

Università degli Studi di Salerno
Dottorato di ricerca in Biochimica e Patologia dell'Azione dei Farmaci
VIII ciclo nuova serie 2006-2010

Université Paris Descartes
Doctorat en Sciences Pharmaceutiques

Progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di nuovi carbazoli

Dottoranda: Mariangela Marrelli

Abstract

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso il laboratorio di Fitofarmacia del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università della Calabria e presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes di Parigi.

L'attività di ricerca è stata dedicata alla sintesi di nuovi carbazoli concepiti come analoghi dello stilbene naturale combretastatina A-4 (CA-4) ed alla successiva valutazione dell'attività biologica *in vitro* dei composti ottenuti.

Presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes erano stati già sintetizzati degli analoghi eterociclici della combretastatina A-4, dotati di buona attività biologica. Obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare analoghi dei composti precedentemente ottenuti, apportando ulteriori modifiche strutturali atte a migliorarne le proprietà biologiche, al fine di completare lo studio delle relazioni struttura-attività di questa serie di molecole. Nel corso dei precedenti lavori erano stati sintetizzati dei nuovi 3-arilindoli, concepiti quali analoghi eterociclici della CA-4 e, successivamente, una serie di 5-(3',4',5'-trimetossifenil)pirrolo[3,4-a]carbazoli-1,3(2*H*,10*H*)-dioni, concepiti come analoghi *cis-blocked* dei 3-arilindoli ed arilindoli ottenuti. Alcune di queste molecole avevano mostrato *in vitro* una buona attività biologica.

Obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare nuovi carbazoli, analoghi « aperti » della precedente serie, in modo da ridurre l'ingombro sterico a livello dell'anello benzenico che caratterizzava i carbazoli ed i tetraidrocarbazoli già realizzati, al fine di ottenere dei composti che esplicassero una migliore attività biologica.

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, concepita come modello sperimentale. Per la sintesi delle molecole è stata impiegata una procedura descritta da Noland e collaboratori nel 1996, con qualche opportuna modifica. La realizzazione di questa prima serie di molecole è stata fondamentale, poiché ha consentito di mettere a punto percorsi di sintesi adeguati alla realizzazione di molecole più complesse.

Una seconda serie di molecole è stata infatti realizzata, successivamente, a partire dal 6-metossindolo, al fine di ottenere, sulla base di relazioni struttura-attività note, molecole dotate di attività biologica superiore a quella mostrata dalle molecole della prima serie non sostituite.

Nel corso del lavoro di tesi sono stati dunque sintetizzati nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli a partire dall'indolo semplice e, in seguito, una seconda serie di molecole a partire dal 6-metossindolo.

Molti tentativi sono stati compiuti al fine di ottenere molecole non benzilate sull'anello della maleimide, che fossero caratterizzate da un minor ingombro sterico, ma gli esperimenti non hanno condotto ai risultati attesi. Tale obiettivo è stato raggiunto, infine, realizzando le medesime procedure di sintesi a partire dal 6-bromoindolo: è stato possibile così sintetizzare nuovi composti a partire direttamente dalla maleimide anziché dalla *N*-benzilmaleimide, e che presentano pertanto un anello aromatico in meno rispetto ai precedenti analoghi.

Al fine di valutare la potenziale attività antitumorale legata a proprietà antivascolari delle molecole sintetizzate, si è provveduto alla determinazione della citotossicità *in vitro* ed alla valutazione degli effetti inibitori sulla polimerizzazione della tubulina.

In uno *screening* iniziale, l'attività antiproliferativa delle molecole sintetizzate è stata testata sulla linea cellulare tumorale B16 (cellule di melanoma murino), mediante il saggio *in vitro* MTT. Il saggio del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide) è un saggio colorimetrico ampiamente utilizzato, che permette di misurare la proliferazione e la vitalità cellulare attraverso la valutazione dell'efficienza mitocondriale.

La capacità delle molecole di inibire la polimerizzazione della tubulina è stata valutata, invece, utilizzando il colorante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), impiegando con qualche opportuna modifica la procedura descritta da Barron *et al.* nel 2003 e da Bane e collaboratori nel 2007. Il colorante degli acidi nucleici DAPI subisce delle modificazioni in termini di fluorescenza in seguito al legame con la tubulina e all'assemblaggio dei monomeri, e le variazioni nell'intensità dell'emissione possono essere impiegati per monitorare la polimerizzazione della proteina.

Per completare la valutazione dell'attività biologica dei composti ottenuti sono stati valutati, inoltre, gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926, test considerato predittivo di una potenziale attività antivascolare *in vivo*.

I risultati ottenuti hanno consentito di orientare il lavoro di sintesi e di evidenziare le relazioni struttura-attività per le serie di molecole realizzate.

L'analisi dell'attività biologica delle molecole sostituite (serie R=OCH₃) ha evidenziato ottimi risultati preliminari, coerentemente a quanto da noi ipotizzato sulla base delle relazioni struttura-attività note. Queste molecole sembrerebbero promettenti, infatti, sia per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali, sia per quanto riguarda l'attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina.

Ottimi risultati sono stati osservati per gli analoghi appartenenti alla serie R=Br, sia per quanto concerne gli effetti antiproliferativi, sia per quanto riguarda gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926.

Durante l'ultima parte del lavoro sperimentale, l'attività di ricerca è stata dedicata alla sintesi di nuovi diindolilmetani. I diindolilmetani ed i loro derivati costituiscono un'importante classe di composti eterociclici impiegati dall'industria farmaceutica. Queste molecole sono presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle *Cruciferae*, e sono note per la loro capacità di promuovere il metabolismo degli estrogeni e di indurre apoptosi in cellule tumorali umane.

Allo scopo di sintetizzare nuovi carbazoli che fossero caratterizzati da un minor ingombro sterico, la procedura generale impiegata per la sintesi dei tetraidrocarbazoli è stata applicata utilizzando diversi prodotti di partenza. Queste reazioni non hanno condotto alla sintesi di nuovi carbazoli, ma è stato possibile, tuttavia, osservare la formazione di un nuovo diindolilmetano. Obiettivo seguente è stato dunque quello di migliorare la strategia di sintesi utilizzando una procedura più opportuna, in modo da aumentare le rese di reazione. Nelle fasi successive si è inteso appurare se la stessa procedura potesse essere applicata anche alla sintesi di diindolilmetani sostituiti.

L'attività antiproliferativa delle molecole è stata testata su diverse linee cellulari tumorali umane mediante il saggio *in vitro* MTT. Sono state impiegate, in particolare, due linee cellulari di tumore mammario, MCF-7 (*human breast cancer*, ormono-dipendente) ed SKBR3 (*human breast cancer*, ormono-indipendente), ed una linea di tumore prostatico, LNCaP (*human prostatic adenocarcinoma*). In una seconda fase della valutazione dell'attività biologica si è inteso verificare se l'attività antiproliferativa fosse correlata ad induzione di apoptosi.

Abstract

The present study was carried out at the Laboratory of Phytopharmacy, Department of Pharmaceutical Science (University of Calabria), and at the Laboratory of Pharmacognosy belonging to the University Paris Descartes of Paris.

The research activity was focused on the synthesis of new carbazoles as analogues of the natural stilbene combretastatin A-4 (CA-4), and on the *in vitro* evaluation of the biological activity of obtained compounds.

At the Laboratory of Pharmacognosy, were already synthesized heterocyclic derivatives of the CA-4, characterized by an high biological activity. The aim of the present study was to synthesize analogues of the previously obtained compounds and to modify the molecules structure in order to improve the biological properties with the goal to complete the study on the structure-activity relationships of this series of molecules.

During the previous works were synthesized new 3-arylindoles, formulated as heterocyclic analogues of CA-4. Successively was synthesized a series of 5-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)pyrrole[3,4-a]carbazole-1,3(2H,10H)-diones formulated as *cis*-blocked analogues of 3-arylindoles and arylthioindoles previously obtained. Some of these molecules were characterized by an high biological activity.

The goal of the present study was to synthesize new carbazoles, ring-open analogues of the previous series, in order to reduce the steric crowd on the benzenic ring (characterizing the carbazoles and tetrahydrocarbazoles previously synthesized) with the aim to obtain molecules characterized by an higher biological activity.

The research project was subdivided in different steps. During the first step, was synthesized a series of molecules starting from indole. To synthesize these molecules was employed an opportunely modified procedure described by Noland *et al.* in the 1996. The realization of this first series of molecules was pivotal because it permitted to plan appropriate synthesis for the realization of more complex molecules.

During the second step, on the basis of known structure-activity relationships, a new series of molecules was synthesized starting from the 6-methoxyindole in order to obtain molecules characterized by an higher biological activity then the one showed from the first not substituted series of molecules.

So, during the thesis work were synthesized new trimethoxyphenyl-pyrroloindolecarbazoles starting from indole and a second series of molecules starting from 6-methoxyindole.

Many attempts were carried out in order to obtain molecules with a not benziliated maleimide ring and with a lower steric crowd, without reaching the purpose. The goal was reached realizing the same synthesis procedures starting from 6-bromoindole. So, was possible to synthesize new compounds starting from the maleimide instead of the *N*-benzyl maleimide.

To evaluate the potential anticancer activity due to antivasular properties of synthesized compounds, the cytotoxic activity of molecules and the inhibition of tubulin polymerization were assessed *in vitro*.

In a first screening, the antiproliferative activity of synthesized molecules was assayed, using the *in vitro* bioassay MTT, on B16 cancer cell line (murine melanome).

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) test is a colorimetric assay largely used to estimate cell proliferation and vitality through the evaluation of mitochondrial efficiency.

The capacity to inhibit the tubulin polymerization was estimated using the fluorescent dye DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), using the Barron (2003) and Bane (2007) procedures opportunely modified.

In order to complete the evaluation of biological activity of compounds, the effects on the morphology of endothelial cells Ea.hy 926 were also evaluated.

Obtained results permitted to plan the synthesis and to underline the structure-activity relationships for the realized molecules. The analysis of biological activity of substituted molecules ($R=OCH_3$) showed good preliminary results. These molecules seems promising on both effects on morphology of endothelial cells and inhibition of tubulin polymerization.

Good results, concerning the antiproliferative effects and the influence on morphology on endothelial cells (Ea.hy 926), were also observed for bromo-analogues.

During the last step of experimental work, the research activity was focused on the synthesis of new bisindolymethanes. These molecules and their derivatives are known as an important class of heterocyclic compounds in pharmaceutical industry. Bisindolymethanes are found in cruciferous plants and are known to promote beneficial estrogen metabolism and to induce apoptosis in human cancer cells.

In order to synthesize new carbazoles characterized by a low steric crowd, the general procedure previously utilized was applied employing different reagents. These reactions did not lead to the synthesis of new carbazoles, but it was possible to observe the formation of a new bisindolymethane.

Successively, the goal of this thesis was to improve the synthesis strategy to increase the yield of the reaction and to evaluate if the procedure could be applied for the synthesis of substituted bisindolymethanes.

The antiproliferative activity of molecules was assayed on different human cancer cells line through the MTT *in vitro* assay. Particularly, were employed two breast cancer cell lines (MCF-7 and SKBR3), and one prostate cancer cell line (LNCaP). Moreover, the evaluation of apoptosis was carried out.