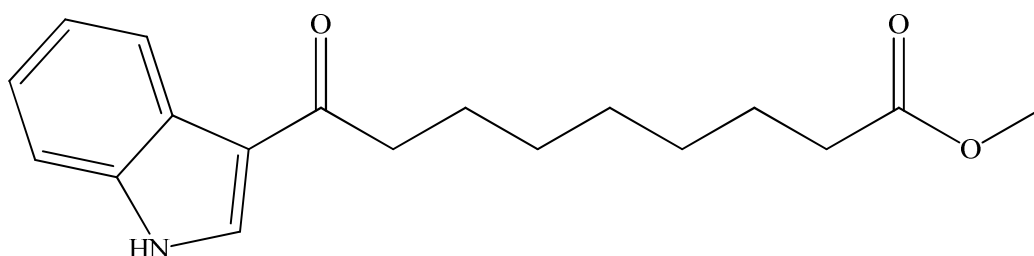
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 223.2, 196.5, 174.2, 171.5, 136.1, 129.9, 127.3, 126.2, 125.0, 122.5, 121.5, 116.2, 51.47, 51.45, 40.1, 35.8, 34.00, 33.99, 29.2, 29.1, 29.0, 28.95, 28.90, 28.87, 24.8, 24.3, 24.25.

ESI-MS (m/z): 486 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 508 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 524 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

9-(1*H*-indol-3-ile)-9-ossnonanoato di metile (15)

L'alchilazione dell'indolo è stata effettuata seguendo diverse procedure; di seguito si riporta l'unica che ha permesso di isolare il prodotto in quantità non trascurabili.

La reazione prevede un primo step di deprotonazione dell'azoto indolico: si sciolgono 58,5 mg (0,5 mmol) di indolo in 5 mL di THF anidro e si aggiunge un equivalente (0,13 mL) di una soluzione 3 M di CH₃MgBr che rende la soluzione di un colore blu sempre più intenso. Dopo 15 minuti si aggiungono 0,5 mL (0,5 mmol) di ZnCl₂ in etere etilico 1 M: si vede la formazione di un precipitato bianco, probabilmente imputabile alla presenza di un sale di magnesio; trascorsi 30 minuti, infine, si aggiungono 0,5 mmol di cloruro acilico. Il colore della miscela passa da blu a marrone fino a rosso-arancio e diventa sempre più opaca. Dopo 2 ore si effettua il *quenching* con 5 mL di soluzione satura di NH₄Cl e si separa la fase organica che viene lavata prima con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e poi con brine. Si anidrifica su MgSO₄ e si concentra, ottenendo un olio marroncino.



Aspetto: olio marroncino; resa 10%

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.9 (br.s, 1H, NH), 8.41-8.39 (m, 1H, CH aromatico), 7.86 (d, *J*=3.0 Hz, 1H, CH aromatico), 7.42-7.40 (m, 1H, CH aromatico), 7.30-7.27 (m, 2H, CH aromatici), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.85 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, CH₂COCCHNH), 2.30 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.81-1.75 (m, 2H, CH₂CH₂COCHNH), 1.65-1.58 (m, 2H, CH₂CH₂COOCH₃), 1.44-1.27 (m, 6H, CH₂ alifatici).

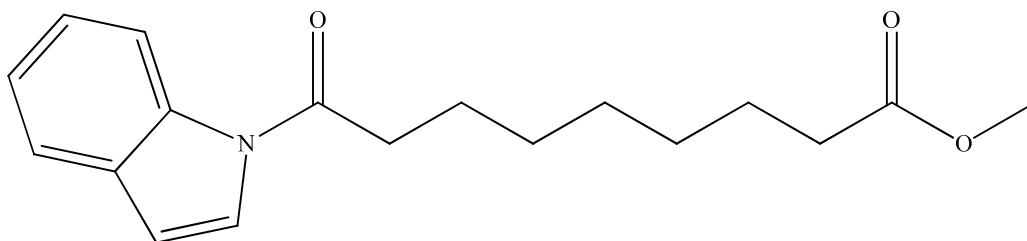
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 196.6, 174.4, 136.4, 131.1, 125.5, 123.6, 122.6, 122.4, 118.1, 111.3, 51.5, 39.8, 34.0, 29.3, 29.1, 29.0, 25.1, 24.9.

ESI-MS (*m/z*): 302 [M+H]⁺, 324 [M+Na]⁺, 340 [M+K]⁺.

4. Parte sperimentale

9-(1*H*-indol-1-ile)-9-ossnonanoato di metile (16)

La reazione per la sintesi del derivato *N*-acilato viene effettuata a 100 °C in bagno di olio in pallone munito di refrigerante a bolle, utilizzando come solvente la dimetilformammide; si aggiungono 0,220 g (1 mmol) di 2-iodoanilina, 0,45 mL (2 mmol) di bis-trimetilsilil-acetilene, 323 mg (1 mmol) di *n*-Bu₄NCl, 0,41 g (5 mmol) di NaOAc e circa 4 mg di Pd(OAc)₂. Trascorse 20 ore, si diluisce la miscela con etere etilico e si estrae con NH₄Cl e con brine; la fase organica viene anidrificata e concentrata, dando un liquido giallo-arancio. Il grezzo viene quindi sottoposto a FC, utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etile acetato = 9/1; le varie frazioni isolate vengono analizzate al fine di recuperare il 3-trimetilsil-indolo. Il derivato sililato viene fatto reagire con il cloruro acilico 2 aggiunto in quantità equimolare; questo step viene condotto direttamente in pallone da distillazione alla temperatura di 57 °C in modo da allontanare il (CH₃)₃SiCl man mano che si forma. Il grezzo di reazione viene diluito con diclorometano e purificato su colonna (eluente: miscela etere di petrolio/etere etilico = 6/4); vengono isolati sia il prodotti di attacco al carbonio che all'azoto.



Aspetto: Solido marroncino

P.f. = 71.8 – 73.4 °C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.5 (d, 1H, *J*=8.5, CH aromatico), 7.56 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, CH aromatico), 7.46 (d, 1H, *J*=3.7 Hz, CH aromatico), 7.35 (dt, 1H, *J*₁=7.9 Hz, *J*₂=1.2 Hz, CH aromatici), 7.27 (dt, 1H, *J*₁=8.0 Hz, *J*₂=1.0 Hz, CH aromatici), 6.64 (d, 1H, *J*=3.8 Hz, CH aromatici), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 2.91 (t, *J*=7.3 Hz, 2H, CH₂CON), 2.34-2.28 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂COOCH₃), 1.84 (q, 2H, *J*=7.4 Hz, CH₂CH₂CON), 1.68-1.58 (m, 2H, CH₂CH₂COOCH₃), 1.50-1.30 (m, 6H, CH₂ alifatici).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 174.2, 171.5, 135.6, 130.3, 125.0, 124.5, 123.5, 120.7, 116.6, 108.9, 51.4, 35.7, 34.0, 28.98, 28.96, 28.89, 24.8, 24.5.

MS (EI) *m/z* (%): 301 (M⁺), 117 (100).

Test biologici

Colture cellulari

Le cellule HT29 (provenienti da una linea di adenocarcinoma di colon umano) vengono sospese in terreno completo [costituito da: 89% terreno non completo RPMI 1640 (GE Healthcare), 10% siero fetale bovino FBS (GE Healthcare) e 1% L-glutammina 200 mM (Sigma-Aldrich)], quindi vengono seminate in piastre Petri alla concentrazione di 10000-20000 cellule/cm². La linea viene mantenuta in incubatore a una temperatura di 37 °C e pressione atmosferica, in ambiente umido con CO₂ al 5%; una volta raggiunta la confluenza si procede allo *splittaggio* delle cellule, ossia la diluizione e divisione in due o più fiasche: si rimuove il terreno di coltura, si effettuano due lavaggi con tampone fosfato PBS sterile (NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KCl 0,2 g/L e KH₂PO₄) e si utilizza un enzima, la tripsina (0,125% in soluzione 0,2% di EDTA, Seromed), in grado di staccare le cellule, di cui si aggiunge un volume tale da permettere di ricoprire l'intera superficie di adesione (circa 1 mL). Dopo aver lasciato la fiasca per alcuni minuti in incubatore si neutralizza la tripsina con alcuni mL di terreno di coltura e le cellule sospese vengono contate nell'emocitometro (camera) di Burker.

Saggio MTT

La determinazione dell'IC₅₀, ossia la concentrazione di prodotto che inibisce la crescita cellulare del 50%, avviene tramite saggio MTT, un test citotossico colorimetrico basato sull'utilizzo di un composto (l'MTT appunto: bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) la cui colorazione varia in funzione della vitalità cellulare, permettendo quindi di risalire all'attività della molecola in esame per via spettrofotometrica.

Le HT-29 vengono inoculate in piastre multiwell da 96 pozzetti alla concentrazione di 15000 cellule per pozzetto, aggiungendo in ciascuno un volume totale pari a 200 µL di soluzione di terreno di coltura contenente le cellule, quindi per 30 pozzetti serviranno 6 mL di soluzione: poiché si calcola di dover utilizzare 0,47 mL di soluzione di HT-29 e 0,53 mL per le IGROV, si aggiungono solo 5,5 mL di terreno di coltura a ciascuna. A questo punto si procede con l'inoculo della soluzione e si lascia la multiwell in incubatore per 24 ore. Prima dell'inoculo viene effettuata la conta delle cellule tramite

4. Parte sperimentale

camera di Burker per calcolare la quantità di soluzione da prelevare, ricavata per proporzione conoscendo il numero di cellule contenute in 1 mL.

Le cellule vengono trattate con soluzioni a concentrazioni crescenti dei composti in esame (da 1 a 100 μM), preparate per diluizione da due soluzioni *stock* ottenute sciogliendo gli stessi in DMSO o etanolo (in genere, si utilizzano concentrazioni comprese tra 15 e 60 mM) e lasciate in incubatore per altre 24 ore. Il giorno successivo si aspira il surnatante e si aggiungono, in ciascun pozzetto, 100 μL di soluzione di MTT 0,2 mg/mL in PBS sterile, quindi si ripone il multiwell in incubatore per 2 ore; il sale di tetrazolio è un composto di colore giallo che diventa substrato dell'enzima succinato deidrogenasi, presente solo nei mitocondri delle cellule vitali, riducendosi in tal modo a formazano, un sale visibile in forma di cristalli viola. Trascorso il tempo di attesa, l'MTT in eccesso viene rimosso e i cristalli di formazano formati vengono solubilizzati in 200 μL di isopropanolo, quindi si tiene la piastra sotto agitazione al buio per 20-30 minuti per facilitare la dissoluzione del solido. Il multiwell viene quindi inserito nello spettrofotometro Victor Wallac, il quale misura l'assorbanza di ciascun pozzetto ad una lunghezza d'onda di 595 nm, utilizzando come bianco un pozzetto contenente solo 200 μL di isopropanolo: un valore elevato di assorbanza corrisponde ad un colore viola più intenso e di conseguenza a maggiore vitalità cellulare. Elaborando i dati ottenuti si risale alla concentrazione che inibisce il 50% delle cellule, ossia l'IC₅₀.

Analisi in microscopia

Le cellule HT-29 vengono inoculate in multiwell da 6 di 9 cm² seguendo la stessa procedura utilizzata per il saggio MTT e tenute in incubatore per 24 ore per poter aderire; si effettua quindi il trattamento somministrando le soluzioni a 50 e 200 μM dei prodotti da analizzare e si ripongono in incubatore. Trascorse altre 24 ore si aggiunge una soluzione di DAPI (2-(4-ammidinofenil)-1*H*-indolo-6-carbossammidino) di 5 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO e si lascia per 15 minuti in modo da permettere l'intercalazione nei nuclei. Il surnatante viene quindi eliminato e le cellule vengono lavate con tampone fosfato (PBS). Le cellule vive vengono analizzate al microscopio fluorescente (Axiovert 40 CFL Zeiss) tramite due acquisizioni, una in campo chiaro, che permette di osservare la morfologia ed il grado di aggregazione delle cellule, ed una in fluorescenza per visualizzare l'emissione del DAPI, permettendo così una analisi del DNA contenuto nei nuclei delle cellule. Le

due immagini vengono quindi sovrapposte tramite la tecnica del merge, attraverso la quale si evidenziano le cellule i cui nuclei appaiono blu nel punto in cui la sonda è intercalata nel DNA.

Valutazione dell'attività antibatterica/antifungina

La valutazione dell'attività biologica nei confronti di microrganismi è stata effettuata utilizzando come substrati due batteri (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, rispettivamente di tipo Gram negativo e Gram positivo) e due funghi (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*), e sono stati selezionati cinque composti da sottoporre all'analisi: **4a**, **6a**, **6e**, **10** e 9(R)-9-HSA. I saggi sono stati svolti con due metodi diversi, descritti di seguito.

- a) **Metodo 1:** Prove su piastre agarizzate contenenti i composti a diverse concentrazioni scalari

I cinque composti sono stati disciolti in DMSO in modo da ottenere una stock solution alla concentrazione di 20 mg/mL, mentre come controllo positivo sono stati utilizzati gli antibiotici ampicillina (da una stock di 5 mg/mL in acqua), attivo su *E. coli* e *S. aureus*, e anfotericina B (da una stock di 10 mg/mL in DMSO), attivo su *C. albicans* e *A. niger*. I composti, gli antibiotici ed il solo solvente sono stati aggiunti direttamente al terreno fuso (ad una temperatura di 55°C) ed il tutto è stato trasferito in piastre Petri da 6 cm e lasciato solidificare. Le concentrazioni saggiate dei composti sono state: 100, 50, 25, 12.5 µg/mL; per ampicillina si è utilizzata la concentrazione di 25µg/mL, mentre per anfotericina B di 50µg/mL. Sulle piastre di terreno contenenti i composti alle diverse concentrazioni sono stati infine inoculati 20 µL di una sospensione batterica/fungina 10⁶ CFU/mL per ciascun microorganismo e le piastre sono state incubate a 37°C per 24h (*E. coli* e *S. aureus*) e 30°C per 48h (*C. albicans* e *A. niger*). E' stata quindi osservata la crescita microbica in piastra, e confrontata con i rispettivi controlli.

4. Parte sperimentale

b) **Metodo 2:** Prove col metodo della diffusione in agar (metodo “Kirby bauer”)

Su piastre Petri di terreno solido sono stati inoculati 100 μL di una sospensione batterica/fungina 10^6 CFU/mL per ciascun microorganismo e sono stati posti dei dischetti di cotone precedentemente imbevuti con 20 μL delle soluzioni 5 mg/mL in DMSO di ciascun composto. Come controllo positivo sono stati utilizzati anche in questo caso gli antibiotici ampicillina 5mg/mL (per *E. coli* e *S. aureus*) e anfotericina B 5mg/mL (per *C. albicans* e *A. niger*); è stato inoltre allestito un controllo solvente (DMSO). Le piastre sono state incubate a 37°C per 24h (*E. coli* e *S. aureus*) e 30°C per 48h (*C. albicans* e *A. niger*), quindi è stata valutata la crescita microbica, confrontata con i controlli.

5 Bibliografia

- ¹ Rubin, H. *Science*, **2001**, *21*, 2477-2478.
- ² Riggs A.D.; Russo V.E.A; Martienssen R.A. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, Plainview, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- ³ Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A.; Jones, P.A. *Nature*, **2004**, *429*, 457-463.
- ⁴ Takai, D.; Jones, P.A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 3740-3745.
- ⁵ Bernstein B.E.; Meissner, A.; Lander, E.S. *Cell*, **2007**, *128*, 669-681.
- ⁶ Kazantsev, A.G.; Thompson L.M. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*, 854-868.
- ⁷ Tamaru, H.; Selker, E.U. *Nature*, **2001**, *414*, 277-283.
- ⁸ Jackson, J.P.; Lindroth, A.M.; Cao, X.; Jacobsen, S.E. *Nature*, **2002**, *416*, 556-560.
- ⁹ Malagnac, F.; Bartee, L.; Bender, J. *EMBO J.*, **2002**, *21*, 6842-6852.
- ¹⁰ Esteller, M. *Nat. Rev. Genet.*, **2007**, *8*, 286-298.
- ¹¹ Esteller, M. Epigenetics in cancer. *NEJM*, **2008**, *358*, 1148-1159.
- ¹² Guil, S; Esteller, M. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2009**, *41*, 87-95.
- ¹³ Constantinides, P. G.; Jones, P.A.; Gevers, W. *Nature*, **1977**, *267*, 364-366.
- ¹⁴ Jones, P.A.; Taylor, S.M. *Cell*, **1980**, *20*, 85-93.
- ¹⁵ Fraga, M.F.; Ballestar, E.; Villar-Garea, A.; Boix-Chornet, M; Espada, J.; Schotta, G.; Bonaldi, T.; Haydon, C.; Roperio, S.; Petrie, K.; Iyer N. G.; Pérez-Rosado A.; Calvo, E.; Lopez, J. A.; Cano, A.; Calasanz, M. J.; Colomer, D.; Piris, M. A.; Ahn, N.; Imhof, A.; Caldas, C.; Jenuwein, T.; Esteller, M. *Nat. Genet.*, **2005**, *37*, 391-400.
- ¹⁶ Seligson, D.B.; Horvath, S; Shi, T.; Yu, H.; Tze, S.; Grunstein, M.; Kurdistani, S.K. *Nature*, **2005**, *435*, 1262-1266.
- ¹⁷ Luger, K.; Mader, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. *Nature*, **1997**, *389*, 251.
- ¹⁸ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, NY, Garland Science, 2002.
- ¹⁹ Wagner, J.M.; Björn, H.; Lübbert, M.; Jung, M. *Clin. Epigen.*, **2010**, *1*, 117-136.
- ²⁰ Weichert, W.; Roske, A.; Niesporek, S.; Noske, A.; Buckendahl, A. C.; Dietel, M.; Gekeler, V.; Boehm, M.; Beckers, T.; Denkert, C. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 1669-1677.
- ²¹ Wilson, A.J.; Byun, D.S.; Popova, N.; Murray, L. B.; L'Italien, K.; Sowa, Y.; Arango, D.; Velcich, A.; Augenlicht, L. H.; Mariadson, J. M. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 13548-13558.

5. Bibliografia

- ²²Bhaskara, S.; Chyla, B.J.; Amann, J.M.; Knutson, S. K.; Cortez, D.; Sun, Z. W.; Hiebert, S. W. *Mol. Cell.*, **2008**, *30*, 61–72.
- ²³Wilson, A.J.; Byun, D.S.; Nasser, S.; Murray, L. B.; Ayyanar, K.; Arango, D.; Figueroa, M.; Melnick, A.; Kao, G. D.; Augenlicht, L. H.; Mariadson, J. M. *Mol. Biol. Cell.* **2008**, *19*, 4062–4075.
- ²⁴Mottet, D.; Bellahcene, A.; Pirotte, S.; Waltregny, D.; Deroanne, C.; Lamour, V.; Lidereau, R.; Castronovo, V. *Circ. Res.*, **2007**, *101*, 1237–1246.
- ²⁵Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I. *Cancer Lett.*, **2008**, *277*, 8–21.
- ²⁶Ellis, L.; Atadja, P.W.; Johnstone, R.W. *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, *8*, 1409–1420.
- ²⁷Michan, S.; Sinclair, D. *Biochem. J.*, **2007**, *404*, 1–13.
- ²⁸Saunders, L.R.; Verdin, E. *Oncogene*, **2007**, *26*, 5489–5504.
- ²⁹Pruitt, K.; Zinn, R.L.; Ohm, J.E.; McGarvey, K. M.; Lang, S. H. L.; Watkins, D. N.; Herman, J. G.; Baylin, S. B. *PLoS Genet.*, **2006**, *2*, 344–352.
- ³⁰Bolden, J.E.; Peart, M.J.; Johnstone, R.W. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 769–784.
- ³¹Zhang, B.; Strauss, A. C.; Chu, S.; Li, M.; Yinwei, H.; Shiang, K. D.; Snyder, D. S.; Heuttner, C. S.; Shultz, L.; Holyoake, T.; Bhatia, R. *Cancer Cell.*, **2010**, *17*, 427–442.
- ³²Leder, A.; Orkin, S.; Leder, P. *Science*, **1975**, *190*, 893–894.
- ³³Richon, V.M.; Sandhoff, T. W.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 10014–10019.
- ³⁴Zafonte, B.T.; Hulit, J.; Amanatullah, D.F.; Albanese, C.; Wang, C.; Rosen, E.; Reutens, A.; Sparano, J.A.; Lisanti, M.P.; Pestell, R.G. *Front. Biosci.*, **2000**, *5*, 938–961.
- ³⁵Bradner, J.E.; West, N.; Grachan, M. L.; Greenberg, E. F.; Haggarty, S. J.; Warnow, T.; Mazitschek, R. *Nat. Chem. Biol.*, **2010**, *6*, 238–243.
- ³⁶Göttlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Kramer, O. H.; Schimpf, A.; Giovara, S.; Sleeman, J. P.; Lo Coco, F.; Nervi, C.; Pelicci, P. G.; Heinzl, T. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 6969–6978.
- ³⁷Bressi, J.C.; Jennings, A. J.; Skene, R.; Wu, Y.; Melkus, R.; De Jong, R.; O'Connell, S.; Grimshaw, C. E.; Navre, M.; Gangloff, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 3142–3145.
- ³⁸Hess-Stump, H.; Brackera, T. U.; Hendersonb, D.; Politz, O. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *39*, 1388–1405.
- ³⁹Fournel, A.; Bonfils, C.; Hou, Y.; Yan, P. T.; Tracy-Bourget, M. C.; Kalita, A.; Liu, J.; Lu, A. H.; Zhou, N. Z.; Robert, M. F.; Gillespie, J.; Wang, J. J.; Ste-Croix, H. S.; Rahil, J.; Lefebvre, S.; Moradei, O.; Delorme, D.; MacLeod, A. R.; Besterman, J. M.; Li, Z.

Mol. Cancer Ther., **2008**, *7*, 759–768.

- ⁴⁰Galeotti, T.; Borrello, S.; Masotti, L. *Oxygen radicals: Systemic events and disease processes* (eds. Das, Essman), Karger, Basel, **1990**, 129-148.
- ⁴¹Klaunig, J. E.; Kamendulis, L. M. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2004**, *44*, 239-267.
- ⁴²Masotti, L.; Casali, E.; Galeotti, T. *Free Radical Biol. Med.*, **1988**, *4*, 377-386.
- ⁴³Casali, E.; Cavalli, G.; Spisni, A.; Masotti, L. *Rec. Adv. Cell. Mol. Biol.*, **1992**, *6*, 245-250.
- ⁴⁴Casali, E.; Gesmundo, N.; Farruggia, G.; Boga, C.; Masotti, L. *It. Biochem. Soc. Trans.*, **1999**, *13*, 291.
- ⁴⁵Parolin, C.; Calonghi, N.; Presta, E.; Boga, C.; Caruana, P.; Naldi, M.; Andrisano, V.; Masotti, L.; Sartor, G. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1821*, 1334-1340.
- ⁴⁶Yadav, P. S.; Devprakash; senthilkumar, G. P. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, **2011**, *3*, 1-7.
- ⁴⁷Khokra, S. L.; Arora, K.; Mehta, H.; Aggarwal, A.; Yadav, M. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2011**, *2*, 1356-1377 e referenze ivi citate.
- ⁴⁸Jena, J. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2014**, *6*, 16-22 e referenze ivi citate.
- ⁴⁹Sharma, V.; Kumar, P.; Pathak, D. *J. Heterocycl. Chem.*, **2010**, *47*, 491-502 e referenze ivi citate.
- ⁵⁰Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 165-195.
- ⁵¹Forlani, L.; De Maria, P.; Foresti, E.; Pradella, G. *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 3178-3181.
- ⁵²Seenaiyah, D.; Reddy, P. R.; Reddy, G. M.; Padmaja, A.; Padmavathi, V.; Krishna, N. S. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *77*, 1-7.
- ⁵³Kosmacheva, L. P.; Ambartsumova, R. F. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **1986**, *22*, 683.
- ⁵⁴Chugunova, E.; Boga, C.; Sazykin, i.; Cino, S.; Micheletti, G.; Mazzanti, A.; Sazykina, M.; Burirov, A.; Khmelevtsova, L.; Kostina, N. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *93*, 349-359.
- ⁵⁵Logers, M.; Overman, L. E.; Welmaker, G. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9139-9150.
- ⁵⁶Bergman, J.; Venemalm, L. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 3741-3744.
- ⁵⁷Okauchi, T.; Itonaga, M.; Minami, T.; Owa, T.; Kitoh, K.; Yoshino, H. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 1485-1487.
- ⁵⁸Larock, R. C.; Yum, E. K.; Refvik, M. D. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7652-7662.
- ⁵⁹Riss, T. L.; Moravec, R.A.; Niles, A. L.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L.; Storts, D.; Reid, Y.. *Assay Guidance Manual [Internet]*, eds. Sittampalam, G.S.;

5. Bibliografia

Coussens, N.P.; Nelson, H. *et al.*, Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, **2004**.

⁶⁰ Hamada, S.; Fujita, S. *Histochemistry*, **1983**, 79, 219-226.