



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



Università degli Studi di Salerno – Sede consorziata Università della Calabria

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

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

Tutor
Ch.mo Prof. Giancarlo A. Statti

Tutor
Ch.mo Prof. Sylvie Michel

Coordinatore
Ch.mo Prof. Antonietta Leone

Dottoranda
Mariangela Marrelli

INDICE

RIASSUNTO	pag	1
ABSTRACT	pag	3
INTRODUZIONE	pag	5
SCOPO DELLA TESI	pag	7
Capitolo 1		
Microtubuli ed agenti antimitotici	pag	9
1.1 Introduzione.....	pag	9
1.2 Struttura della tubulina	pag	9
1.3 Struttura ed “instabilità dinamica” dei microtubuli.....	pag	10
1.4 Molecole che interagiscono con la tubulina.....	pag	12
1.5 Inibitori della polimerizzazione della tubulina	pag	13
1.5.1 <i>Agenti che interagiscono con il sito di legame della colchicina</i>	pag	13
1.5.1 <i>Agenti che legano il sito di legame degli alcaloidi della vinca</i>	pag	14
Capitolo 2		
Agenti antivascolari	pag	16
2.1 Il processo di neovascolarizzazione.....	pag	16
2.2 Caratteristiche strutturali e funzionali dei vasi sanguigni tumorali	pag	16
2.3 Il sistema vascolare: un nuovo <i>target</i> delle terapie antitumorali	pag	17
2.4 Farmaci antiangiogenici.....	pag	18
2.5 Farmaci antivascolari	pag	19
2.5.1 <i>I peptidi</i>	pag	20
2.5.2 <i>Small-molecule VDAs</i>	pag	21
Capitolo 3		
La combretastatina A-4	pag	23
3.1 Introduzione	pag	23
3.2 Attività biologiche.....	pag	24
3.3 Meccanismo d’azione.....	pag	26

3.4	Relazioni struttura-attività della CA-4	pag	28
3.5	Altre attività biologiche e potenziali applicazioni terapeutiche....	pag	28
3.6	CA4P	pag	30
3.7	<i>Clinical trials</i>	pag	32
3.8	Sintesi della CA-4	pag	33
3.9	Analoghi della combretastatina A-4	pag	35

Capitolo 4

PARTE SPERIMENTALE I

Sintesi di nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli

	concepiti come analoghi della combretastatina A-4	pag	36
4.1	Introduzione	pag	36
4.2	Studi precedenti	pag	36
4.2.1	<i>Analoghi eterociclici della CA-4: 3-aroilindoli</i>	pag	37
4.2.2	<i>3-Aroilindoli disostituiti</i>	pag	38
4.2.3	<i>Tetraidrocarbazoli e carbazoli: analoghi "cis-blocked" dei 3-aroilindoli</i>	pag	40
4.3	Lavoro sperimentale: progettazione delle molecole	pag	42
4.4	Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti a partire dall'indolo semplice: serie R=H	pag	43
4.4.1	<i>Reazione "one pot" impiegata per la sintesi dei tetraidrocarbazoli</i>	pag	43
4.4.2	<i>Sintesi del tetraidrocarbazolo</i>	pag	45
4.4.3	<i>Ossidazione del tetraidrocarbazolo a carbazolo</i>	pag	46
4.4.4	<i>Apertura dell'anello della maleimide</i>	pag	48
4.4.5	<i>Sintesi dell'anidride maleica: seconda strategia di sintesi</i>	pag	51
4.4.6	<i>Sintesi dell'acido o-dicarbossilico</i>	pag	52
4.4.7	<i>Sintesi dell'anidride maleica a partire dall'acido o-dicarbossilico</i>	pag	53
4.4.8	<i>Reazioni di decarbossilazione</i>	pag	53
4.5	Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti a partire dal 6-metossindolo: serie R=OCH ₃	pag	55
4.5.1	<i>Sintesi del metossitetraidrocarbazolo</i>	pag	56
4.5.2	<i>Ossidazione del metossitetraidrocarbazolo</i>	pag	56
4.5.3	<i>Apertura dell'anello della maleimide (serie R=OCH₃).....</i>	pag	57
4.5.4	<i>Sintesi dell'acido o-dicarbossilico e dell'anidride maleica sostituiti (serie R=OCH₃).....</i>	pag	59
4.5.5	<i>Sintesi del metossitetraidrocarbazolo debenzilato sull'anello della maleimide: strategia di sintesi.....</i>	pag	60
4.5.6	<i>Sintesi della N-(p-metossibenil)maleimide: reazione di Mitsunobu.....</i>	pag	61
4.5.7	<i>Sintesi di un nuovo tetraidrocarbazolo a partire dalla N-(p-metossibenil)maleimide.....</i>	pag	63
4.5.8	<i>Ossidazione del tetraidrocarbazolo ottenuto a partire dalla N-(p-metossibenil)maleimide.....</i>	pag	64
4.5.9	<i>Tentativi di debenzilazione del carbazolo ottenuto a partire dalla N-(p-metossibenil)maleimide.....</i>	pag	65

4.6 Idrazinolisi del metossicarbazolo.....	pag 66
4.7 Sintesi condotte a partire dal 1-(fenilsulfonyl)indolo.....	pag 66
4.8 Sintesi di carbazoli caratterizzati da un minor ingombro sterico.....	pag 67
4.9 Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti a partire dal 6-bromoindolo: serie R=Br	pag 69
4.9.1 Sintesi del bromotetraidrocarbazofo	pag 69
4.9.2 Ossidazione del bromotetraidrocarbazofo: sintesi del carbazofo corrispondente	pag 69
4.10 Conclusioni.....	pag 70
4.11 Parte sperimentale.....	pag 71

Capitolo 5

PARTE SPERIMENTALE II

Valutazione dell'attività biologica di nuovi

trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli	pag 89
--	--------

5.1 Introduzione.....	pag 89
5.2 Metodologie impiegate.....	pag 89
5.2.1 Citotossicità: MTT test	pag 89
5.2.2 Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali EA.hy 926.....	pag 91
5.2.3 Inibizione della polimerizzazione della tubulina	pag 92
5.3 Risultati e discussione	pag 93
5.3.1 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=H.....	pag 93
5.3.2 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=OCH ₃	pag 96
5.3.3 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=Br	pag 99
5.4 Conclusioni	pag 101

Capitolo 6

PARTE SPERIMENTALE III

Sintesi e valutazione dell'attività biologica di

nuovi diindolilmetani	pag 104
-----------------------------	---------

6.1 Sintesi di diindolilmetani	pag 104
6.2 Sintesi di diindolilmetani sostituiti.....	pag 106
6.3 Parte sperimentale: 3-[1-(6-metossi-1H-indol-3-il)-1-(3',4',5'- trimetossifenil)etil]-6-metossi-1H-indolo	pag 108
6.4 Valutazione dell'attività biologica	pag 109
6.4.1 Introduzione	pag 109
6.4.2 Attività antiproliferativa in vitro	pag 109
6.4.3 Valutazione dell'apoptosi	pag 112
6.5 Conclusioni	pag 112

CONCLUSIONI	pag 114
ABBREVIAZIONI	pag 117
BIBLIOGRAFIA	pag 119
RINGRAZIAMENTI	

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 diindolimetani. I diindolimetani 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 diindolimetano. 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 diindolimetani 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.

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-aryloindoles, 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-aryloindoles 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.

Abstract

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.

La natura offre innumerevoli potenziali risorse terapeutiche utili nella prevenzione e nella cura del cancro. Oltre il 60% degli agenti antitumorali attualmente impiegati deriva, infatti, da piante, organismi marini e microrganismi. Tra queste fonti naturali, le piante, in particolar modo, sono state intensamente studiate e da anni costituiscono una risorsa primaria di nuovi farmaci. La ricerca di nuovi agenti antitumorali da materiale vegetale ebbe inizio negli anni '50, con la scoperta e la sintesi degli alcaloidi della vinca, vinblastina e vincristina, e l'isolamento della podofillotossina. Composti scoperti più recentemente includono i taxani e la camptotecina.

Nonostante la disponibilità e la sintesi di un ampio spettro di molecole, spesso non sono stati osservati effetti farmacologici di rilievo durante la fase clinica di sperimentazione, e sebbene negli ultimi anni siano stati fatti notevoli progressi nel trattamento del cancro, non esistono ancora farmaci efficaci contro molti tipi di tumori. La principale causa di questo insuccesso è da attribuire alla mancanza di selettività delle principali opzioni terapeutiche classiche, quali la chemioterapia e la radioterapia, che mirano alla distruzione delle cellule tumorali, ma inevitabilmente danneggiano i tessuti sani.

Obiettivo attuale della ricerca in campo oncologico è quello di trovare nuovi approcci terapeutici mirati, che comportino quindi minori effetti collaterali. In conformità a questa esigenza, molti ricercatori hanno recentemente considerato l'ipotesi che la crescita di un tumore possa essere soppressa bloccando l'apporto di sostanze nutritive alle cellule tumorali.

Il processo di neovascolarizzazione tumorale costituisce un prerequisito essenziale per la crescita del tumore, volto a soddisfare un'aumentata richiesta di ossigeno e di nutrienti da parte dei nuovi tessuti in formazione. Quando la crescita tumorale è tale da non essere più adeguatamente supportata dai vasi sanguigni presenti, il rilascio di fattori di crescita avvia l'angiogenesi. Tale processo è controllato dall'equilibrio dinamico di fattori endogeni pro-angiogenetici ed anti-angiogenetici: un eccesso locale di fattori angiogenetici, quali il fattore di crescita endoteliale (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e le metalloproteinasi della matrice (MMPs, *matrix metalloproteinases*) in confronto ai fattori anti-angiogenetici (quali angiostatina, endostatina e trombospondina) determina una risposta angiogenetica. La neovascolarizzazione coinvolge svariati processi, come la proliferazione delle cellule endoteliali, la degradazione proteolitica della matrice extracellulare e la migrazione delle cellule endoteliali. Come risultato di questi fenomeni, nuovi capillari originano dai vasi sanguigni maturi preesistenti, crescendo intorno alle nuove cellule tumorali e consentendo la crescita tumorale. Il livello di proliferazione risultante è normalmente assente nei tessuti adulti; i vasi tumorali, inoltre, presentano una struttura anomala caratterizzata, ad esempio, da occlusioni temporanee e da una riduzione del numero dei periciti.

Proprio in virtù delle profonde differenze che intercorrono tra i vasi tumorali e quelli normali, il sistema vascolare tumorale è oggi intensamente studiato a livello preclinico e clinico come un nuovo potenziale *target* delle terapie antitumorali, sia da parte di agenti anti-angiogenetici, in grado di prevenire la formazione di nuovi vasi, che da agenti antivascolari, che mirano invece alla distruzione dei vasi tumorali già costituiti.

La capacità di agire a livello del sistema vascolare tumorale costituisce un interessante nuovo sviluppo nel trattamento del cancro anche in considerazione del fatto che la distruzione dei vasi sanguigni, e la conseguente distruzione del tessuto tumorale per carenza di apporto di ossigeno e sostanze nutritive, può condurre alla

distruzione delle cellule tumorali in aree del tumore resistenti a molti farmaci antitumorali.

Gli agenti antivascolari (VDAs, *vascular disrupting agents*, altrimenti detti VTAs, *antivascular agents*) sono in grado di provocare una rapida interruzione dell'apporto di sostanze nutritive al tumore, che porta alla morte delle cellule privandole di ossigeno e nutrienti. Una classe di composti che ha dimostrato possedere effetti antivascolari è rappresentata dalle combretastatine. Il composto naturale combretastatina A-4 (CA-4), capostipite di questo gruppo di molecole, è un *cis*-stilbene isolato nel 1989 dall'arbusto sud-africano *Combretum caffrum* (Eckl. and Zeyh.) Kuntze (Combretaceae) da Pettit e collaboratori. Questo composto lega il sito di legame per la colchicina sulla subunità β della tubulina, ed inibisce la polimerizzazione della tubulina e quindi la formazione dei microtubuli. Questi effetti comportano l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali attraverso l'alterazione delle funzioni del fuso mitotico, con conseguente apoptosi. L'interazione con la tubulina causa inoltre la distruzione dei *pathway* di trasduzione del segnale coinvolto nella regolazione e nel mantenimento del citoscheletro delle cellule endoteliali nel sistema vascolare tumorale, determinando la distruzione selettiva dei vasi sanguigni tumorali.

In seguito alle potenziali applicazioni degli agenti antivascolari, nel corso degli ultimi anni sono stati sintetizzati molti nuovi analoghi, ed alcuni VDAs sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

In conformità e queste considerazioni ed alle nuove esigenze della ricerca scientifica, scopo del presente lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Fitofarmacia dell'Università della Calabria e presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes di Parigi, è stato quello di sintetizzare una serie di nuovi carbazoli concepiti come analoghi della CA-4 e di valutarne l'attività biologica in vitro. Sulla base delle relazioni struttura-attività note sono stati concepiti e sintetizzati nuovi composti, ed in conformità ai risultati ottenuti sono state ulteriormente apportate specifiche modifiche strutturali atte a migliorare le proprietà biologiche delle molecole realizzate, al fine di poter individuare molecole potenzialmente utili in terapia.

Uno degli obiettivi perseguiti attualmente dalla ricerca scientifica in campo oncologico è lo sviluppo di nuove terapie caratterizzate da una maggiore selettività nei confronti delle cellule neoplastiche. Tale necessità è legata al fatto che le opzioni terapeutiche più utilizzate per il trattamento del cancro, la chemioterapia e la radioterapia, sono frequentemente accompagnate da notevoli effetti collaterali.

Particolarmente interessanti, tra le nuove modalità terapeutiche, risultano essere l'approccio antiangiogenico, che mira a contrastare il processo di neovascolarizzazione, e quello antivascolare, finalizzato invece alla distruzione selettiva dei vasi sanguigni tumorali neoformati e quindi, indirettamente, alla distruzione delle cellule tumorali.

Tra gli agenti ad attività antivascolare, un gruppo promettente di composti è costituito dalle molecole che inibiscono la polimerizzazione della tubulina; il capofila di questo gruppo di molecole è rappresentato dalla combretastatina A4 (CA-4), uno stilbene naturale isolato dalla corteccia del *Combretum caffrum* Kuntze.

L'impiego clinico della CA-4 come agente antitumorale è limitato dalla scarsa solubilità in acqua di questo composto e quindi dalla sua bassa biodisponibilità, fattore che ha determinato la necessità di somministrare la molecola sotto forma di profarmaco (CA-4P). La combretastatina A-4 tende, inoltre, ad isomerizzare ed a trasformarsi nel suo isomero *trans*, forma termodinamicamente stabile ed inattiva. Questi fattori limitanti hanno motivato una serie di studi finalizzati alla sintesi di composti più stabili e maggiormente solubili che mostrassero un'attività biologica simile a quella della CA-4.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi. Presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes di Parigi erano già stati sintetizzati analoghi della CA-4 dotati di buona attività biologica *in vitro*.

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.

Sono stati realizzati nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli, ed è stata successivamente valutata la loro attività biologica. E' stata determinata la citotossicità dei composti, gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali EA.hy 926, e la loro capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina.

CAPITOLO 1

Microtubuli ed agenti antimitotici

1.1 Introduzione

I microtubuli sono componenti del citoscheletro presenti in tutte le cellule eucariotiche che giocano un ruolo essenziale in diverse funzioni cellulari quali la motilità, la divisione cellulare, il mantenimento della forma delle cellule ed il trasporto intracellulare (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Queste strutture filamentose sono degli eterodimeri costituiti da due subunità proteiche globulari di circa 50 kDa, α e β tubulina, legate "testa-coda" in modo da formare dei protofilamenti (Nogales *et al.*, 2008). In particolare, le subunità α e β sono presenti in quantità equimolare nel microtubulo, il quale può essere considerato un assemblaggio elicoidale di dimeri $\alpha\beta$ o, alternativamente, come una struttura formata da 13 file, o protofilamenti, di subunità alternate α e β . Associazioni parallele di tali strutture filamentose costituiscono le pareti dei microtubuli e danno origine ad un polimero polare (Mathews *et al.*, 1998).

Nella cellula, il terminale negativo dei microtubuli (*minus-end*), rivestito dagli α -monomeri, è generalmente associato al centrosoma, mentre quello positivo (*plus-end*), caratterizzato da una maggiore dinamicità e costituito dai β -monomeri, può attivamente esplorare la cellula e lega il cinetocoro durante la mitosi. I microtubuli sono inoltre associati con molte altre proteine, tra cui alcune proteine regolatrici che stabilizzano e destabilizzano i microtubuli. Ogni monomero di tubulina lega inoltre una molecola di guanosina 5'-trifosfato (GTP) (Nogales *et al.*, 2008).

Una volta assemblato, il sistema dei microtubuli svolge un ruolo fondamentale per il trasporto di organuli e cromosomi. Questo trasporto è guidato da proteine motrici, quali la chinesina e la dineina, che interagiscono con la superficie laterale dei microtubuli. I microtubuli svolgono un ruolo fondamentale, inoltre, per altri processi che non dipendono esclusivamente dalle proteine motrici, quali ad esempio il movimento dei cromosomi durante la mitosi, ed il movimento del nucleo o del fuso mitotico attraverso interazioni tra i microtubuli e la membrana plasmatica. Questi esempi di motilità cellulare suggeriscono che i microtubuli stessi, in assenza di motori proteici, possono determinare il movimento delle strutture cellulari (Howard *et al.*, 2003).

1.2 Struttura della tubulina

La struttura primaria della tubulina è stata ben caratterizzata in protisti, piante, funghi ed eucarioti, ed è stato dimostrato che i due monomeri α e β presentano un elevato grado di omologia di sequenza, di circa il 40% (Pinney *et al.*, 2000). La determinazione della loro struttura secondaria e terziaria si deve a Nogales e collaboratori, che nel 1998 la descrissero mediante l'impiego di cristallografia elettronica (Nogales *et al.*, 1998).

I monomeri α e β tubulina hanno una struttura costituita da due foglietti beta circondati da alfa eliche. Ciascun monomero (figura 1) presenta tre domini funzionali: un dominio amino-terminale, in cui si trova il sito di legame per i nucleotidi; un dominio intermedio a livello del quale si trova il sito di legame per il taxolo; un dominio

carbossi-terminale in cui si trova il sito di legame per le proteine motrici (Bhattacharyya *et al.*, 2008).

In particolare, la regione N-terminale è un dominio formato da sei foglietti beta paralleli (S1-S6) alternati ad α -eliche (H1-H6). Ciascun *loop* (T1-T6) che unisce la fine di un foglietto con l'inizio della successiva elica è direttamente coinvolto nell'interazione con il nucleotide. All'interno di ciascun monomero, il legame con il nucleotide è completato dall'interazione con il terminale aminico dell'elica H7. Quest'ultima connette il dominio di legame per il nucleotide con il secondo dominio, più piccolo, che è costituito da tre eliche (H8-H10) ed un foglietto β misto (S7-S10).

La regione carbossi-terminale è costituita principalmente da due eliche antiparallele (H11-H12) che attraversano i primi due domini. Il *loop* che connette il foglietto S7 all'elica H9 è denominato *M-loop*, ed è particolarmente importante nel formare le connessioni laterali tra le molecole di tubulina (Nogales *et al.*, 2008).

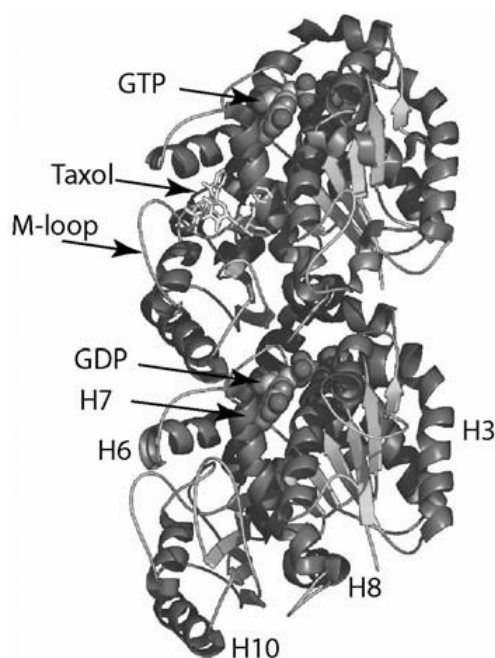


Figura 1 - Struttura dei dimeri della tubulina. Il monomero α si trova in basso, mentre il monomero β in alto (Nogales *et al.*, 2008).

1.3 Struttura ed “instabilità dinamica” dei microtubuli

I microtubuli sono costituiti tipicamente da tredici protofilamenti, che a loro volta sono formati da eterodimeri di $\alpha\beta$ -tubulina (figura 2). L'impiego della microscopia elettronica ha consentito di osservare che le code dei microtubuli in accorciamento possono presentare esternamente dei singoli protofilamenti curvi, mentre le code in allungamento sono relativamente dritte (Gardner *et al.*, 2008).

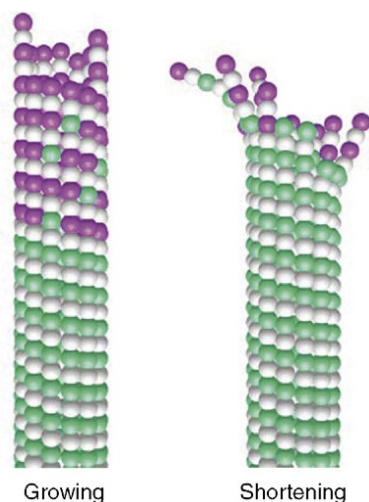


Figura 2 - Struttura dei microtubuli (Gardner *et al.*, 2008).

A differenza di molti polimeri, i microtubuli sono sottoposti ad un inusuale processo di assemblaggio denominato “instabilità dinamica”: queste strutture subiscono alternativamente periodi di crescita e di accorciamento della durata di alcuni secondi o minuti. Al fine di caratterizzare quantitativamente questo processo sono stati identificati quattro parametri: il tasso di crescita e di accorciamento delle estremità dei microtubuli, e la frequenza con cui il microtubulo passa da uno stato all'altro (figura 3). La frequenza alla quale l'estremità di un microtubulo in fase di crescita passa ad uno stato di accorciamento è denominata frequenza di “catastrofe” (*catastrophe frequency*), mentre è definita di “salvataggio” (*rescue frequency*) la frequenza alla quale avviene il passaggio inverso (Gardner *et al.*, 2008; VanBuren *et al.*, 2005).

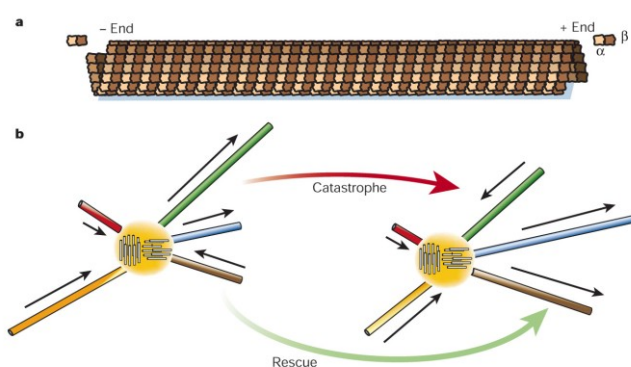


Figura 3 - Instabilità dinamica. **a.** Struttura del microtubulo. La subunità β della tubulina si trova al terminale positivo. **b.** Instabilità dinamica.

L'energia necessaria ai microtubuli è fornita dall'idrolisi del GTP. La tubulina è una GTPasi la cui attività è stimolata dalla polimerizzazione. Essa, infatti, polimerizza in presenza di GTP non idrolizzabile per formare microtubuli stabili, e la polimerizzazione è determinata dall'alta affinità dei dimeri tubulina-GTP per le estremità dei microtubuli.

L'elevata stabilità del sistema GTP-microtubulo costituisce apparentemente un problema per il disassemblaggio, poiché i microtubuli associati al GTP depolimerizzano ad una velocità davvero trascurabile.

Questo problema è risolto dall'idrolisi del GTP: il risultante microtubulo associato al GDP (guanosina difosfato), è molto instabile e tende a depolimerizzare anche in presenza di forze di tensione che si oppongono alla depolimerizzazione.

Pertanto, il legame della subunità GTP opera durante la fase di crescita, mentre la dissociazione dal GDP avviene durante la fase di accorciamento.

L'accoppiamento dei meccanismi idrolisi e polimerizzazione è un fattore chiave della regolazione del ciclo del GTP. La subunità β risiede sul terminale positivo del microtubulo. È stato osservato che, sebbene la tasca della subunità β possa legare le molecole di GTP, essa non possiede dei residui cruciali necessari per la sua idrolisi. Questi residui sono invece forniti dalla subunità α , che innesca in tal modo l'idrolisi (Howard *et al.*, 2003).

1.4 Molecole che interagiscono con la tubulina

In virtù del ruolo chiave svolto dalla tubulina nel corso della divisione cellulare, le molecole che sono in grado di alterare l'instabilità dinamica che caratterizza l'assemblaggio dei microtubuli hanno assunto importanza come farmaci antitumorali (Maya *et al.*, 2000).

Sono riportati in letteratura dati relativi a diversi tipi di ligandi naturali che inibiscono la polimerizzazione, e si assiste ad una continua scoperta di nuovi agenti strutturalmente diversi (Pinney *et al.*, 2000).

Le molecole che interagiscono con la tubulina (MDAs, *microtubule-targeted agents*) possono essere suddivise in due gruppi: inibitori e promotori della polimerizzazione della tubulina. Svariati composti naturali e sintetici quali gli alcaloidi della vinca, la colchicina, l'estramustina e le combretastatine inibiscono la polimerizzazione della tubulina, mentre agenti come i taxani sono in grado di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli. Entrambe le classi sono costituite da molecole in grado di legare la tubulina interagendo con siti di legame diversi ed alterando l'equilibrio dinamico che caratterizza la formazione dei microtubuli.

I siti di legame per il taxolo, la colchicina e la vinblastina della molecola di tubulina sono state ben caratterizzate. Il taxolo e la vinblastina legano la subunità β , mentre il sito di legame della colchicina si trova tra le due subunità α e β dell'eterodimero. Molti agenti depolimerizzanti legano entrambi i siti di legame (Bhattacharyya *et al.*, 2008; Rappl *et al.*, 2006).

Sebbene le due classi di agenti MDA agiscano a livello di due diversi siti di legame e con diversa affinità, le alterazioni morfologiche dose-dipendenti dei fusi mitotici sono pressoché identiche. Pertanto, i fusi mitotici sono stati classificati in cinque classi (I-V), in base al grado di disorganizzazione dei microtubuli (Cenciarelli *et al.*, 2008).

1.5 Inibitori della polimerizzazione della tubulina

1.5.1 Agenti che interagiscono con il sito di legame della colchicina

La colchicina è una molecola caratterizzata da un'importante attività antimitotica. Il principale meccanismo d'azione di questo composto è costituito dalla capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina. Questo agente, tuttavia, è caratterizzato da una notevole tossicità che interessa vari organi, e che si manifesta con un'ampia serie di effetti collaterali (Niel *et al.*, 2006).

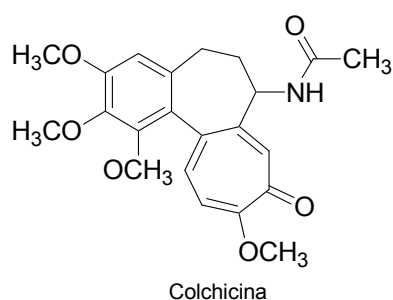


Figura 4 – Struttura chimica della colchicina.

Un altro composto naturale in grado di interferire con la formazione dei microtubuli è costituito dalla podofillotossina, isolata dal *Podophyllum peltatum* L., che presenta il motivo strutturale trimetossifenile della colchicina ed una buona attività antimitotica. Sono note diverse podofillotossine, lignani identificati in varie specie del genere *Podophyllum*. Anche la podofillotossina, come la colchicina, ha costituito un modello per la sintesi di numerosi derivati. Questa classe di molecole include infatti alcuni derivati semisintetici, etoposide e teniposide, e nuovi analoghi realizzati nel corso degli ultimi anni (Imbert, 1998).

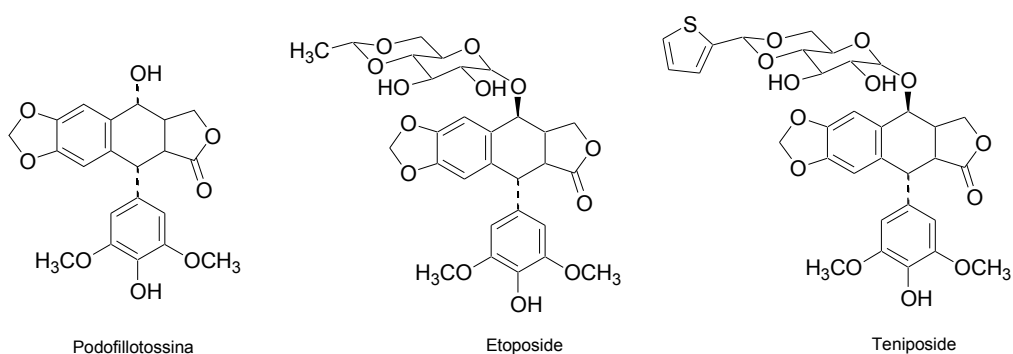


Figura 5 – Struttura chimica delle principali podofillotossine.

1.5.2 Agenti che legano il sito di legame degli alcaloidi della vinca

Gli alcaloidi della vinca sono stati identificati nella Pervinca del Madagascar (*Catharanthus roseus* G. Don o *Vinca rosea* L., Apocinaceae). La vincristina e la vinblastina sono state introdotte in campo oncologico per le loro proprietà antileucemiche. Questi composti sono in grado di bloccare la mitosi determinando un arresto in metafase. Le proprietà degli alcaloidi della vinca sono correlate alla loro capacità di legare specificamente la tubulina (Jelic *et al.*, 2001; Klocker *et al.*, 1991).

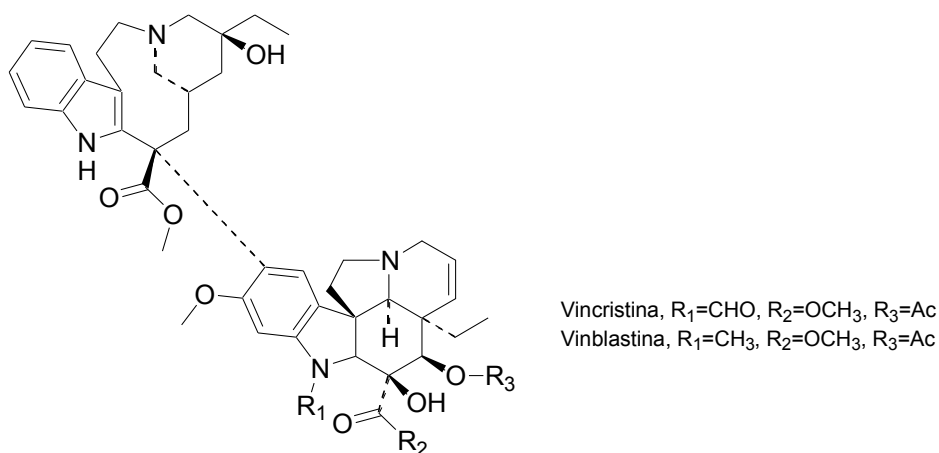


Figura 6 – Struttura chimica degli alcaloidi della vinca vincristina e vinblastina.

Un importante derivato semisintetico della vinblastina è costituito dalla vinorelbina (figura 7), le cui caratteristiche chimiche consentono una somministrazione orale, a differenza di vinblastina e vincristina, disponibili solo per via endovenosa (Photiou *et al.*, 1997).

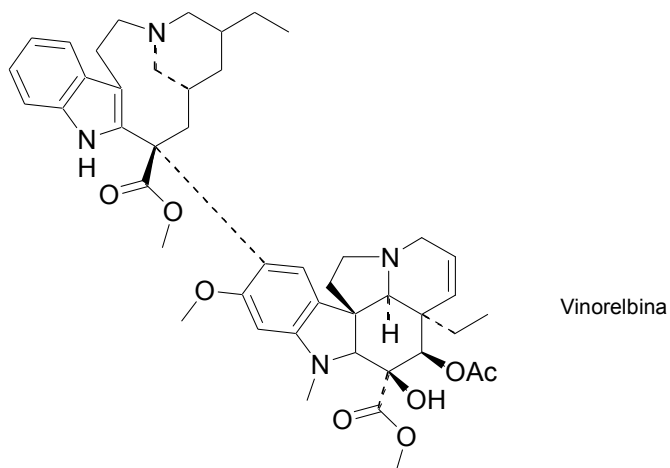


Figura 7 – Struttura chimica della vinorelbina.

Il meccanismo d'azione della vinorelbina è identico a quello degli altri alcaloidi della vinca, ma il farmaco è caratterizzato da minore neurotossicità rispetto alla vincristina. Questo composto è stato studiato nel trattamento dei pazienti affetti da cancro al polmone sia come singolo agente terapeutico, sia in combinazione con il cisplatino (Jordan *et al.*, 1991).

CAPITOLO 2

Agenti antivascolari

2.1 Il processo di neovascolarizzazione

Il processo di angiogenesi, che consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni, accompagna un numero molto limitato di processi fisiologici, quali ad esempio la cicatrizzazione delle ferite ed alcuni processi riproduttivi.

L'assenza di angiogenesi nei tessuti maturi sani è determinata dall'espressione equilibrata di numerosi fattori endogeni proangiogenici ed antiangiogenici. L'espressione controllata di una varietà di fattori influenzanti l'angiogenesi, che caratterizza i processi fisiologici, determina il corretto reclutamento, la migrazione e la proliferazione dei componenti della parete vasale. Il risultato finale di questo complesso sistema che accompagna i processi fisiologici è un "network" funzionale di vasi, in grado di irrorare i tessuti.

Nel caso di eventi fisiologici o ferite che richiedono la crescita di nuovi vasi sanguigni questo equilibrio viene perso, ed è spostato verso la formazione di fattori proangiogenici. Tale fenomeno prende il nome di "switch" angiogenico (*angiogenic switch*).

Sono noti molti fattori proangiogenici ed enzimi coinvolti nella formazione dei vasi sanguigni, tra i quali la famiglia del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), le metalloproteinasi della matrice (MMPs, *matrix metalloproteinases*), il fattore di crescita degli epatociti (HGF, *hepatocyte growth factor*) ed il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF, *basic fibroblast growth factor*).

L'angiogenesi è spesso attivata da fattori di stress, quale ad esempio l'ipossia. L'attivazione dei fattori di trascrizione HIFs (*hypoxia inducible transcription factors*) determina l'espressione di molte molecole proangiogeniche, come ad esempio VEGF.

Un tessuto può aumentare i propri vasi sanguigni attraverso diversi meccanismi: può reclutare cellule progenitrici dal midollo osseo nei vasi esistenti (vasculogenesi, formazione di vasi sanguigni *de novo*), può originare nuovi vasi da quelli normali, oppure può attivare il processo di neoformazione (angiogenesi). Tutti questi fenomeni intervengono durante lo sviluppo del normale sistema vascolare, mentre nei tumori l'angiogenesi costituisce il meccanismo predominante (Citrin *et al.*, 2008).

2.2 Caratteristiche strutturali e funzionali dei vasi sanguigni tumorali

Il processo di angiogenesi provoca la formazione di un sistema vascolare anormale sia da un punto di vista anatomico che da quello funzionale. I vasi sanguigni tumorali sono spesso tortuosi e non presentano la normale organizzazione gerarchica che consente una distribuzione omogenea di ossigeno e nutrienti. La presenza di deviazioni, regioni dilatate e diramazioni eccessive determinano un flusso disorganizzato.

Accanto all'architettura, anomala il sistema vascolare tumorale è caratterizzato anche da un'alterata composizione strutturale dei vasi. In condizioni normali le cellule endoteliali sono distribuite su un monostrato e presentano giunzioni che limitano la permeabilità vasale. Nelle venule e nei capillari, questo monostrato è strettamente associato ai periciti, cellule che giocano un ruolo importante nella stabilizzazione del sistema vascolare.

Le cellule endoteliali ed i periciti ad esse associati sono inoltre normalmente inclusi in una matrice acellulare organizzata ed uniforme definita membrana vascolare basale.

A differenza dei capillari sanguigni sani, i costituenti della parete dei vasi tumorali sono disposti in modo disordinato. L'endotelio vasale, inoltre, mostra un'organizzazione atipica, caratterizzata dalla presenza di spazi interendoteliali, regioni in cui la membrana basale è assente e disorganizzata, ed altre in cui la parete dei vasi è sostituita da cellule tumorali.

I periciti, sebbene presenti anche nei vasi sanguigni tumorali, sono molto diversi da quelli che è possibile riscontrare nel tessuto normale. Nel tessuto tumorale, infatti, essi sono associati solo debolmente alle cellule endoteliali, presentano delle proiezioni citoplasmatiche anomali verso le cellule tumorali, ed esprimono *marker* di superficie anomali.

Parallelamente alle alterazioni strutturali, i vasi sanguigni tumorali presentano anche delle caratteristiche funzionali anomale. Ad esempio, essi presentano una scarsa risposta agli stimoli fisiologici.

Il risultato di tutte queste alterazioni è una notevole irregolarità nella perfusione del tessuto tumorale con aree caratterizzate da ipossia e necrosi. Queste caratteristiche, inoltre, interferiscono con il trasporto e l'ingresso degli agenti citotossici nel tessuto tumorale e con l'efficacia della radioterapia (Citrin *et al.*, 2008).

2.3 Il sistema vascolare: un nuovo *target* delle terapie antitumorali

I vasi sanguigni costituiscono un nuovo interessante *target* per le terapie antitumorali per svariati motivi. Mentre le caratteristiche e la sensibilità delle cellule tumorali sono diverse nei vari tipi di cancro e nell'ambito dello stesso tumore, il sistema vascolare potrebbe offrire un bersaglio più stabile ed omogeneo, poiché l'endotelio tumorale non presenta la variabilità di sensibilità e la resistenza ai farmaci che caratterizza invece le cellule tumorali.

Mentre le cellule endoteliali sono normalmente stabili, nel tessuto tumorale esse proliferano ad una notevole velocità, ed esprimono dei *marker* non presenti nelle cellule endoteliali mature del sistema vascolare normale. Questa differente espressione consente lo sviluppo di inibitori specifici per l'endotelio in rapida proliferazione, che caratterizza esclusivamente il tessuto tumorale e pochi processi fisiologici.

Il sistema vascolare tumorale, inoltre, è in contatto diretto con il flusso sanguigno, e ciò consente un semplice trasporto del farmaco alle cellule endoteliali bersaglio, mentre il trasporto degli agenti antitumorali al tessuto è normalmente reso difficoltoso dalla perfusione, della pressione interstiziale, dalla permeabilità vasale e da altri aspetti del microambiente tumorale.

La distruzione di un singolo vaso tumorale determina la morte di numerose cellule che ricevono da esso ossigeno e nutrienti, e ciò amplifica gli effetti della terapia. Un trattamento diretto ai vasi tumorali potrebbe, inoltre, ridurre la capacità metastatica di un tumore.

E' possibile distinguere due metodiche terapeutiche differenti: l'approccio antiangiogenico, che mira a contrastare il processo di neovascolarizzazione, e quello antivascolare, finalizzato invece alla distruzione selettiva dei vasi sanguigni tumorali neoformati. Poiché il tessuto tumorale presenta sia vasi maturi che neoformati, sia gli agenti antivascolari che quelli antiangiogenici possono essere utilmente impiegati contro il sistema vascolare tumorale. Se il *target* di entrambe le opzioni terapeutiche è apparentemente simile, i meccanismi d'azione ed i risultati della terapia sono notevolmente differenti (Citrin *et al.*, 2008).

2.4 Farmaci antiangiogenici

Gli inibitori dell'angiogenesi prevengono la formazione di nuovi vasi sanguigni da parte del tessuto tumorale. Un'inibizione prolungata dei fattori VEGF determina, inoltre, una diminuzione della vascolarizzazione e normalizza la struttura e l'architettura dei vasi tumorali residui.

Sono stati identificati diversi composti naturali in grado di inibire l'angiogenesi, e sono stati sviluppati, inoltre, vari agenti antiangiogenici sintetici.

Le molecole di origine naturale possono essere a loro volta classificate in composti endogeni derivati della matrice ed agenti che non derivano dalla matrice. I primi, quali ad esempio l'endostatina e la trombospodina 1 (TPS-1), sono costituiti da componenti della membrana basale e della matrice extracellulare che presentano effetti inibitori sulle cellule endoteliali o altri elementi coinvolti nell'angiogenesi. Gli inibitori non derivati dalla matrice includono una varietà di peptidi, metaboliti, citochine, ed altre molecole quali l'angiostatina, la vasostatina, gli interferoni e le interleuchine.

Negli ultimi anni sono stati inoltre realizzati diversi inibitori sintetici dell'angiogenesi, che includono anticorpi dei recettori dei mediatori proangiogenici, *scavenger* di ligandi proangiogenici, inibitori di enzimi proangiogenici, ed inibitori dell'attività tirosina chinasi di questi recettori. Alcune di queste molecole sono attualmente in corso di sperimentazione clinica.

Tra i farmaci in grado di inibire gli stimoli dell'angiogenesi, interessanti risultati sono stati mostrati dall'anticorpo anti-VEGF Bevacizumab (Avastin™, F. Hoffmann-La Roche Ltd), inibitore del fattore VEGF. Gli inibitori dei segnali recettoriali includono gli inibitori dei recettori del VEGF, gli inibitori del recettore del fattore di crescita endoteliale (EGFR, *endothelial growth factor receptor*), gli inibitori del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti, e quelli dei recettori del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR, *platelet derived growth factor receptor*).

Altri composti sintetici, come gli inibitori della ciclossigenasi-2 (COX-2), sono in grado di inibire la produzione di VEGF ed altre molecole pro-angiogeniche. La talidomide agisce mediante l'inibizione di FGF-2 e VEGF (Citrin *et al.*, 2008).

Tabella 1 – Agenti antiangiogenici più rappresentativi (Citrin *et al.*, 2008).

Categoria	Molecole più rappresentative
<u>Inibitori endogeni</u>	
Derivati della matrice	Endostatina Arresten Endorepellina Trombospondine
Molecole non derivate dalla matrice	Angiostatine Interleuchine Vasostatina
<u>Scavenger</u>	
Scavenger del VEGF	VEGF-1 Bevacizumab
<u>Inibitori della tirosina chinasi</u>	
Inibitori di EGFR	Gefitinib (Iressa) Erlotinib (Tarceva)
Inibitori di VEGFR	SU5416 (Semaxinib) PTK787/ZK 222584 (Vatalanib) SU11248 (Sutent) BAY-43-9006 (Sorafenib) DC101
<u>Inibitori della COX-2</u>	
Talidomide ed analoghi	Talidomide

2.5 Farmaci antivascolari

I farmaci antivascolari (VDAs, *vascular disrupting agents*) costituiscono un gruppo relativamente nuovo di molecole che agiscono a livello del sistema vascolare tumorale, determinando l'interruzione del flusso sanguigno e, conseguentemente, la necrosi del tessuto tumorale (Kanthou *et al.*, 2009).

A differenza degli agenti antiangiogenici, che mirano ad impedire il processo di neovascolarizzazione, i VDAs agiscono preferenzialmente a livello dei vasi sanguigni tumorali neoformati.

Queste molecole sfruttano le differenze che intercorrono tra il normale sistema vascolare e la vascolarizzazione tumorale e sono in grado di agire in modo selettivo contro quest'ultima, sebbene le cause di questo fenomeno non siano ancora del tutto chiare (Tozer *et al.*, 2005).

I farmaci ad attività antivascolare differiscono da quelli antiangiogenici non solo per il loro meccanismo d'azione, ma anche per quanto concerne le loro applicazioni terapeutiche. Mentre il trattamento antiangiogenico è somministrato in maniera continuativa per un arco di tempo di mesi oppure anni, i VDAs sono impiegati a dosi intermittenti.

I farmaci antivascolari possono essere suddivisi in due categorie: peptidi e piccole molecole (*small-molecule* VDAs).

Dopo un tempo di esposizione di soli pochi minuti ad un agente antivascolare, i vasi sanguigni neoformati mostrano i primi segni di alterazione. Questi primi fenomeni danno il via ad una sequenza di eventi che conducono all'occlusione dei vasi e ad una marcata riduzione del flusso sanguigno. La prolungata ischemia determina pertanto la morte cellulare (figura 1).

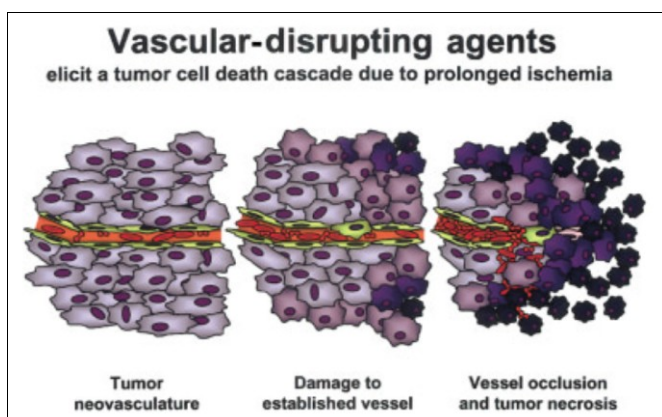


Figura 1 – Meccanismo d'azione proposto per gli agenti antivascolari (Siemann *et al.*, 2004).

Sebbene molti agenti ad attività antivascolare siano attualmente in fase di sperimentazione clinica, i loro *target* molecolari ed i meccanismi d'azione attraverso cui essi determinano una riduzione selettiva del flusso sanguigno ed il collasso dei vasi tumorali non sono ancora completamente noti.

Si ritiene che il principale meccanismo d'azione che sottende alla loro azione sia legato in gran parte alla capacità di agire a livello del citoscheletro e di compromettere l'integrità delle giunzioni delle cellule endoteliali (Siemann *et al.*, 2004; Siemann *et al.*, 2002; van Heeckeren *et al.*, 2006).

I fattori che giustificano la selettività dei VDAs per il tessuto tumorale non sono stati ancora compresi del tutto, ma i risultati finora ottenuti favoriscono l'ipotesi secondo cui questa selettività sarebbe legata alla natura fragile ed immatura dei vasi sanguigni tumorali (Kanthou *et al.*, 2009).

I farmaci ad azione antivascolare provocano una caratteristica precoce necrosi dell'area centrale del tumore, mentre ai bordi del tessuto tumorale sopravvive un certo numero di cellule che possono ricevere ossigeno e nutrienti dal sistema vascolare circostante. E' anche possibile che la presenza di cellule tumorali residue sia in parte conseguenza di un'incompleta distruzione dei vasi sanguigni in altre regioni del tumore.

La sopravvivenza di un certo numero di cellule è un fattore limitante l'attività degli agenti antivascolari, ma l'associazione con le terapie convenzionali, in virtù della sensibilità di queste cellule alle radiazioni e alla chemioterapia, consente di ottenere degli ottimi risultati (Davis *et al.*, 2002).

2.5.1 I peptidi

La prima categoria di agenti antivascolari comprende anticorpi e peptidi che trasportano tossine ed effettori procoagulanti e proapoptotici all'endotelio tumorale. Sono stati testati molti differenti approcci terapeutici basati sull'associazione di anticorpi o peptidi che riconoscono il sistema vascolare associato al tumore. La vascolarizzazione tumorale rappresenta un *target* ideale per trattamenti basati sull'impiego di questi ligandi, grazie all'accessibilità dell'endotelio, che riduce significativamente i problemi legati al trasporto dei farmaci.

I determinanti antigenici (epitopi) espressi selettivamente a livello dei neovasi tumorali, come l'endoglina, ed i recettori per il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), le α_v -integrine, e l'antigene di membrana specifico della prostata, sono stati identificati essere i *target* di questa classe di agenti antivascolari (Siemann *et al.*, 2004; Siemann *et al.*, 2002; van Heeckeren *et al.*, 2006).

2.5.2 *Small-molecule VDAs*

La seconda categoria di agenti antivascolari include molecole che non sono localizzate specificamente a livello dell'endotelio tumorale, ma sfruttano le differenze tra l'endotelio del tessuto sano e quello tumorale per indurre selettivamente alterazioni dei vasi sanguigni.

Si distinguono due classi di *small-molecule* VDAs: agenti depolimerizzanti dei microtubuli e flavonoidi. L'interesse nei confronti delle proprietà antivascolari degli agenti in grado di legare la tubulina è stato inizialmente suscitato da studi concernenti gli alcaloidi della vinca, che hanno mostrato di indurre danno vascolare in modelli tumorali preclinici, sebbene a dosi vicine a quelle tossiche.

Attualmente, i più importanti composti appartenenti a questa classe di molecole sono la combretastatina A-4 disodio fosfato (CA4P) (**2**), ZD6126 (**3**) e AVE8062 (**4**), che inducono effetti antivascolari ed antitumorali a dosi minori del 10% della dose massima tollerata (MTD, *maximum tolerated dose*) (figura 2). L'arresto del flusso sanguigno determinato da queste molecole interessa i vasi tumorali neoformati, mentre gli effetti sui tessuti sani sono scarsi o assenti.

Per quanto concerne invece i flavonoidi, si ritiene che queste molecole esplichino i loro effetti sui vasi sanguigni attraverso il rilascio localizzato di $TNF\alpha$ (*tumor necrosis factor alpha*) dai macrofagi attivati nel tessuto tumorale.

Il ruolo del $TNF\alpha$ nell'attività antitumorale dei flavoni è stato dimostrato dalla scoperta che gli anticorpi anti- TNF inibiscono il collasso vascolare indotto dal flavone-8-acido acetico (FAA, *flavone acetic acid*) (**5**). Sebbene sia FAA che il più potente composto tricyclico 5,6-dimetilxantenone-4-acido acetico (DMXAA 5,6-*dimethylxanthenone-4-acetic acid*) (**6**) abbiano mostrato un'azione selettiva sui vasi sanguigni in modelli tumorali murini, solo il DMXAA è in grado di stimolare anche i macrofagi umani. Quest'ultima molecola è considerata, pertanto, il più interessante composto appartenente alla classe dei flavonoidi antivascolari (Siemann *et al.*, 2004; Siemann *et al.*, 2002; van Heeckeren *et al.*, 2006).

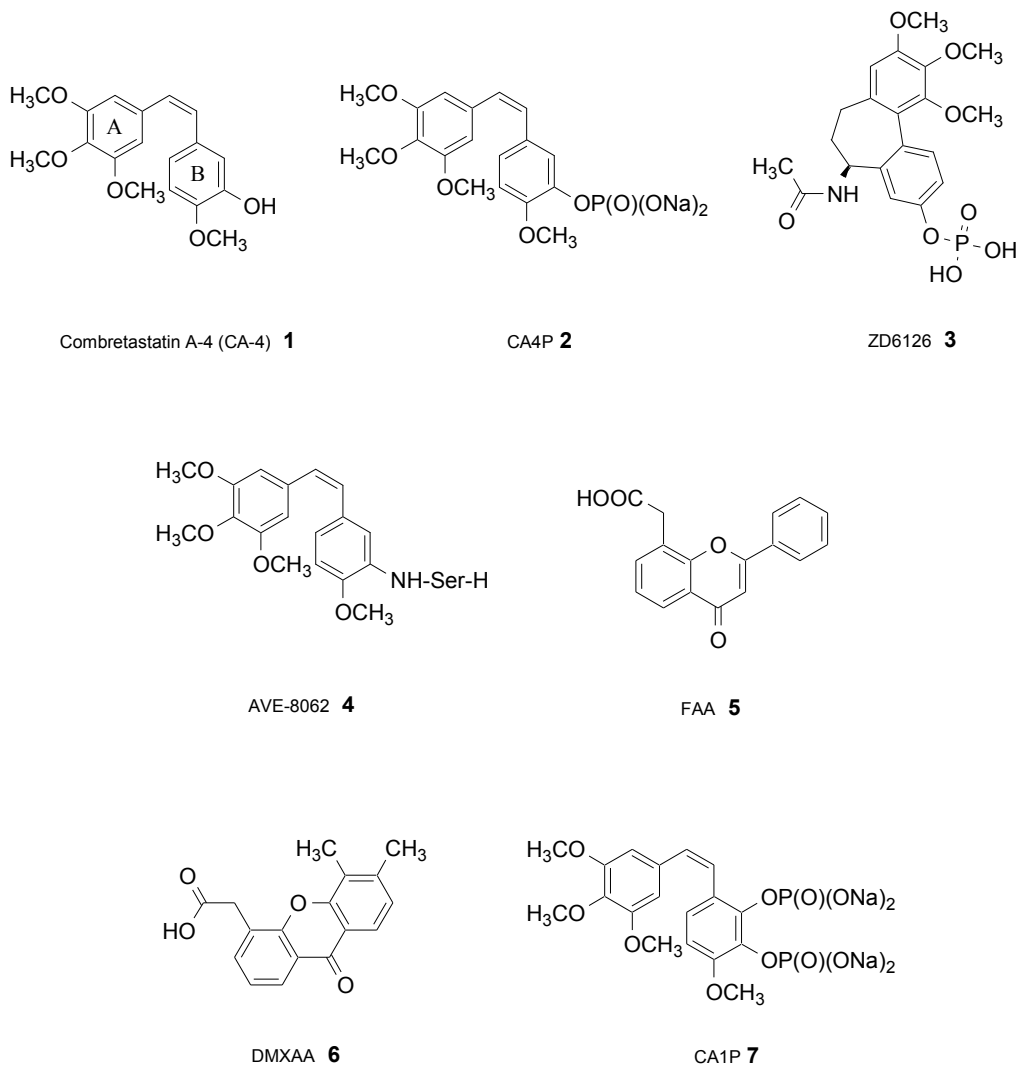


Figura 2 – Principali agenti antivascolari.

CAPITOLO 3

La combretastatina A-4

3.1 Introduzione

La combretastatina A-4 (**1**) è un *cis*-stilbene naturale isolato dalla corteccia dell'albero sudafricano *Combretum caffrum* (Eckl. and Zeyh.) Kuntze (Combretaceae) nel 1989 da Pettit e collaboratori (Pettit *et al.*, 1989).

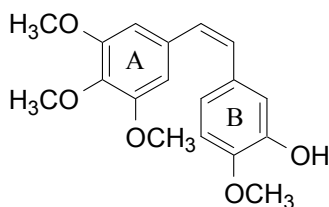
CA-4 **1**

Figura 1 – Struttura della combretastatina A-4.

Sono state isolate da varie piante circa una dozzina di molecole appartenenti alla classe delle combretastatine, come ad esempio la combretastatina A-1 (**8**), identificata nel 1987 (figura 2). Tra queste molecole, il composto al quale è stata rivolta maggiore attenzione è la CA-4.

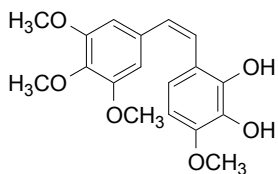
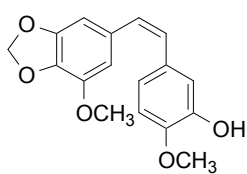
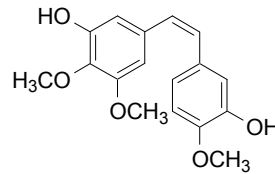
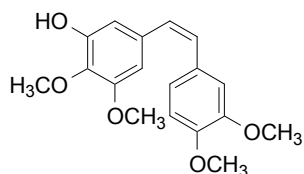
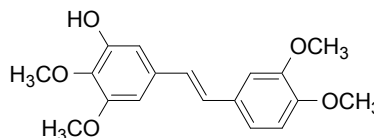
Combretastatina A-1 (CA-1) **8**Combretastatina A-2 (CA-2) **9**Combretastatina A-3 (CA-3) **10**Combretastatina A-5 (CA-5) **11**Combretastatina A-6 (CA-6) **12**

Figura 2 – Struttura di alcune combretastatine.

3.2 Attività biologiche

La combretastatina A-4 presenta una potente attività citotossica su un'ampia varietà di linee cellulari tumorali umane, incluse linee *multidrug resistant* (MDR), con valori di IC_{50} nell'ordine del nanomolare o subnanomolare. La citotossicità mostrata dalla CA-4, così come da altre combretastatine, è legata alla capacità di queste molecole di inibire la polimerizzazione della tubulina (Nam, 2003; Odlo *et al.*, 2008).

Questo composto è in grado di legare la tubulina a livello del sito di legame per la colchicina, e costituisce uno dei più potenti inibitori della polimerizzazione della tubulina fino ad ora noti (Tron *et al.*, 2006). La letteratura riporta per la CA-4, infatti, un valore di IC_{50} pari a 1.2 μ M (Hall *et al.*, 2008; Kaffy *et al.*, 2006; Kaffy *et al.*, 2005; Pettit *et al.*, 2000; Pinney *et al.*, 2000).

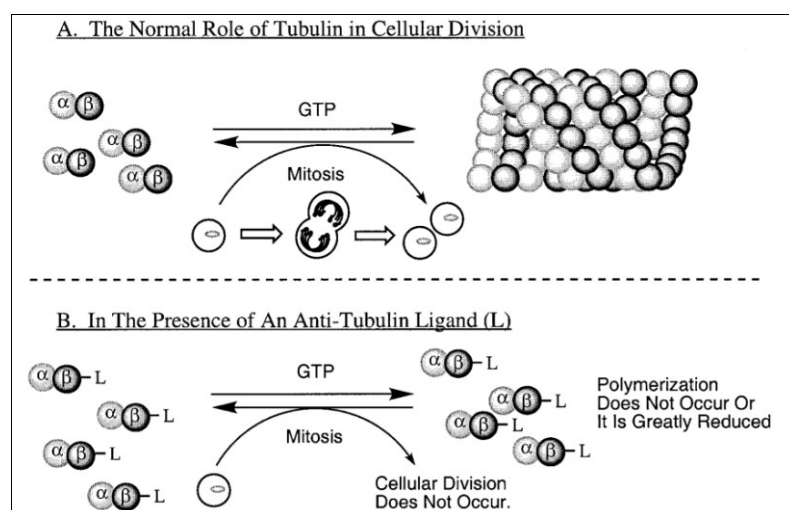


Figura 3 – (A) Ruolo della polimerizzazione della tubulina nella divisione cellulare (B) Alterazione dell'equilibrio dinamico in presenza di un agente che inibisce la polimerizzazione della tubulina (L), quale la CA-4 (Pinney *et al.*, 2000).

La combretastatina A-4 agisce come inibitore competitivo del sito di legame della colchicina sulla tubulina; per questo composto è stato evidenziato, infatti, un valore di costante di inibizione (K_i , *Inhibition constant value*) di 0.14 μ M. È stato dimostrato che la CA-4 è in grado di spiazzare la [3H]-colchicina dal suo sito di legame, ma non la [3H]-vinblastina dal sito di legame per gli alcaloidi della vinca. A differenza della colchicina, il cui legame alla tubulina è lento e temperatura-dipendente, il legame della CA-4 sembra essere rapido e indipendente dalla temperatura. È stato osservato, infatti, che la preincubazione non aumenta l'effetto inibitorio della combretastatina sulla polimerizzazione della tubulina, e che la formazione dei complessi CA-4-tubulina avviene anche a contatto con il ghiaccio.

Il legame è reversibile, come evidenziato dallo spiazzamento della CA-4 dal sito di legame della colchicina determinato da alte concentrazioni di colchicina radiomarcata (Nam, 2003).

La combretastatina A-4, dunque, lega il sito di legame della colchicina sulla tubulina più tenacemente della colchicina stessa, ma non in modo pseudo-irreversibile. Le differenze nelle cinetiche di legame influenzano l'attività *in vivo* di questi composti, e giustificano l'ampia finestra terapeutica della combretastatina A-4 rispetto agli altri agenti in grado di legare la tubulina.

Conseguentemente alla sua capacità di legare la tubulina, la CA-4 interferisce con l'organizzazione del citoscheletro. La figura 4 mostra gli effetti dell'esposizione a questa molecola sull'organizzazione dei microtubuli nelle cellule HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*); è possibile osservare una notevole alterazione della normale struttura del citoscheletro, che determina un conseguente arrotondamento delle cellule ed il loro distacco. Questi cambiamenti sono reversibili dopo brevi esposizioni alla CA-4 (di durata inferiore alle due ore).

I cambiamenti morfologici indotti da questa molecola coinvolgono la riorganizzazione dell'actina.

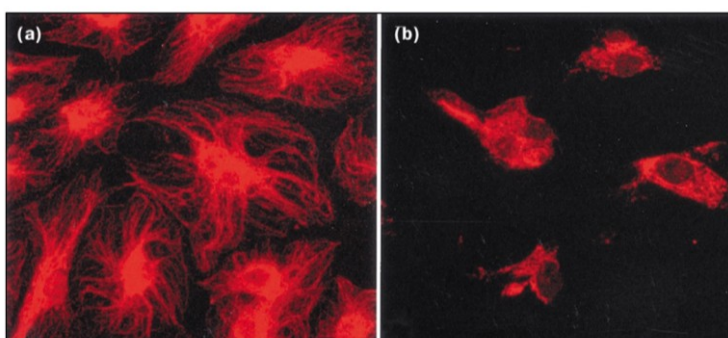


Figura 4 – Alterazioni del citoscheletro indotte dalla combretastatina A-4. (a) Cellule HUVEC non trattate. (b) cellule trattate con CA-4 (3 $\mu\text{mol/L}$) per 6 ore visualizzate mediante microscopia confocale (Griggs *et al.*, 2001b).

Gli effetti antivascolari della combretastatina A-4 sono stati studiati anche *in vivo* su diversi modelli di tumore murino. Vari studi hanno consentito di dimostrare che una singola somministrazione (100 mg/kg) non incide in modo significativo sulla crescita del tumore. Tuttavia, ripetute somministrazioni (12,5-25,0 mg/kg due volte al giorno) per periodi di 10-20 giorni determinano il 50% della riduzione della crescita del carcinoma polmonare ectopico di Lewis ed un sostanziale rallentamento della crescita del tumore mammario murino. In questi esperimenti la CA-4 ha indotto necrosi emorragica, e l'analisi istologica dei tessuti dopo perfusione con un colorante fluorescente ha rivelato una notevole diminuzione (> 90%) nel volume vascolare funzionale di carcinoma mammario murino. Questi risultati confermano l'ipotesi che la molecola provochi dei danni al sistema vascolare, che inducono la necrosi (Griggs *et al.*, 2001b).

Un dato estremamente rilevante è la selettività della combretastatina A-4 per le cellule endoteliali in rapida divisione rispetto alle cellule non in accrescimento (Adams *et al.*, 2000).

Le immagini di risonanza magnetica (MRI, *magnetic resonance imaging*), che consentono di monitorare direttamente gli effetti *in vivo* degli agenti antivascolari, hanno consentito di evidenziare che la CA-4 determina forti effetti antivascolari limitatamente alla parte centrale di un tumore. Conseguentemente, una piccola ma

vitale quantità di tessuto tumorale resta in periferia, ed essa può rigenerare il tumore in seguito alla sospensione del farmaco.

Coerentemente con queste osservazioni, sono state sperimentate differenti terapie combinate allo scopo di distruggere anche le cellule tumorali periferiche residue dopo trattamento con CA-4. È stata osservata, ad esempio, un'azione sinergica della combretastatina A-4 e del fluorouracile sull'adenocarcinoma del colon, che ha determinato, a differenza del trattamento con la sola CA-4, una significativa riduzione della crescita tumorale (Griggs *et al.*, 2001b).

Nonostante la potente attività citotossica e la notevole azione antitubulina, la combretastatina A-4 non ha mostrato effetti antitumorali notevoli nei modelli *in vivo*. Questi risultati sono stati ascritti alla scarsa biodisponibilità della molecola, legata, in parte, alla sua scarsa solubilità in acqua. I primi tentativi di superare questo ostacolo hanno condotto alla progettazione ed alla sintesi di molti zuccheri idrosolubili analoghi della CA-4. Sfortunatamente, questi composti presentavano una sostanziale diminuzione della citotossicità. Ulteriori sforzi diretti alla sintesi di profarmaci solubili in acqua hanno condotto alla sintesi del derivato disodio fosfato della CA-4 (CA4DP), caratterizzato da un'eccellente solubilità in acqua. Questo profarmaco è convertito a CA-4 da fosfatasi endogene aspecifiche (Nam, 2003).

3.3 Meccanismo d'azione

La combretastatina A-4 inibisce la polimerizzazione della tubulina dopo aver legato la proteina a livello del sito di legame per la colchicina, determinando un'alterazione dell'equilibrio dinamico necessario alla formazione dei microtubuli dagli eterodimeri α e β -tubulina, e causando la formazione di fusi mitotici anomali. Ciò causa l'arresto del ciclo cellulare nella fase M, determinando la morte cellulare per apoptosi (Kaffy *et al.*, 2005).

La letteratura riporta per la CA-4, infatti, una notevole attività di inibizione della polimerizzazione della tubulina con un valore di IC_{50} pari a 1,2 μ M (Hall *et al.*, 2008; Kaffy *et al.*, 2006; Kaffy *et al.*, 2005; Pettit *et al.*, 2000; Pinney *et al.*, 2000).

Gli effetti antivascolari della CA-4 sono correlati alla sua azione anti-tubulina. La rete di microtubuli riveste un ruolo fondamentale nel determinare la forma allungata delle cellule endoteliali vascolari. In seguito alla depolimerizzazione dei microtubuli, le cellule endoteliali subiscono un arrotondamento, e questo causa la distruzione del monostrato di cellule endoteliali che circonda i vasi sanguigni, ed espone la sottostante membrana basale. Queste alterazioni causano la congestione dei vasi e la perdita del flusso sanguigno, rifornimento di ossigeno e nutrienti per il tumore. Il tessuto tumorale va incontro, pertanto, a necrosi (Chaudhary *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2003).

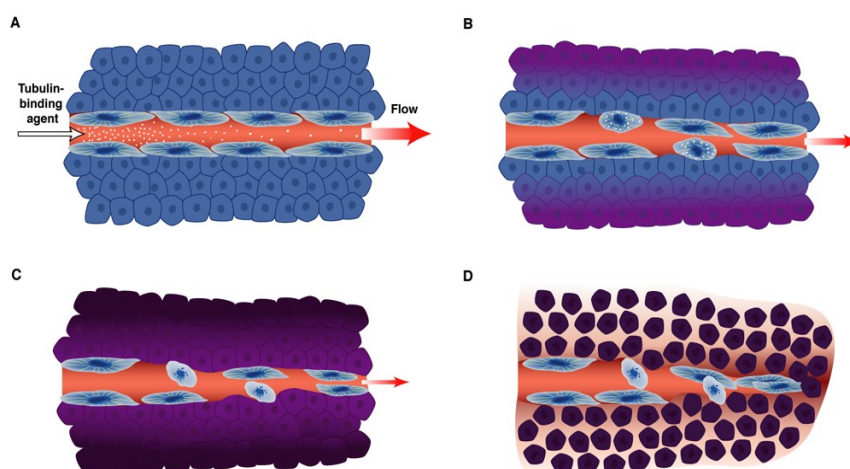


Figura 5 – Meccanismo d'azione della CA-4.

I vasi sanguigni tumorali sono più sensibili alla combretastatina A-4 di quelli normali (Kaffy *et al.*, 2005).

È stato riportato, inoltre, che la CA-4 induce la morte cellulare principalmente attraverso catastrofe mitotica indotta dall'attivazione della cistein proteasi caspasi-9 (Chaudhary *et al.*, 2007). È stato tuttavia osservato che l'inibizione della caspasi-9 mediante l'impiego di inibitori specifici non determina una contemporanea inibizione della morte cellulare indotta dalla combretastatina. In conformità a questi risultati, l'apoptosi sembrerebbe essere un meccanismo secondario di morte cellulare in una piccola percentuale delle cellule trattate con CA-4 (Lawrence *et al.*, 2003).

Nabha e collaboratori hanno studiato gli aspetti molecolari della catastrofe mitotica, ed hanno appurato se essa condividesse lo stesso *pathway* dell'apoptosi. A questo scopo è stato studiato l'effetto della CA-4 su *marker* specifici dell'apoptosi e le proteine regolatorie della fase G2/M impiegando la linea cellulare di leucemia linfocitica WSU-CLL. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la combretastatina A-4 induce catastrofe mitotica e determina l'arresto delle cellule WSU-CLL soprattutto nella fase M, indipendentemente da p53 e dal *pathway* di fosforilazione di chk1 e cdc2. L'apoptosi costituisce un meccanismo secondario di morte cellulare in una piccola percentuale di cellule attraverso l'attivazione dei due marker dell'apoptosi caspasi-9 e poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP, *poly(ADP-ribose) polymerase*). Questi dati suggeriscono che i due meccanismi di morte cellulare, la catastrofe mitotica e l'apoptosi siano indipendenti l'uno dall'altro.

La CA-4 mostra una notevole citotossicità contro molte linee cellulari umane, incluse linee *multidrug resistant* (MDR). Questa notevole attività biologica è spiegata dal fatto che la CA-4 non è un substrato della pompa MDR, che trasporta all'esterno molecole quali i farmaci antitumorali (Chaudhary *et al.*, 2007).

3.4 Relazioni struttura-attività della CA-4

La combretastatina A-4 appartiene alla classe dei composti naturali correlati ai bifenili e presenta, per quanto concerne le caratteristiche strutturali chiave, la struttura di un *cis*-stilbene (figura 1). Le relazioni struttura-attività (SAR, *structure-activity relationships*) di questa molecola sono state ampiamente studiate.

È stato osservato che l'orientamento *cis* dei due anelli aromatici è fondamentale per l'attività biologica. La combretastatina mostra, infatti, una limitata efficacia *in vivo* non solo a causa della sua lipofilità e della scarsa solubilità in acqua, ma anche in seguito all'isomerizzazione ed alla trasformazione nell'isomero *trans*, più stabile ma inattivo (Chaudhary *et al.*, 2007).

La semplicità strutturale della molecola, unita alla sua eccellente attività antivascolare, ha incoraggiato la sintesi di numerosi analoghi. Questi studi hanno dimostrato che altrettanto cruciali per l'attività biologica della CA-4 risultano essere l'anello A 3,4,5-trimetossi-sostituito e l'anello B 4-metossi-sostituito (Odlo *et al.*, 2008).

Per quanto concerne l'anello B, si ritiene che la presenza di un trimetossibenzile sia cruciale per l'azione citotossica ed anti-tubulina. Questo assunto è stato basato principalmente sulla ricorrenza in natura di questo motivo strutturale comune in altri agenti antitubulina, ed è stato successivamente dimostrato dalla superiore attività manifestata dalla CA-4 rispetto alla CA-3 (**10**), in cui un gruppo metossilico è sostituito da un idrossile (figura 2). Questo dato è supportato anche da alcuni importanti studi che hanno riportato una significativa perdita dell'attività biologica in presenza di un anello aromatico semplice, oppure in seguito alla perdita dei gruppi metilici in posizione *meta* o *para*.

L'anello B è stato da sempre considerato il solo anello aromatico soggetto a possibili sostituzioni in grado di fornire dei composti attivi e, pertanto, a questa parte della molecola è stata prestata maggiore attenzione da parte dei chimici farmaceutici. Questo anello aromatico è stato sostituito, infatti, con anelli eterociclici e fenili diversamente sostituiti.

Anche la porzione olefinica della CA-4 è stata oggetto di molteplici modificazioni chimiche, motivate dal fatto che la presenza di un doppio legame con configurazione *Z* è fondamentale per le proprietà citotossiche ed anti-tubulina. Si ritiene che il legame olefinico permetta agli anelli aromatici di disporsi nel modo appropriato e conferisca alla molecola il corretto angolo diedro per un'adeguata interazione con la molecola bersaglio. In considerazione del fatto che il doppio legame stilbenico *Z* può facilmente andare incontro ad isomerizzazione sotto l'influenza del calore e della luce, molti ricercatori hanno tentato di modificare il ponte olefinico per stabilizzare la conformazione della molecola, al fine di aumentare gli effetti biologici dei composti mediante modificazioni del doppio legame oppure la sostituzione del ponte olefinico con un anello (Tron *et al.*, 2006).

3.5 Altre attività biologiche e potenziali applicazioni terapeutiche

Affinché un agente antivascolare possa essere adeguatamente impiegato nella cura del cancro, esso deve mostrare un'azione selettiva nei confronti del sistema vascolare tumorale, e non intaccare i normali vasi sanguigni. I risultati ottenuti dimostrano che la CA-4 è sostanzialmente inattiva sui tessuti normali.

Tuttavia, è stato dimostrato che la molecola è in grado di indurre la formazione di microtrombi a livello della vascolarizzazione del gozzo indotto chimicamente nei topi.

Questi esperimenti hanno consentito di dimostrare che gli effetti antivascolari della CA-4 non sono specifici per i tumori; questa molecola è in grado di danneggiare profondamente l'endotelio delle cellule in rapida proliferazione, e dunque tessuti anche non neoplastici interessati da un rapido processo di neovascolarizzazione.

Questo aspetto non preclude affatto l'impiego della CA-4 come agente terapeutico, dato il basso tasso di proliferazione delle cellule endoteliali nei tessuti adulti sani, ma dimostra che la combretastatina A-4 induce un notevole danno al sistema vascolare neoformato, indipendentemente da quale sia l'iniziale stimolo angiogenico (Griggs *et al.*, 2001b).

Gli effetti benefici della CA-4, pertanto, non sono limitati esclusivamente al sistema vascolare tumorale. In concentrazioni non citotossiche, questa molecola è in grado di determinare un'alterazione dei filamenti di actina e dei microtubuli che determina nelle culture cellulari un'alterazione della morfologia e delle funzioni delle cellule endoteliali.

È stata valutata, ad esempio, la possibilità che la CA-4 possa inibire la vascolarizzazione della retina. Questo fenomeno costituisce una caratteristica comune a molte patologie, tra le quali la retinopatia diabetica, la causa più comune di cecità nei paesi sviluppati. Trattasi di una complicazione micro vascolare, che accompagna sia il diabete di tipo 1 che quello di tipo 2, caratterizzata da alterazioni del letto capillare della retina e che provoca un processo di neovascolarizzazione a carico della superficie interna (Kador *et al.*, 2007).

Alcuni studi hanno dimostrato che vari agenti antiangiogenici sono in grado di inibire il processo di neovascolarizzazione in modelli murini di neovascolarizzazione retinica indotta da ischemia. Griggs e collaboratori hanno esaminato la capacità della CA-4 di inibire questo fenomeno *in vivo* (Griggs *et al.*, 2002). È stato osservato che questo composto causa un'inibizione della neovascolarizzazione dose-dipendente esente da effetti collaterali. L'assenza di anomalie a livello vascolare oppure di alterazioni dei vasi neoformati nella retina dei topi trattati suggerisce che in questo caso la CA-4 agirebbe con un meccanismo antiangiogenico piuttosto che antivascolare, osservato invece nei confronti dei vasi tumorali. Le analisi istologiche ed immunoistochimiche ottenute hanno indicato, inoltre, che la combretastatina consente lo sviluppo del normale sistema vascolare retinico mentre inibisce la neovascolarizzazione legata alla patologia. Questi dati suggeriscono che la CA-4 potrebbe essere impiegata nel trattamento di patologie non neoplastiche caratterizzate da una componente angiogenetica.

In uno studio pilota, Kador e collaboratori hanno valutato la capacità della CA-4 di modificare la neovascolarizzazione retinica in cani *beagle*, che costituiscono un modello animale opportuno per questi studi poiché in grado di sviluppare neovascolarizzazione retinica simile a quella diabetica (Kador *et al.*, 2007). Sulla base dell'attività biologica manifestata dalla CA-4 sui vasi sanguigni tumorali, si riteneva che questo composto potesse alterare anche la perfusione della retina nelle aree di neovascolarizzazione retinica e che una singola dose di CA-4 fosse sufficiente ad alterare il sistema vascolare neoformato. Tuttavia, in questo modello animale non è stata osservata alcuna efficacia della combretastatina A-4. I dati ottenuti suggeriscono che la molecola non favorisce la formazione di microtrombi a livello della retina del cane *beagle*, e che il processo di neovascolarizzazione è troppo lento per essere significativamente influenzato da agenti ad azione anti-tubulina.

Il tasso di neovascolarizzazione nei cani cavia riflette la velocità del fenomeno di angiogenesi nei soggetti diabetici e, pertanto, la somministrazione di questo tipo di agenti antivascolari non risulta essere appropriata per il trattamento della retinopatia proliferativa. La distruzione delle cellule endoteliali della retina richiederebbe una somministrazione cronica di CA-4.

Griggs e collaboratori hanno inoltre verificato se la CA-4 fosse un agente antivascolare selettivo per il tessuto tumorale impiegando la tiroide iperplastica come modello *in vivo* del processo di neovascolarizzazione. È stato osservato che la CA-4 causa delle alterazioni patologiche nei tessuti normali, come ad esempio l'induzione della formazione di trombi intravascolari. Questi effetti a carico dei vasi sanguigni costituiscono un'ulteriore dimostrazione del fatto che l'azione della combretastatina non sia specifica per il sistema vascolare tumorale, ma interessi l'endotelio soggetto a rapido accrescimento. In conformità a queste osservazioni, la CA-4 potrebbe esplicare notevoli effetti in ogni fenomeno di proliferazione vascolare non neoplastica, così come il processo infiammatorio e le patologie angio-proliferative (Griggs *et al.*, 2001a).

3.6 CA4P

La scarsa solubilità in acqua della CA-4 ha indotto la sintesi di profarmaci idrosolubili. La combretastatina A-4 disodio fosfato (CA4P) è stata sintetizzata da Pettit e Rhodes nel 1998 (Pettit *et al.*, 1998). Il gruppo fosfato carico negativamente previene il trasporto cellulare della molecola, ma esso è rapidamente clivato da fosfatasi endogene aspecifiche che rilasciano l'agente attivo, in grado di attraversare le membrane cellulari (Adams *et al.*, 2000; Rustin *et al.*, 2003).

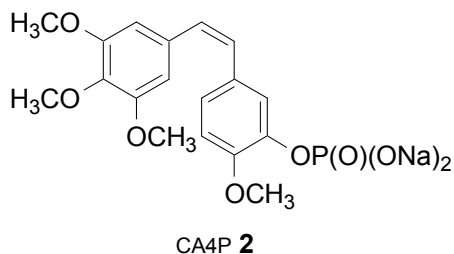


Figura 6 – Struttura della combretastatina A-4 disodio fosfato.

La CA4P causa un rapido ed esteso danno al sistema vascolare in modelli tumorali sperimentali, e mostra effetti biologici notevoli in modo particolare nei confronti dei vasi tumorali immaturi (Gaya *et al.*, 2008; Tozer *et al.*, 2001).

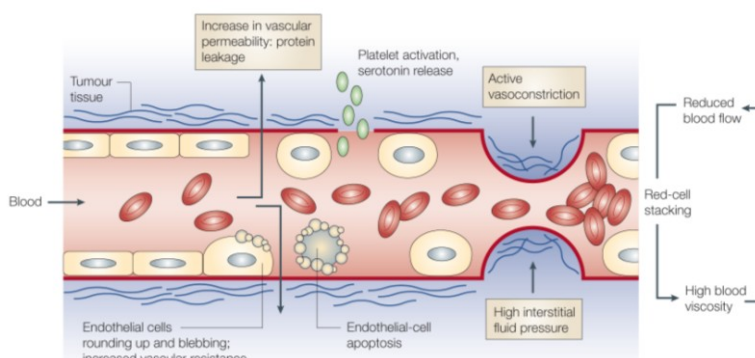


Figura 7 – Meccanismo proposto per la distruzione dei vasi sanguigni indotta da trattamento con CA4P (Tozer *et al.*, 2005).

La CA4P è in grado di provocare un'alterazione della morfologia delle cellule endoteliali, alterazioni della membrana vascolare ed un'aumentata permeabilità del monostato di cellule endoteliali (figura 7). Queste alterazioni determinano un aumento della resistenza vascolare al flusso sanguigno. L'attivazione delle piastrine ed il rilascio di serotonina possono esacerbare questi effetti. L'attiva vasocostrizione (oppure l'alterata vasodilatazione) indotta dal trattamento con CA4P è un'importante fattore che contribuisce alla distruzione del sistema vascolare tumorale (Tozer *et al.*, 2005).

La combretastatina A-4 disodio fosfato induce effetti citotossici sulle cellule endoteliali proliferanti ma non su quelle quiescenti. Inizialmente si riteneva che la citotossicità manifestata da questa molecola nei confronti delle cellule endoteliali fosse mediata dall'induzione di apoptosi, ma lavori successivi hanno dimostrato che solo una piccola percentuale di cellule è in realtà soggetta ad apoptosi e che le cellule endoteliali, invece, subiscono prevalentemente un processo di catastrofe mitotica. Questi ultimi studi hanno dimostrato, altresì, che concentrazioni non citotossiche di CA4P causano la distruzione dei filamenti di actina e dei microtubuli di tubulina in colture di cellule endoteliali umane dopo un periodo d'incubazione di un'ora.

L'attività biologica *in vivo* della combretastatina A-4 sodio difosfato è stata dimostrata verso diversi tipi di tumori murini, inclusi modelli murini di tumore coloretale e polmonare metastatici (Stevenson *et al.*, 2003; West *et al.*, 2004).

La CA4P presenta, tuttavia, tossicità cardiovascolare e neurotossicità limitanti la dose (*dose limiting toxicity*, DLT). Questi significativi effetti collaterali rappresentano il principale ostacolo ad un'ampia applicazione clinica del farmaco. È necessario, pertanto, sviluppare nuovi analoghi strutturali della combretastatina A-4 che siano caratterizzati da una maggiore selettività per le cellule endoteliali rispetto alle cellule normali, al fine di evitare la tossicità cardiaca (Chaplin *et al.*, 2002; Dowlati *et al.*, 2002; Simoni *et al.*, 2008).

Nonostante i notevoli effetti antivascolari della CA4P, questo composto induce una piccola diminuzione della crescita del tumore se somministrato in un'unica dose prossima alla dose massima tollerata (*maximum tolerated dose*, MTD). Questa mancanza di attività è stata attribuita alla sopravvivenza di un certo numero di cellule ai margini del tumore, adiacenti ai vasi sanguigni normali presenti nei tessuti circostanti. Queste cellule tumorali superstiti sono in grado di proliferare e possono

contribuire all'eventuale ricrescita del tessuto tumorale ed alla rivascolarizzazione delle aree centrali necrotiche del tumore (Kirwan *et al.*, 2004).

Al fine di migliorare l'efficacia terapeutica del farmaco, è stato valutato l'impiego della CA4P in combinazione con le terapie convenzionali (quali radioterapia e cisplatino), in modo che la combretastatina A-4 disodio fosfato potesse agire a livello della parte centrale e sostanziale del tumore, spesso resistente alle terapie convenzionali, e in modo che i tradizionali approcci terapeutici potessero essere impiegati utilmente contro le cellule ai margini dell'area tumorale. Sono state riportati effetti sinergici efficaci con la radioimmunoterapia e l'ipertermia (West *et al.*, 2004).

Attualmente la CA4P (ZybreStat™, Oxigene Inc.) seguita dalla CA1P (7), costituisce il farmaco guida tra gli agenti antivascolari.

Sono in corso di valutazione, inoltre, le potenzialità della CA4P nel trattamento di patologie a carico dell'occhio, quali la retinopatia diabetica ed il retinoblastoma. Molti importanti ricerche concernenti le applicazioni mediche delle più importanti combretastatine riportano per la CA4P un'attività antiangiogenica, ed è stato dimostrato che questa molecola determina un'organizzazione aberrante dell'organizzazione dei cromosomi durante la metafase in cellule di tumore polmonare, inibisce la formazione di metastasi nel tumore gastrico, e migliora la tolleranza al glucosio nei topi diabetici, dato che a sua volta suggerisce un possibile nuovo approccio terapeutico nella cura del diabete di tipo 2 (Pettit *et al.*, 2010).

3.7 Clinical trials

A differenza degli altri agenti antivascolari, la combretastatina A-4 esplica i suoi effetti ad una dose minore del 10% della dose massima tollerata. Quest'ampia finestra terapeutica ed i risultati ottenuti dagli studi *in vivo*, hanno fatto sì che nel 1998 la CA-4 fosse sottoposta a sperimentazione clinica di fase I in USA (Ireland Cancer Center, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA) e in due centri nel Regno Unito. Ulteriori studi di fase I iniziarono nel 1999 negli Stati Uniti d'America (University of Pennsylvania Cancer Center). Questi studi, condotti su pazienti affetti da tumori in stadio avanzato, hanno consentito di ottenere dati sulla tossicità e la farmacocinetica della combretastatina A-4, e di appurarne i potenziali effetti antitumorali.

In questi primi studi clinici, la CA-4 è stata ben tollerata a dosi superiori a 56 mg/m², in base ad un protocollo che prevedeva cinque somministrazioni endovenose giornaliere per 21 giorni. Effetti tossici sono stati osservati per dosi superiori a 90 mg/m² dopo la somministrazione endovenosa di un'unica dose ad intervalli di 3 settimane. Gli effetti collaterali osservati in tutti i pazienti comprendevano nausea, vomito e dolore, ma non sono stati osservati effetti citotossici, quali ad esempio mielosoppressione, comuni alle strategie chemioterapiche convenzionali.

Questi primi studi hanno consentito di osservare che la CA-4 causa una diminuzione del flusso sanguigno nel tumore. Per dosi comprese tra 52 ed 88 mg/m², seguendo un opportuno protocollo di somministrazione, è stata osservata infatti una diminuzione del 30-60% nella perfusione del tumore in quattro pazienti su cinque (Griggs *et al.*, 2001b).

Attualmente, diversi agenti antivascolari sono in fase di sperimentazione clinica, tra cui la CA4P, la CA1P (7), AVE8062 (4) e ZD6126 (3).

La compagnia farmaceutica Oxigene, che sviluppa la combretastatina A-4 disodio fosfato, ha introdotto la CA4P in studi clinici di fase II / III contro il carcinoma anaplastico della tiroide.

Questo composto è inoltre in fase II di sperimentazione clinica contro il cancro ovarico resistente al platino in stadio avanzato e contro il tumore del polmone non a piccole cellule (*Non Small Cell Lung Cancer* - NSCLC) in combinazione con la chemioterapia tradizionale. La combretastatina A-4 disodio fosfato è inoltre in sperimentazione clinica di fase I in associazione al farmaco anti-VEGF bevacizumab (Avastin™, F. Hoffmann-La Roche Ltd) contro tumori solidi in stadio avanzato (http://oxigene.com/pipeline/clinical_trials/).

I dati finora ottenuti dimostrano che la CA4P determina profonde alterazioni vascolari in associazione al bevacizumab e che la combinazione è sicura e ben tollerata.

La combretastatina A-1-P (CA1P o Oxi4503, **7**), il profarmaco del composto naturale CA-1, sembrerebbe un agente antivascolare ancora più attivo della CA4P; è attualmente in sperimentazione clinica di fase I, ed i primi risultati segnalano una buona attività a dosi ben tollerate (Hall *et al.*, 2008; James *et al.*, 2008; Kanthou *et al.*, 2009).

3.8 Sintesi della CA-4

Una prima procedura per la sintesi della combretastatina A-4 ed i suoi analoghi è stata descritta da Pettit e collaboratori, che hanno impiegato una reazione di Witting per la preparazione dei due isomeri *Z* ed *E* in un rapporto di circa 1:1.5, che richiede successivamente un processo di separazione per l'isolamento dell'isomero *cis* in forma pura (Pettit *et al.*, 1995).

La semplice struttura della CA-4 ha incoraggiato la sintesi della combretastatina e dei suoi analoghi, e sono state descritte molte procedure sintetiche. Sono riscontrabili in letteratura diverse strategie di sintesi che coinvolgono l'impiego di reazioni di Witting, condensazioni di Perkin, accoppiamenti di Suzuki o di Sonogashira e reazioni di Ramberg-Bäcklund. Alcune di queste procedure sono caratterizzate, tuttavia, da uno scarso controllo della geometria del doppio legame oppure da rese piuttosto basse (Lara-Ochoa F. *et al.*, 2007).

Un ulteriore approccio alla sintesi della CA-4 è stata descritto da Harrowven e collaboratori, che hanno realizzato anche una piccola libreria di analoghi con una notevole selettività per gli isomeri *Z* nella reazione di olefinazione (figura 8) (Harrowven *et al.*, 2006).

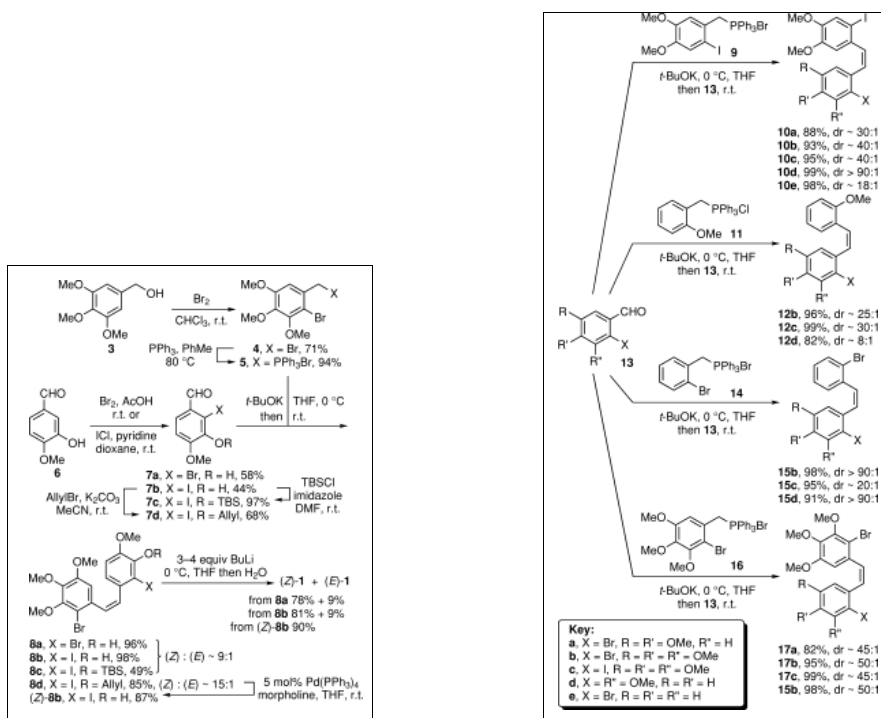


Figura 8 – Sintesi della combretastatina A-4 ed analoghi (Harrowwn *et al.*, 2006).

Robinson e colleghi hanno progettato una semplice procedura per la sintesi della combretastatina A-4 utilizzando la reazione di Ramberg-Bäcklund per ottenere Z-stilbeni (Robinson *et al.*, 2007).

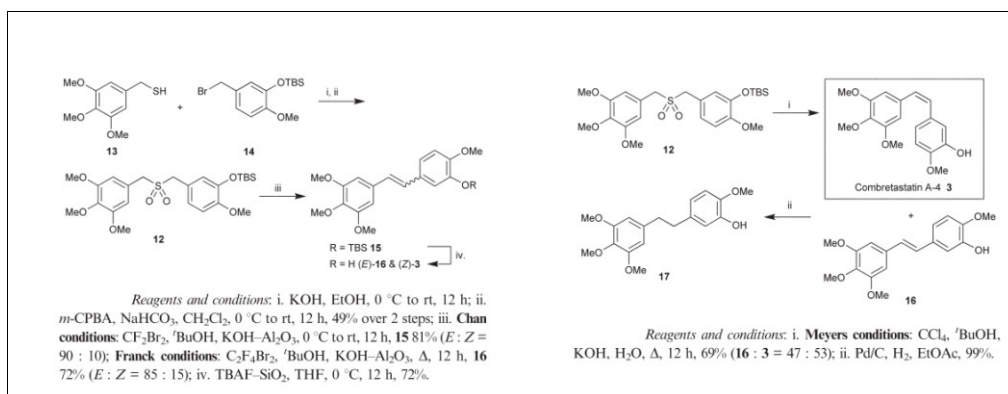


Figura 9 – Sintesi della combretastatina A-4 ed analoghi (Robinson *et al.*, 2007).

Una semplice ed efficace strategia di sintesi della combretastatina A-4 è stata recentemente messa a punto da Camacho-Davila e collaboratori, che hanno impiegato utilmente l'accoppiamento di un reattivo di Grignard con il bromostilbene (Camacho-Davila, 2008).

3.9 Analoghi della combretastatina A-4

L'impiego clinico della combretastatina A-4 come agente antitumorale è limitato dalla scarsa biodisponibilità del farmaco legata alla sua scarsa solubilità in acqua. Un secondo limite alla sua applicazione è costituito dalla tendenza della CA-4 ad isomerizzare, ed a trasformarsi nell'isomero *trans*, più stabile ma inattivo.

La possibilità di ottenere composti ancora più attivi e caratterizzati da una notevole selettività ha indotto molti ricercatori a progettare analoghi maggiormente solubili e stabili (Johnson *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

Sono stati descritti centinaia di derivati della CA-4 (Brown *et al.*, 2006; Chaudhary *et al.*, 2007; Nam, 2003; Singh *et al.*, 2009; Tron *et al.*, 2006).

Molti analoghi *cis-blocked* contenenti un anello trimetossifenile sono stati sintetizzati e valutati per la loro capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina (Kerr *et al.*, 2007). Al fine di evitare i problemi di instabilità presentati dalla CA-4, altri analoghi sono stati invece realizzati impiegando eterociclici pentaciclici quali imidazolo, ossazolo, pirazolo (Wang *et al.*, 2002), tiazolo, triazolo, tetrazolo (Ohsumi *et al.*, 1998), ciclopentenone (Kim *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2002), furanone (Kim *et al.*, 2002), oppure ossazolone (Nam *et al.*, 2001).

Molti di questi composti sono stati testati per i loro effetti sulla polimerizzazione della tubulina e per le loro proprietà antiproliferative ed altre attività biologiche, e ne sono stati studiati i possibili meccanismi d'azione. La realizzazione e lo studio di questi analoghi hanno consentito di comprendere approfonditamente le relazioni struttura-attività della CA-4.

CAPITOLO 4

Parte Sperimentale I

Sintesi di nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli concepiti come analoghi della combretastatina A-4

4.1 Introduzione

L'impiego clinico della combretastatina A-4 come agente antitumorale è limitato dalla scarsa solubilità in acqua di questo composto e quindi dalla sua bassa biodisponibilità, fattore che ha determinato la necessità di somministrare la CA-4 sotto forma di profarmaco (CA4P). Questa molecola tende, inoltre, ad isomerizzare ed a trasformarsi nel suo isomero *trans*, forma termodinamicamente stabile ed inattiva.

Questi fattori limitanti hanno motivato una serie di studi finalizzati alla sintesi di composti più stabili e maggiormente solubili che mostrassero un'attività biologica simile a quella della combretastatina A-4 (Johnson *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi. Obiettivo della ricerca è stato quello di realizzare nuovi analoghi della CA-4 e di determinarne l'attività biologica *in vitro*.

L'attività di ricerca svolta nel corso della tesi di dottorato è stata realizzata presso il Laboratorio di Fitofarmacia dell'Università della Calabria e presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes di Parigi, in conformità a quanto stabilito da una convenzione di cotutela stipulata tra l'Università degli Studi di Salerno e l'ateneo francese.

Sono stati realizzati nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli, ed è stata successivamente valutata la loro attività biologica. E' stata determinata la citotossicità dei composti, gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali EA.hy 926, e la loro capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina.

4.2 Studi precedenti

Presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università Paris Descartes erano stati già sintetizzati degli analoghi eterociclici della combretastatina A4, 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.

Gli studi antecedenti hanno costituito, dunque, la base per la progettazione e, successivamente, la sintesi di nuovi analoghi strutturali.

4.2.1 Analoghi eterociclici della CA-4: 3-aroilindoli

Nel corso dei precedenti lavori erano stati sintetizzati dei nuovi 3-aroilindoli, concepiti quali analoghi eterociclici della CA-4, al fine di ottenere molecole che non presentassero l'inconveniente dell'isomerizzazione (Dupeyre *et al.*, 2006). Il ponte tra l'anello 3,4,5-trimetossifenile e l'anello benzilico del composto di riferimento era stato mantenuto (figura 1).

Inoltre, al fine di determinare la distanza e l'angolo di legame ottimale tra i due anelli, erano stati preparati diversi analoghi, con ponti diversamente sostituiti (O; S; H, OH; H, OCH₃; H, OCOCH₃; H). Sempre nel corso di queste ricerche era stato valutato l'effetto di diverse sostituzioni sull'atomo di azoto dell'indolo ed inoltre, al fine di mimare il gruppo *p*-metossile considerato essenziale per l'attività della CA-4, erano stati preparati analoghi che presentavano un gruppo 6-MeO sul nucleo indolico.

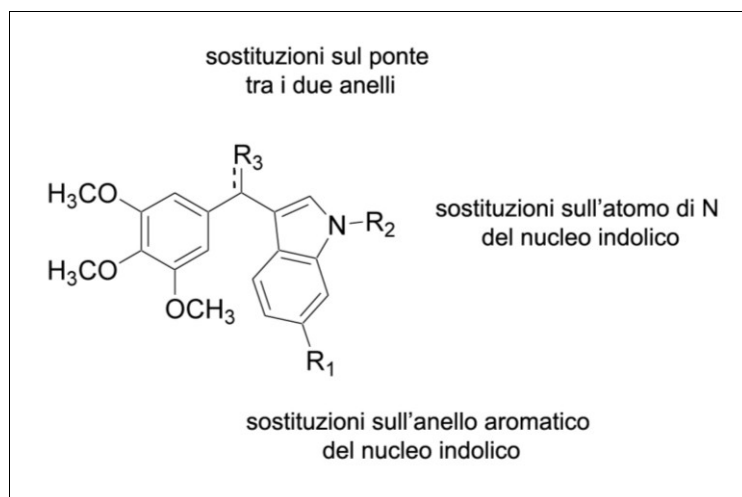


Figura 1 – Varie sostituzioni realizzate per la preparazione di nuovi analoghi.

I composti **1-6** (figura 2) hanno mostrato la maggiore attività biologica. Lo studio delle relazioni struttura-attività di questa classe di molecole ha confermato ancora una volta l'importanza della presenza di un gruppo 6-MeO sul nucleo indolico per l'attività biologica.

In particolar modo, quattro delle molecole menzionate (**1**, **4**, **5**, e **6**) hanno presentato un'attività simile a quella della CA-4 in termini di inibizione della polimerizzazione della tubulina e di citotossicità sulla linea cellulare di melanoma B16. Queste molecole, inoltre, hanno dimostrato una capacità di alterare la morfologia delle cellule endoteliali EA.hy 926 pari a quella della combretastatina A-4, mostrando notevole attività antivascolare *in vitro*.

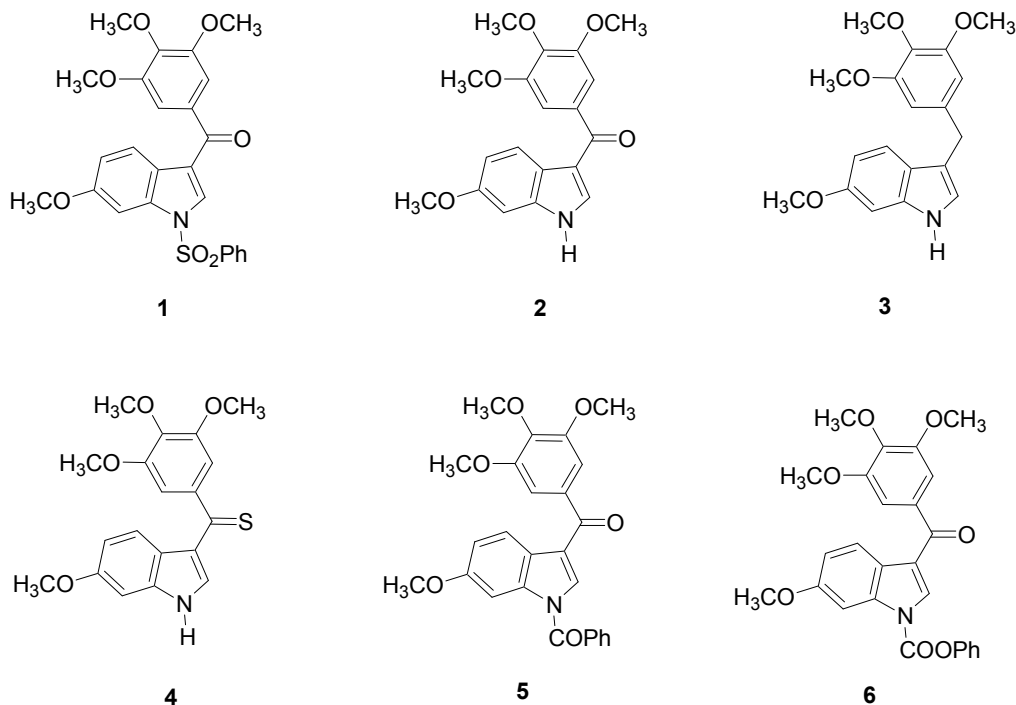


Figura 2 – 3-aroilindoli dotati di maggiore attività biologica tra quelli sintetizzati presso il laboratorio di Farmacognosia dell'università Paris Descartes (Dupeyre *et al.*, 2006).

4.2.2 3-Aroilindoli disostituiti

Il composto **2**, 6-metossi-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-1H-indolo (BPR0L075), ha mostrato una potente attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina, ed è stato osservato che questo composto è in grado di legare la tubulina sul sito di legame per la colchicina (Dupeyre *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2004). Questa molecola presenta inoltre una forte attività citotossica contro diverse linee cellulari tumorali umane, incluse cellule *multidrug-resistant* (Kuo *et al.*, 2004).

Il composto BPR0L075 e la combretastatina A-4 presentano molte caratteristiche strutturali comuni. Entrambe le molecole possiedono due anelli benzenici legati da una catena a due atomi di carbonio: un anello 3,4,5-trimetossifenile, ed un secondo anello recante un gruppo metossilico.

Nel corso dei lavori precedenti a quelli oggetto della presente tesi di dottorato, è stato deciso dunque di introdurre un gruppo idrossilico in posizione 7 del nucleo indolico, e di valutare l'influenza che tale modificazione strutturale potesse avere sull'attività antiproliferativa della molecola e sull'inibizione della polimerizzazione della tubulina. Pertanto si è proceduto alla sintesi ed alla valutazione delle proprietà biologiche del composto **7** (7-idrossi-6-metossi-3-(3',4',5'-trimetossibenzoil)-1H-indolo). Sono stati sintetizzati sette nuovi aroilindoli disostituiti, cinque appartenenti ad una serie 5,6-disostituita e due composti 6,7-disostituiti (figura 3) (Ty *et al.*, 2008).

L'attività biologica di queste molecole è stata valutata *in vitro*, ed i risultati ottenuti hanno mostrato che l'introduzione di un gruppo idrossilico in posizione 7 del nucleo indolico, a differenza di una sostituzione in posizione 5, non determina una notevole perdita dell'attività citotossica e dell'attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina. L'analogo 7-idrossi sostituito del composto **2** (BPR0L075), la molecola **7**, ha mostrato, infatti, una maggiore attività biologica del composto **9** (analogo disostituito di BPR0L075). Per l'analogo **14**, nonostante una debole attività inibitoria sulla polimerizzazione, è stata invece evidenziata una notevole capacità di alterare la morfologia delle cellule endoteliali, simile a quella di BPR0L075 e della stessa combretastatina A-4.

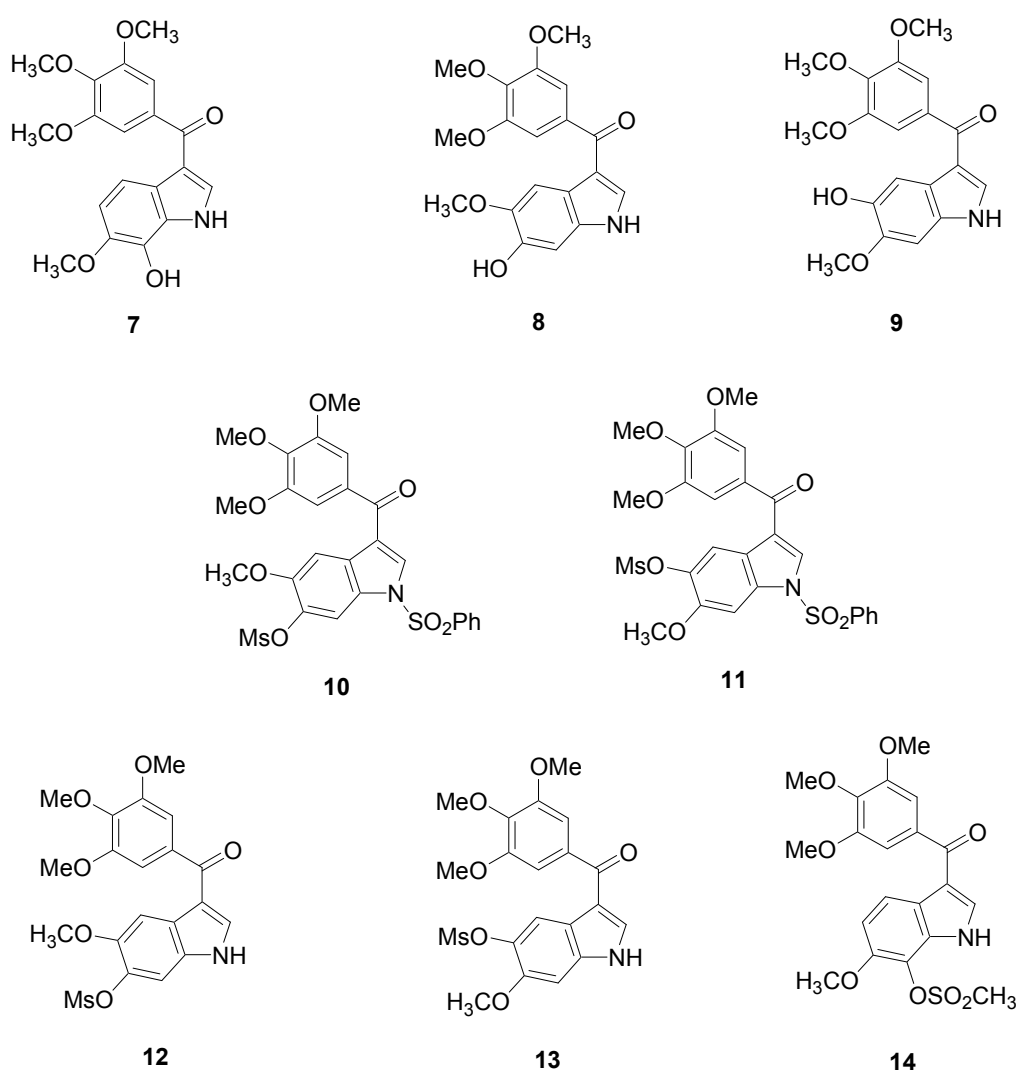


Figura 3 – Aroindoli disostituiti.

4.2.3 Tetraidrocarbazoli e carbazoli: analoghi "cis-blocked" dei 3-aroilindoli

Molti studi presenti in letteratura hanno evidenziato l'attività biologica di analoghi della CA-4, quali ariltioindoli, aroilindoli ed 1,3-diidroindol-2-oni (figura 4).

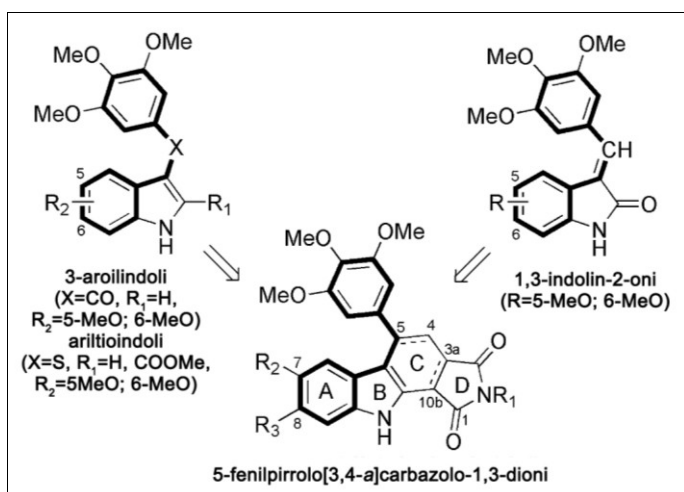


Figura 4 – Struttura generale di 3-aroilindoli, 3-ariltioindoli, 1,3-indolin-2-oni e 5-fenilpirrolo[3,4-a]carbazolo-1,3-dioni (Ty *et al.*, 2010).

Nel corso degli studi realizzati presso il Laboratorio di Farmacognosia dell'Università *Paris Descartes*, i lavori successivi hanno riguardato la progettazione e la sintesi di 5-(3',4',5'-trimetossifenil)pirrolo[3,4-a]carbazoli-1,3(2*H*,10*H*)-dioni, concepiti come analoghi *cis-blocked* di 3-aroilindoli ed ariltioindoli, derivati dalla combretastatina A-4 (Ty *et al.*, 2010).

La sintesi di queste molecole ha costituito dunque un'ulteriore estensione del lavoro precedentemente realizzato sui 3-aroilindoli.

I composti desiderati sono stati ottenuti mediante una procedura di sintesi condotta in due *step*, uno dei quali, il passaggio chiave, è costituito da una reazione *one pot* a più componenti. Il lavoro realizzato ha consentito di sintetizzare una serie di tetraidro[3,4-a]carbazoli intermedi, ed i loro corrispondenti carbazoli (figura 5).

In particolar modo, sono stati valutati gli effetti sull'attività biologica delle seguenti modificazioni strutturali: i) sostituzioni in posizione 7 e/o 8 dell'anello A (molti composti sintetizzati sono disostituiti e presentano un gruppo metossilico in posizione 7 (R₂) ed un sostituito in posizione 8 (R₃)); ii) modificazioni a livello dell'anello C; iii) presenza o meno di un anello benzenico sull'atomo di azoto del nucleo pirrolico.

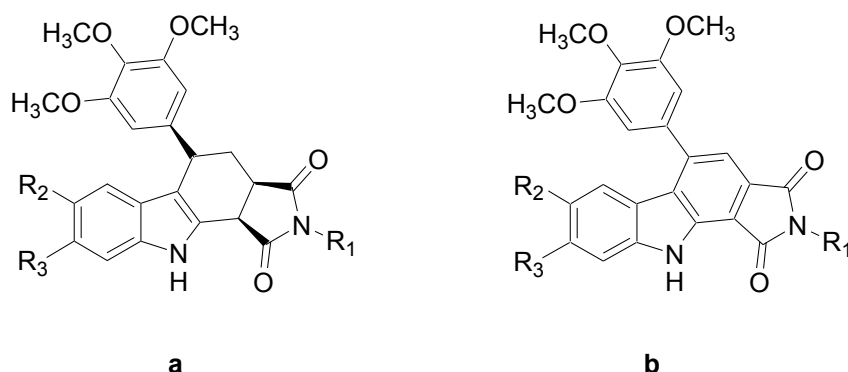


Figura 5 – Struttura generale dei tetraidrocarbazoli (a) e dei carbazoli (b).

Questi composti sono stati testati per i loro effetti antivascolari mediante l'impiego di tre test *in vitro* che hanno permesso di valutare: la citotossicità sulla linea cellulare B16; l'induzione di un cambiamento nella morfologia delle cellule endoteliali EA.hy926, considerato predittivo di una potenziale attività antivascolare *in vivo*; l'inibizione della polimerizzazione della tubulina (ITP, *Inhibition of Tubulin Polymerization*).

I risultati ottenuti hanno consentito di evidenziare che la natura e la posizione dei sostituenti sull'anello A influenzano notevolmente l'attività biologica delle molecole.

Per quanto concerne l'attività antiproliferativa, i composti **15**, **18**, **19**, **20** e **21** sono risultati essere i più attivi, con valori di $IC_{50} < 10 \mu M$ (figura 6).

In particolar modo, i tetraidrocarbazoli maggiormente citotossici sono il composto **15**, che presenta un benzile sull'atomo di azoto del nucleo pirrolico ed è privo di sostituenti R_2 ed R_3 e, per la serie NH, il composto **18**, che presenta un gruppo metossilico quale sostituente R_3 .

I carbazoli caratterizzati da una migliore attività citotossica sono gli analoghi benzilati sull'atomo di azoto privi di sostituenti R_2 ed R_3 (composto **19**), e con un gruppo metossile (**20**). Anche la molecola **21**, con un gruppo NH_2 , ha mostrato attività significativa.

Le molecole **16**, **17**, **18**, e **21** hanno inoltre determinato un'alterazione della morfologia delle cellule endoteliali a concentrazioni micromolari ($IC_{50} < 10 \mu M$). Ad eccezione della molecola **17**, queste proprietà biologiche sembrerebbero essere legate alla presenza di un metossile quale sostituente R_3 .

Per quanto concerne gli effetti inibitori sulla polimerizzazione della tubulina, solo i composti 8-metossilati **16**, **18** e **22** hanno mostrato notevole attività, con valori di IC_{50} simili a quelli della CA-4 e della colchicina.

In considerazione dei risultati ottenuti, i carbazoli sono risultati essere, in generale, maggiormente attivi dei tetraidrocarbazoli, e la molecola **22** è stata quella caratterizzata da una maggiore attività biologica.

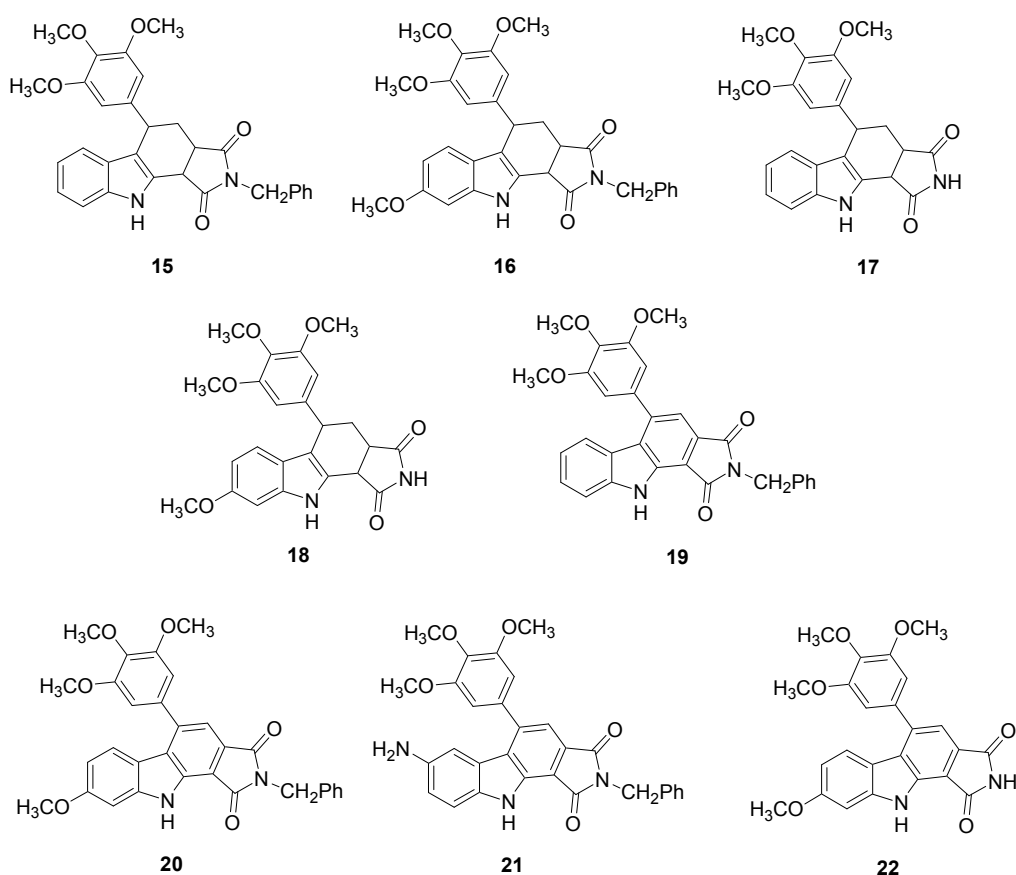


Figura 6 – Tetraidrocarbazoli e carbazoli maggiormente attivi.

4.3 Lavoro sperimentale: progettazione delle molecole

Obiettivo del progetto di ricerca oggetto della presente tesi è stato quello di sintetizzare analoghi dei composti precedentemente ottenuti, apportando ulteriori modificazioni strutturali atte a migliorarne le proprietà biologiche. Il lavoro di tesi è stato dunque dedicato alla sintesi di 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, e di poter ottenere dei composti che esplicassero una migliore attività biologica (figura 7).

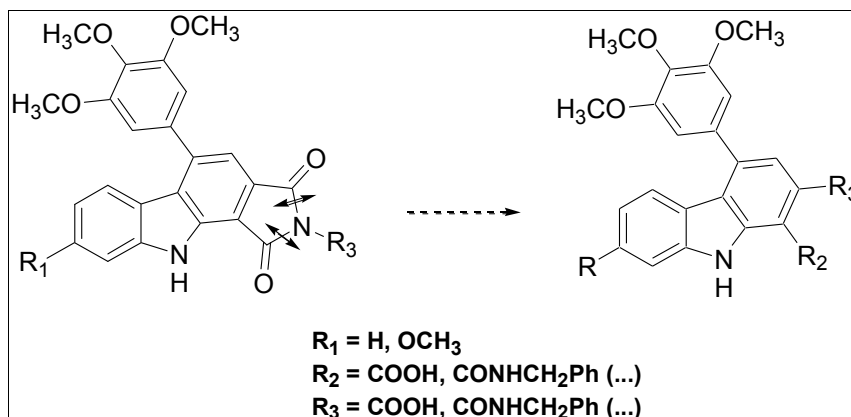


Figura 7 – Scelta dello scheletro base delle molecole.

4.4 Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti a partire dall'indolo semplice: serie R=H

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, con qualche opportuna modifica (Noland *et al.*, 1996).

4.4.1 Reazione "one pot" impiegata per la sintesi dei tetraidrocarbazoli

Nel 1993 Noland e collaboratori hanno messo a punto una strategia di sintesi che consente la preparazione di composti pentaciclici, tetraidropirrolo[3,4-a]carbazoli, in una reazione in un solo step (*one pot*) a tre componenti (Noland *et al.*, 1993). Questa metodica prevede l'impiego di indolo, una maleimide ed un metilchetone in quantità equimolari ed in presenza di quantità catalitiche di acido cloridrico. L'impiego di acetofenone, in particolare, consente l'introduzione di un fenile in posizione 5 (figura 8). I tetraidrocarbazoli **23** ottenuti possono essere successivamente ossidati mediante impiego di DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzochinone) ai corrispondenti carbazoli **24** in una reazione quantitativa.

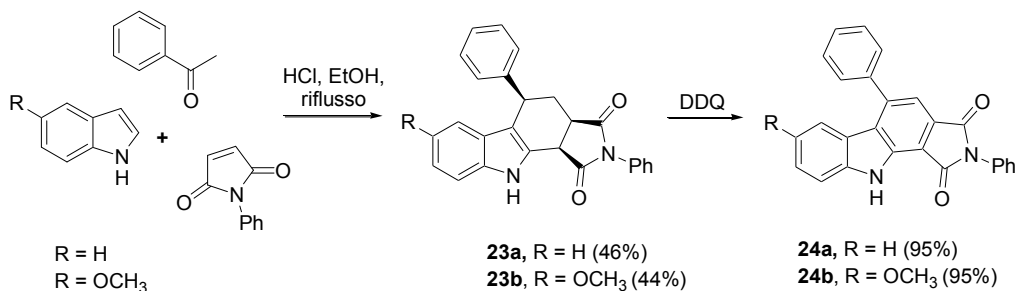


Figura 8 – Schema di sintesi proposto da Noland e collaboratori (Noland *et al.*, 1993).

Per quanto concerne il meccanismo della reazione, si ritiene che avvenga inizialmente una sostituzione elettrofila in posizione 3 dell'indolo (figura 9). Successivamente, l'indolo subisce reazioni di disidratazione e di aromatizzazione che determinano la formazione di un intermedio di tipo 3-vinilindolo, non isolato. Il diene così ottenuto reagisce *in situ* con la maleimide (dienofilo) con una reazione di cicloaddizione di Diels-Alder, determinando la formazione di un tetraidrocarbazolo intermedio che presenta un doppio legame in posizione 5-5a. Questa molecola tende ad isomerizzare spontaneamente per dare un derivato con un doppio legame in posizione 5a-10a maggiormente stabile.

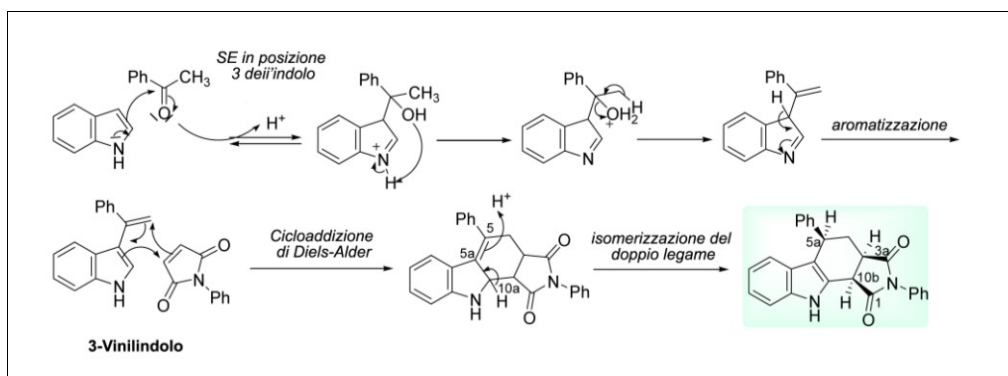


Figura 9 – Meccanismo della reazione *one pot* per la sintesi di tetraidrocarbazoli.

Lo studio della stereochimica ha evidenziato che il prodotto ottenuto è una miscela racemica di prodotti *cis*. I due protoni H_{3a} e H_{10b}, infatti, presentano una configurazione *cis*, e l'anello fenilico e quello pirrolico adottano una conformazione *cis*.

Questa strategia di sintesi è particolarmente utile ed interessante, perché consente di ottenere una grande varietà di composti pentaciclici in una sola tappa, senza che sia necessario l'isolamento del 3-vinilindolo intermedio. I carbazoli corrispondenti, inoltre, sono facilmente ottenibili.

Nel 1996, Noland e collaboratori hanno descritto la medesima reazione *one pot* a tre componenti impiegando, però, l'anidride maleica come dienofilo (Noland *et al.*, 1996).

4.4.2 Sintesi del tetraidrocarbazolo

In una reazione *one pot* e tre componenti, una soluzione di indolo, *N*-benzilmaleimide e 3,4,5-trimetossiacetofenone in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78 °C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo circa 28 ore, quando non vi sono più tracce di indolo su lastra TLC in gel di silice, la reazione è terminata ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo. La reazione permette di ottenere il tetraidrocarbazolo desiderato (**28**) con una resa del 48% (figura 10).

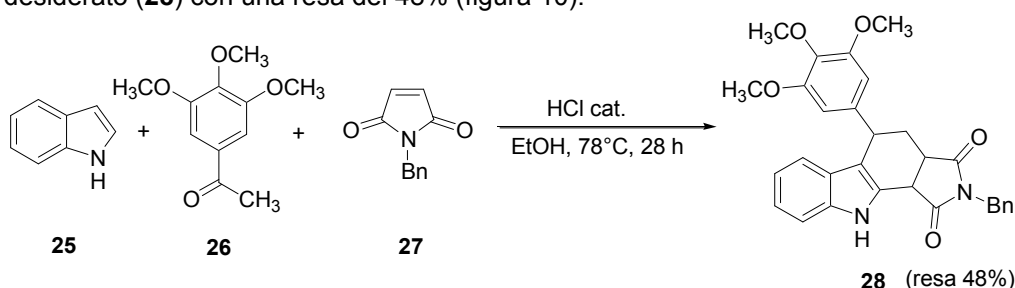


Figura 10 – Sintesi del tetraidrocarbazolo.

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi degli spettri di massa ed NMR (^1H e ^{13}C).

Lo spettro di massa, ottenuto per elettrospray (ESI+) presenta due picchi a m/z 519 e 535, corrispondenti, rispettivamente, agli addotti $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$, con $M=496$. Questo valore corrisponde a quello calcolato a partire dalla formula bruta $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$.

Lo spettro ^1H NMR del tetraidrocarbazolo, registrato in acetone- d_6 , presenta un segnale scambiabile con D_2O a 10,35 ppm, corrispondente all'NH dell'indolo (figura 11). Ad eccezione del benzile e dei due protoni del benzile, sono osservati cinque segnali nel *range* compreso tra 2,0 e 4,5 ppm. I quattro multipletti a 2,12 ppm, 2,47 ppm, 3,54 ppm e 4,26 ppm corrispondono, rispettivamente, ai protoni H_4 , $\text{H}_{4'}$, H_{3a} e H_5 . Il doppietto caratteristico del protone H_{10b} , con una costante di accoppiamento $J_{10b-3a}=7,5$ Hz, si trova a 4,41 ppm.

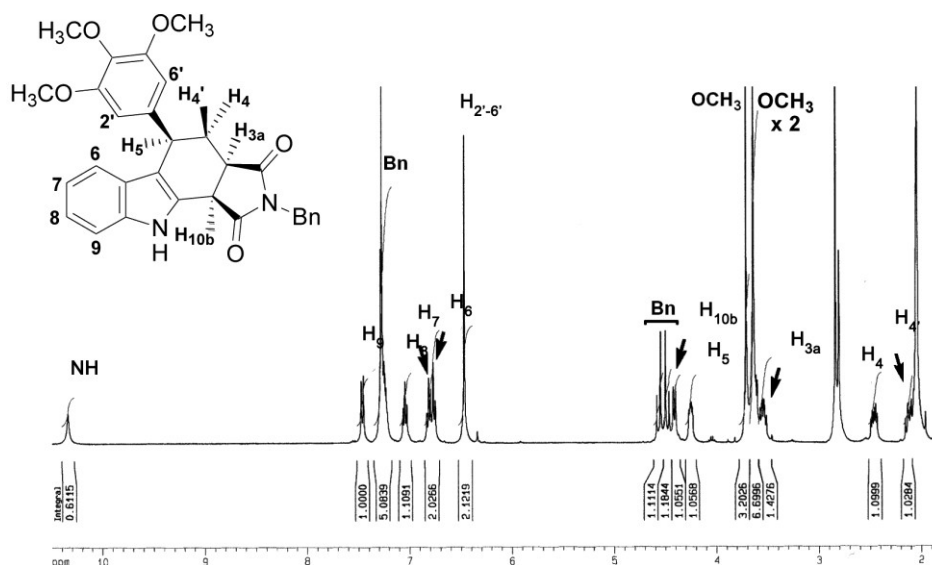


Figura 11 – Spettro ¹H NMR del tetraidrocarbazolo **28** (acetone-*d*₆).

La zona aromatica dello spettro comprende un singoletto a 6,47 ppm, corrispondente ai due protoni H_{2-6'} dell'anello 3',4',5'-trimetossifenile, ed i segnali corrispondenti ai cinque atomi di H del benzile ed ai quattro protoni aromatici del nucleo indolico.

La caratterizzazione esatta della conformazione della molecola è stata confermata da analisi 2D NMR (COSY45, HSQC ed HMBC).

4.4.3 Ossidazione del tetraidrocarbazolo a carbazolo

Il tetraidrocarbazolo è stato successivamente ossidato per ottenere il corrispondente carbazolo (figura 12).

In un primo esperimento la reazione è stata condotta utilizzando acetonitrile quale solvente. Ad una soluzione del tetraidrocarbazolo **28** in C₂H₃N è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (3 equivalenti).

La soluzione è posta a riflusso ad 81 °C per circa 1 ora. Il prodotto ottenuto è purificato mediante colonna cromatografica, impiegando come miscela eluente una soluzione cicloesano/AcOEt 8:2. Il carbazolo desiderato è ottenuto con una resa del 27%.

Al fine di aumentare la resa di reazione, la stessa sintesi è stata condotta impiegando 1,4-diossano. In tale solvente il prodotto precipita, e può essere più facilmente recuperato, con rese maggiori.

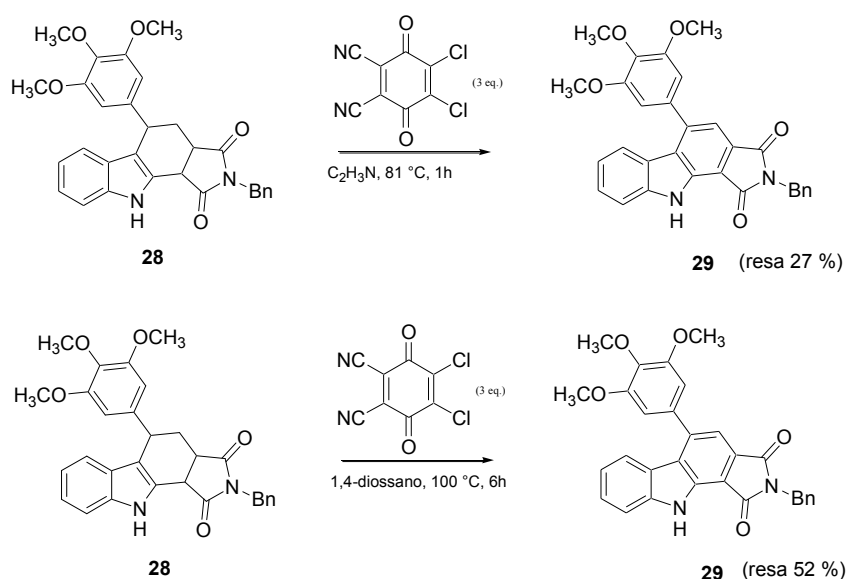


Figura 12 – Ossidazione del tetraidrocarbazolo **28**.

Ad una soluzione del composto **28** in 1,4-diossano è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (3 equivalenti). La soluzione è posta a riflusso a $100\text{ }^\circ\text{C}$ per circa 6 ore. Al termine della reazione, dopo filtrazione, il filtrato è lavato con CH_2Cl_2 ed il prodotto **29** è ottenuto come solido giallo mediante cristallizzazione da una soluzione CH_2Cl_2/n -esano 9:1, con una resa del 52%.

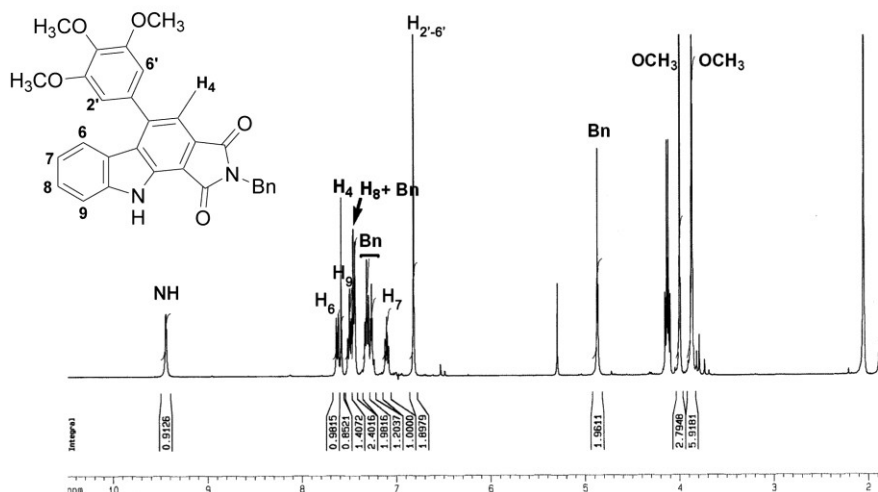


Figura 13 – Spettro ^1H NMR del carbazolo **29** ($CDCl_3$).

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi degli spettri di massa ed NMR; i segnali ^1H e ^{13}C sono stati confermati mediante esperimenti 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC).

Lo spettro di massa ottenuto per *elettrospray* mostra due picchi rispettivamente a m/z 519, corrispondente all'addotto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, e 531, che corrisponde all'addotto $[\text{M}+\text{K}]^+$. Questi valori confermano la sintesi del carbazolo desiderato.

Per quanto concerne invece l'analisi NMR, lo spettro ^1H , registrato in cloroformio deuterato, mostra un segnale scambiabile con D_2O a 9,27 ppm, corrispondente all'NH dell'indolo (figura 13). Ad eccezione di questo segnale, di quelli relativi ai metossili e quello corrispondente ai due protoni del gruppo CH_2 del benzile, tutti gli altri segnali rilevati nello spettro corrispondono a protoni aromatici.

In particolare, il singoletto a 6,82 ppm corrisponde ai protoni $\text{H}_{2-6'}$ dell'anello 3'4',5'-trimetossifenile, mentre quello a 7,60 ppm è relativo al protone H_4 . I segnali rimanenti sono caratteristici dei cinque protoni dell'anello benzilico e dei quattro protoni dell'anello aromatico dell'indolo.

4.4.4 Apertura dell'anello della maleimide

Obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare analoghi « aperti » delle molecole ottenute precedentemente, in modo da ridurre l'ingombro sterico a livello dell'anello benzenico che le caratterizzava. A tal fine, lo *step* successivo del lavoro di sintesi ha riguardato l'apertura dell'anello della maleimide.

Ad una soluzione del carbazolo **29** in 1,4-diossano è aggiunto LiOH in H_2O (5 equivalenti) e tetraidrofurano (figura 14). In esperimenti diversi è stata impiegata una quantità minore di LiOH (n.1 equivalenti), ma è stato osservato che la reazione non procede in modo ottimale. La soluzione è portata a riflusso per circa 6 ore. Il pH è portato al valore di 5 con aggiunta di HCl 1N. Si ottengono tre prodotti: un'anidride maleica (**30**) e due isomeri strutturali (**31a** e **31b**). I prodotti sono purificati tramite colonna cromatografica (fase mobile: AcOEt/cicloesano 8:2, 1% di acido acetico).

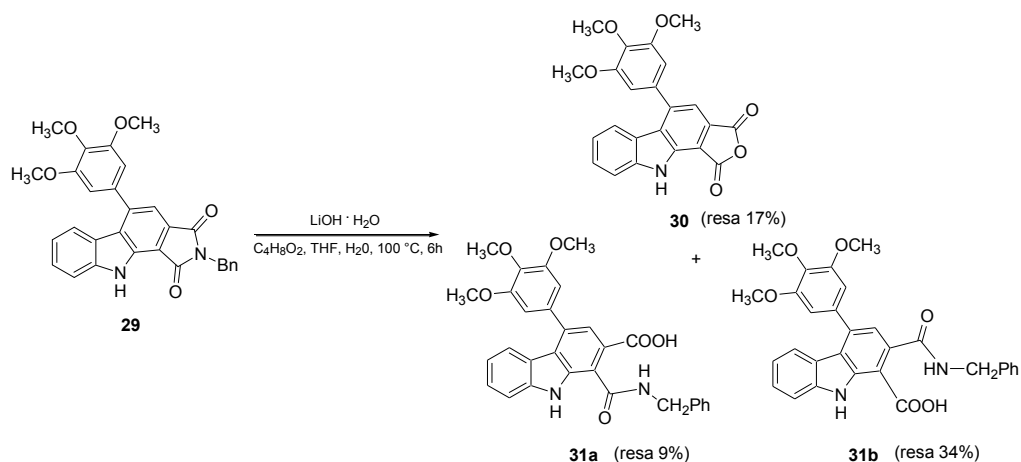


Figura 14 – Apertura dell'anello della maleimide.

I composti sono stati identificati mediante analisi dei loro spettri di massa ed NMR (^1H e ^{13}C), e la caratterizzazione dei due isomeri è stata confermata da analisi 2D NMR (HSQC ed HMBC).

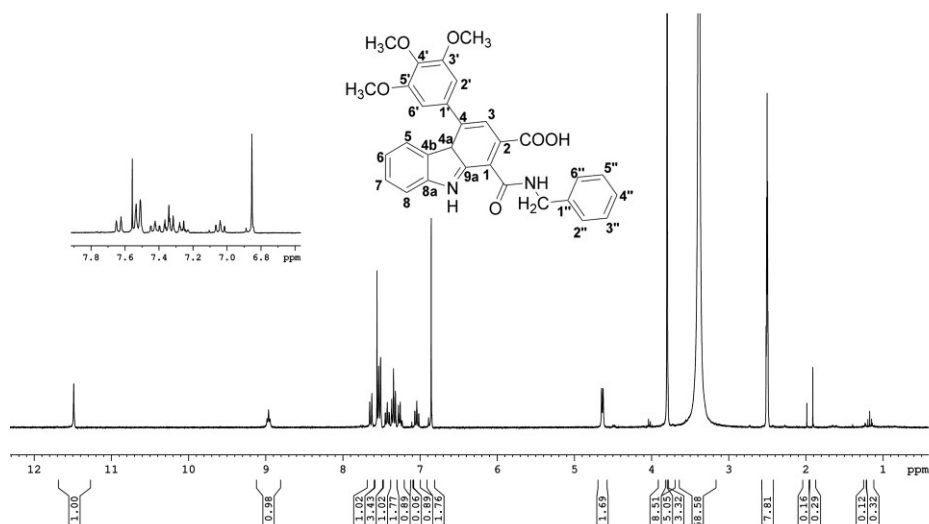


Figura 15 – Spettro ^1H NMR dell'isomero **31a** ($\text{DMSO}-d_6$).

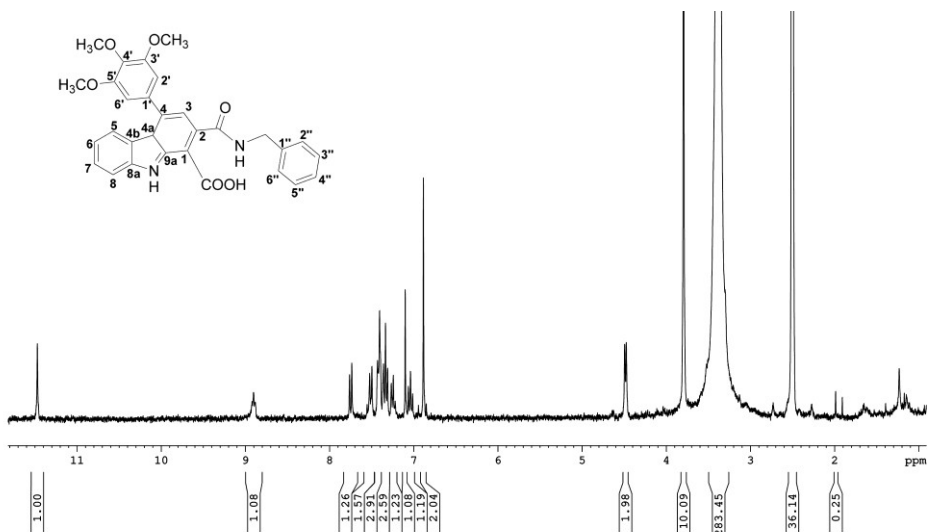


Figura 16 – Spettro ^1H NMR dell'isomero **31b** ($\text{DMSO}-d_6$).

In particolar modo, per quanto concerne la caratterizzazione dei due isomeri strutturali, è stata osservata per l'isomero **31b**, ottenuto in maggiore quantità, una correlazione caratteristica tra il protone H_3 ed il carbonile a 169,55 ppm, ed è stato

osservato inoltre che il doppietto del CH₂ a 4,5 ppm correla con lo stesso protone (figura 17).

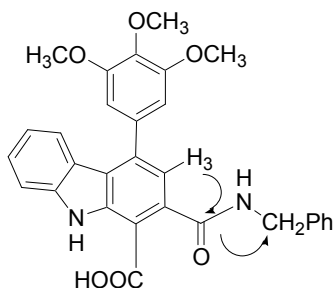


Figura 17 – Correlazioni HMBC osservate per l'isomero **31b**.

La resa della reazione è stata analizzata anche direttamente tramite analisi NMR. Questo ha consentito di concludere che l'anidride è un artefatto formatosi a contatto con la silice, e che i prodotti della reazione sono i due isomeri, con rese del 27% e del 73%.

E' stato inoltre osservato che il prodotto minoritario (isomero **31a**) tende ad isomerizzare nell'isomero principale (**31b**). E' stato osservato, infatti, che dopo sei settimane dalla purificazione, il 62% del prodotto purificato si era trasformato nel prodotto **31b** e che nel tubo NMR era presente solo il 38% dell'isomero **31a**. Dopo alcune settimane è stata raggiunta una condizione di equilibrio (tabella 1).

La prima ipotesi per spiegare questo fenomeno è che si potrebbe trattare di un problema di ingombro sterico, e che la trasformazione sia legata ad un meccanismo intramolecolare, più precisamente una reazione di *trans*-amidificazione.

Tabella 1 – Isomerizzazione della molecola a (tubo NMR, DMSO-d₆).

N. settimane	Resa isomero 31a	Resa isomero 31b
Dopo purificazione	100%	-
3 settimane	49%	51%
4 settimane	43%	57%
5 settimane	40%	60%
6 settimane	38%	62%
8 settimane	38%	62%

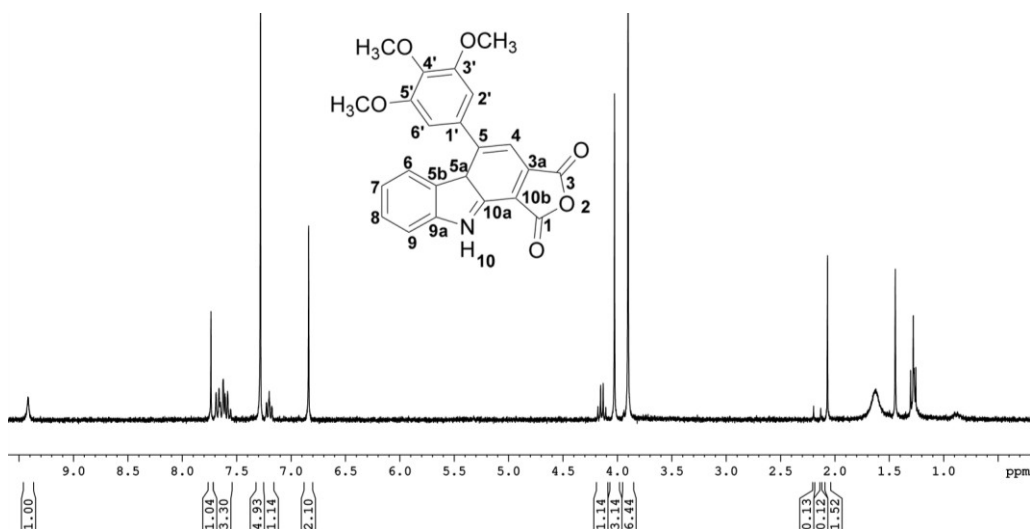


Figura 18 – Spettro ^1H NMR dell'anidride maleica **30** (CDCl_3).

4.4.5 Sintesi dell'anidride maleica: seconda strategia di sintesi

Per la sintesi dell'anidride maleica **30** è stata anche utilizzata una seconda strategia di sintesi.

Ad una soluzione dei due isomeri **31a** e **31b** in 1,4-diossano sono aggiunti montmorillonite (McCabe *et al.*, 1985) e 0,1 equivalenti di acido metansolfonico ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$). La soluzione è posta a refluxo a $100\text{ }^\circ\text{C}$ per 4 giorni. Il prodotto è purificato per filtrazione, ed il filtrato è lavato con CH_2Cl_2 e poi estratto con HCl 1N (figura 19).

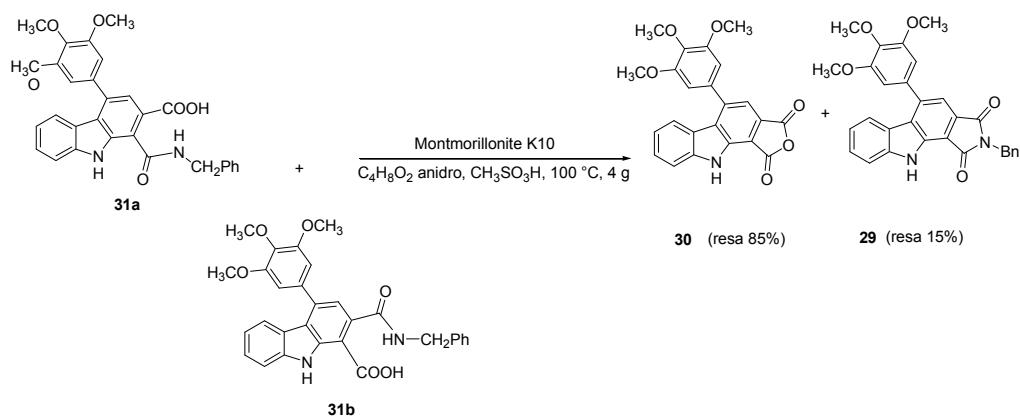


Figura 19 – Sintesi dell'anidride maleica: seconda strategia di sintesi.

La reazione si è mostrata quantitativa su TLC, che ha evidenziato la presenza di un solo prodotto. La miscela di reazione è stata successivamente analizzata per RMN, senza purificazione, ed è stata evidenziata, in realtà, la presenza di due prodotti. Il prodotto principale è l'anidride maleica, con un rendimento dell'85%, ma è presente anche il 15% del carbazolo di partenza. La purificazione dalla maleimide risulta particolarmente difficoltosa.

La stessa reazione è stata realizzata a partire dai due isomeri dopo trasformazione di entrambi nell'acido dicarbossilico corrispondente, al fine di evitare la ciclizzazione.

4.4.6 Sintesi dell'acido o-dicarbossilico

Per la sintesi dell'acido dicarbossilico, ad una soluzione dei due isomeri in acetonitrile/H₂O 9:1 sono aggiunti 7 equivalenti di acido cloridrico 1N. La soluzione è portata alla temperatura di 81 °C per 8 ore. Il prodotto è purificato mediante l'impiego della resina a scambio ionico DOWEX 50WX8-100. La reazione permette di ottenere l'acido o-dicarbossilico con una resa del 94% (figura 20).

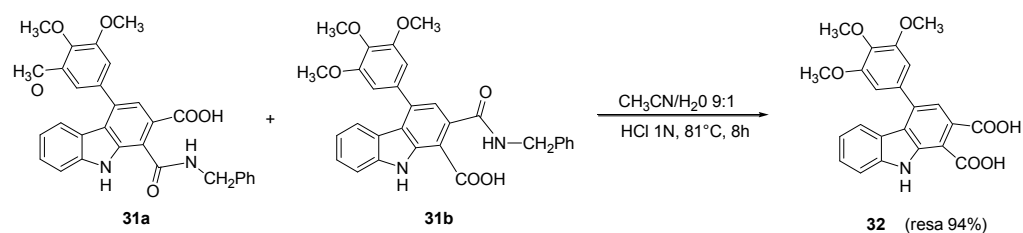


Figura 20 – Sintesi dell'acido o-dicarbossilico.

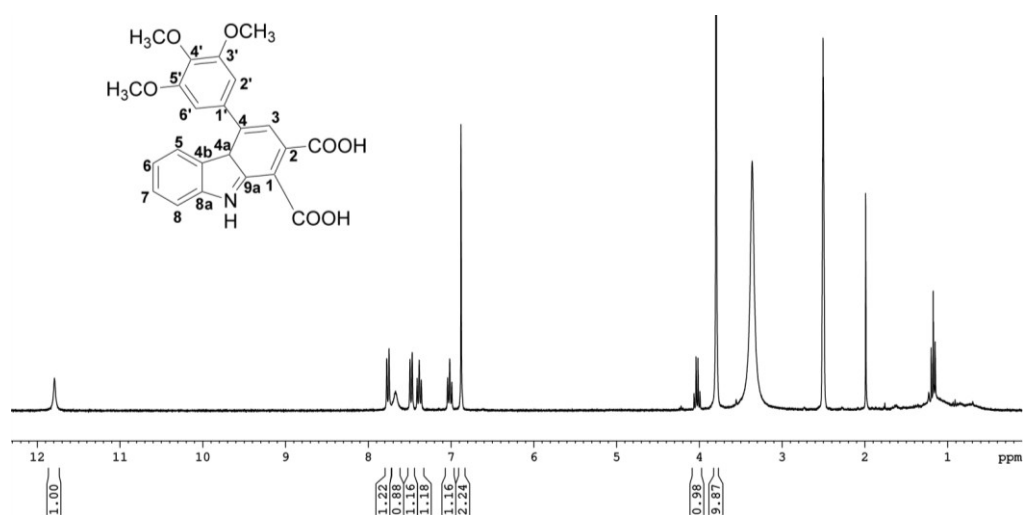


Figura 21 – Spettro ¹H NMR dell'acido o-dicarbossilico 32 (DMSO-*d*₆).

4.4.7 Sintesi dell'anidride maleica a partire dall'acido o-dicarbossilico

A partire dall'acido o-dicarbossilico **32** è stata dunque sintetizzata l'anidride maleica **30** (figura 22). Le condizioni della reazione sono quelle descritte nel paragrafo 4.4.5, e la durata della reazione è di 22 ore. L'anidride è ottenuta con una reazione quantitativa.

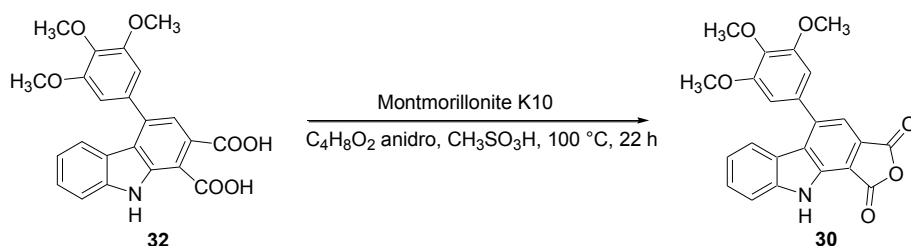


Figura 22 – Sintesi dell'anidride maleica a partire dall'acido o-dicarbossilico.

4.4.8 Reazioni di decarbossilazione

Ulteriore obiettivo perseguito è stata la sintesi di prodotti decarbossilati. La reazione è stata realizzata sia a partire dall'insieme dei due isomeri **31a** e **31b**, sia a partire dall'acido o-dicarbossilico **32**. Le molecole sono poste sotto agitazione in presenza di rame (5 equivalenti) e chinolina (30 eq.) per 2 ore, alla temperatura di 180 °C (Gaukroger *et al.*, 2001).

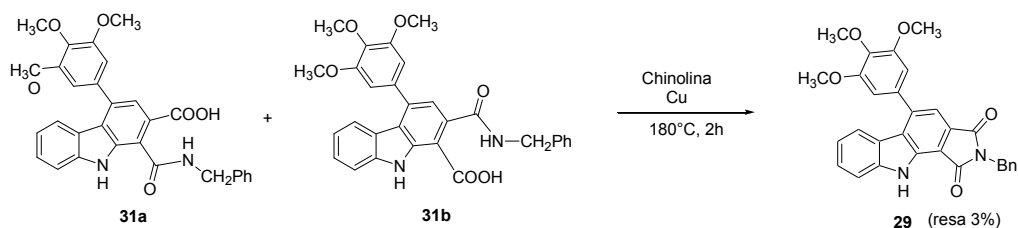


Figura 23 – Reazione di decarbossilazione (I).

Il rame è rimosso mediante celite ed il filtrato è lavato con HCl 1N. I prodotti sono purificati mediante colonna cromatografica (fase mobile: CH₂Cl₂/ acetone 98:2). Nella reazione condotta a partire dai due isomeri strutturali il prodotto osservato è il prodotto di partenza della procedura di sintesi, il carbazolo **29**, con una resa del 3% (figura 23).

La reazione è stata realizzata anche a partire dall'acido dicarbossilico **32**, ma anche in questo caso è stata osservata degradazione, e non è stato possibile identificare alcun prodotto.

La decarbossilazione è stata infine realizzata utilizzando una differente procedura utilizzando come prodotto di partenza l'acido dicarbossilico **32** (figura 24).

All'acido dicarbossilico sono aggiunti CuO_2 e fenantrolina in una soluzione di N-metilpirrolidina e chinolina (Goossen *et al.*, 2007). La soluzione è posta sotto agitazione alla temperatura di 170 °C, per circa 6 ore. Il prodotto della reazione è diluito con AcOEt, lavato con HCl 1N e purificato mediante cromatografia su colonna (miscela eluente: cicloesano/AcOEt 8:2).

Questa reazione consente di ottenere il prodotto desiderato, non facilmente purificabile mediante cromatografia, con una resa dell'8%.

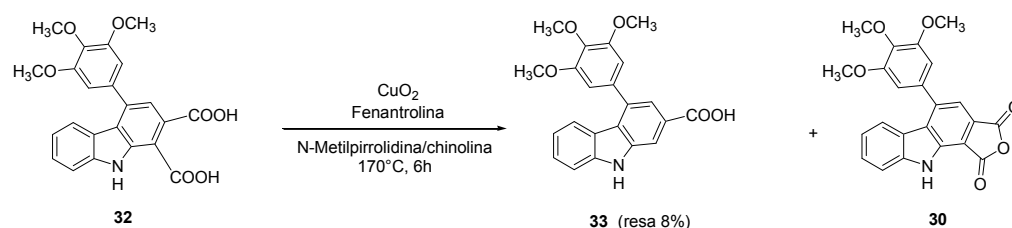


Figura 24 – Reazione di decarbossilazione (II).

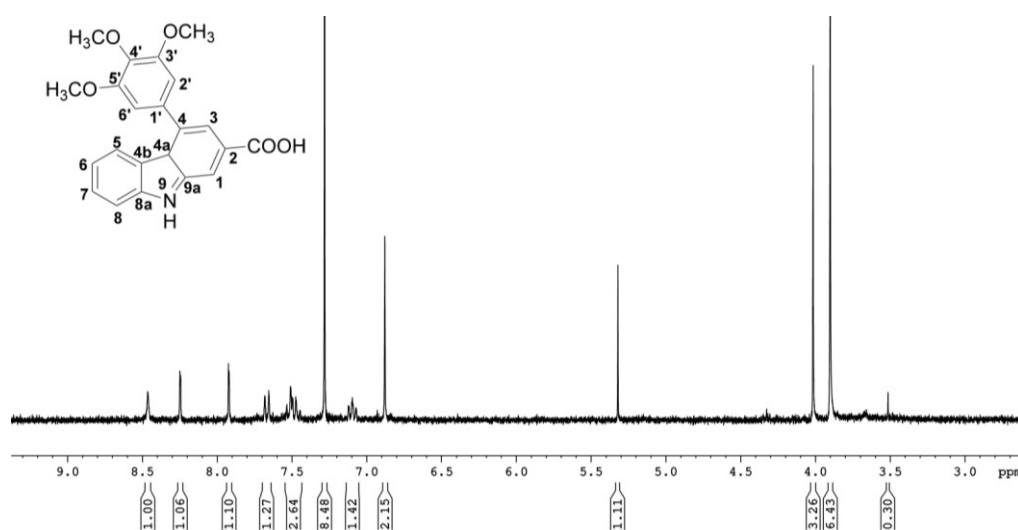


Figura 25 – Spettro ^1H NMR del prodotto decarbossilato **33** (CDCl_3).

La stessa reazione è stata effettuata a partire dai due isomeri monocarbossilici, ottenendo un nuovo prodotto ammidico (**34**), con una resa del 5% (figura 26).

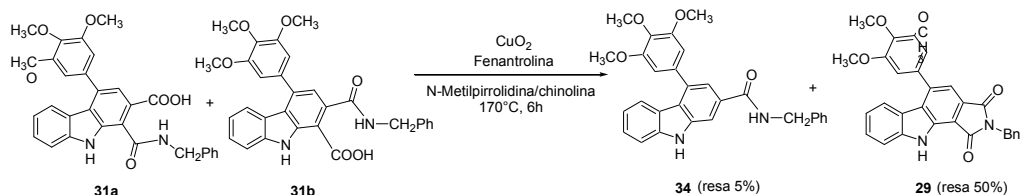


Figura 26 – Reazione di decarbossilazione (III).

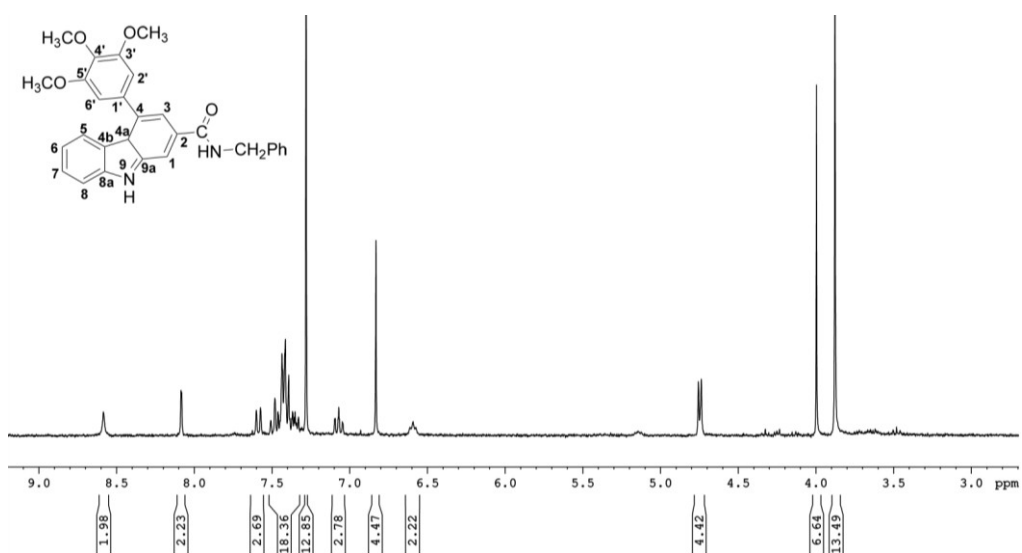


Figura 27 – Spettro ^1H NMR del prodotto decarbossilato 34 (CDCl_3).

4.5 Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti a partire dal 6-metossindolo: serie $\text{R}=\text{OCH}_3$

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, descritta nei paragrafi precedenti, che è stata concepita come modello sperimentale.

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 successivamente realizzata a partire dal 6-metossindolo, al fine di ottenere, sulla base delle relazioni struttura-

attività note, molecole dotate di attività biologica superiore a quella mostrata dalle molecole della prima serie non sostituite.

4.5.1 Sintesi del metossitetraidrocarbazolo

Per la realizzazione delle nuove molecole è utilizzato lo stesso percorso di sintesi messo a punto per la serie precedente, con le opportune modifiche. La reazione *one pot* a tre componenti descritta da Noland e collaboratori è utilizzata per la sintesi del composto 8-metossitetraidrocarbazolo **36**, ottenuto con una resa del 30% (figura 28).

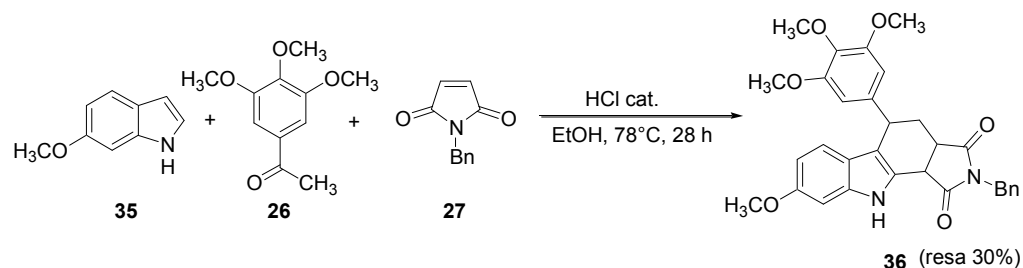


Figura 28 – Sintesi del metossitetraidrocarbazolo **36**.

Il rendimento della reazione si è dimostrato inferiore rispetto a quello riscontrato per la sintesi del tetraidrocarbazolo non sostituito (resa del 34%).

Al fine di migliorare la resa di reazione, la sintesi è stata realizzata anche mediante impiego di microonde, utilizzando una temperatura di 110 °C per 3 ore e, in un altro esperimento, una durata maggiore (5 ore), ma in entrambi i casi non è stato osservato un aumento della resa della reazione.

4.5.2 Ossidazione del metossitetraidrocarbazolo

Il tetraidrocarbazolo **36** è successivamente ossidato mediante l'impiego di DDQ al fine di ottenere il carbazolo corrispondente (figura 29).

Rispetto alla serie precedente, le molecole realizzate a partire dal 6-metossindolo presentano maggiori difficoltà in fase di purificazione. Il prodotto ottenuto è purificato mediante colonna cromatografica (fase eluente impiegata: CH₂Cl₂/Acetone 99:1), con una resa dell' 83%.

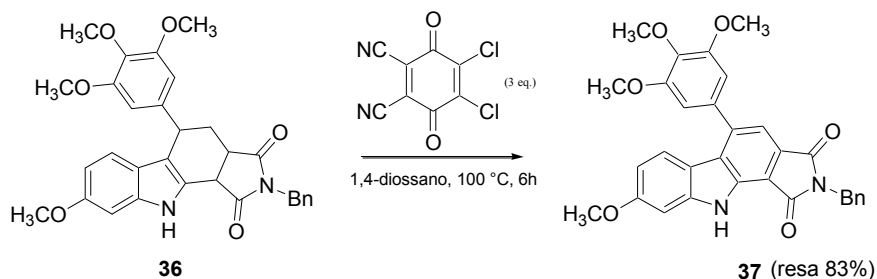


Figura 29 – Sintesi del metossicarbazolo.

4.5.3 Apertura dell'anello della maleimide (serie R=OCH₃)

Successivamente, come per la serie precedente, anche per questi nuovi analoghi è realizzata l'apertura dell'anello della maleimide, che consente di ottenere l'anidride maleica sostituita in posizione 8 (**38**) con una resa del 12%, ed inoltre due isomeri, con rese del 40% (isomero **39a**) e 32% (figura 30).

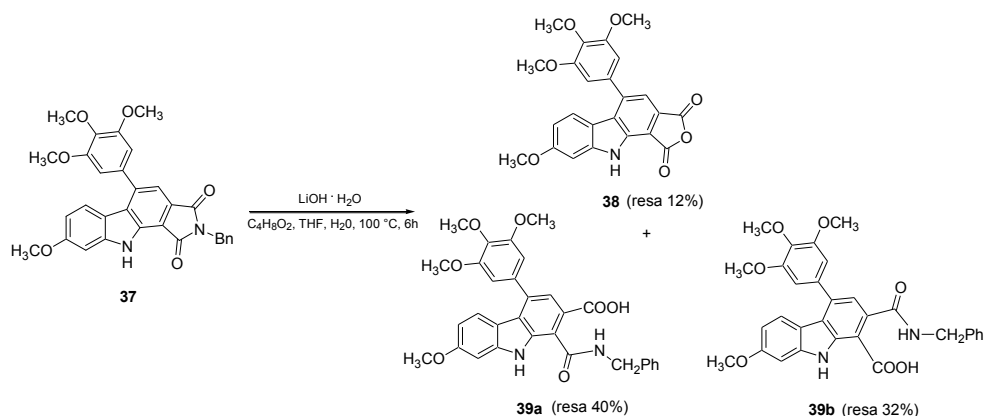


Figura 30 – Apertura dell'anello della maleimide.

Mentre nella serie R=H il prodotto principale della reazione risultava essere l'isomero **31b**, che presenta il gruppo sostituente CONHCH₂Ph in posizione 2, nel caso degli analoghi sostituiti della serie R=OCH₃ si osserva il fenomeno contrario.

L'isomero strutturale più abbondante risulta essere, infatti, il derivato **39a**, sostituito in posizione 1. La purificazione dell'isomero minoritario è particolarmente difficoltosa.

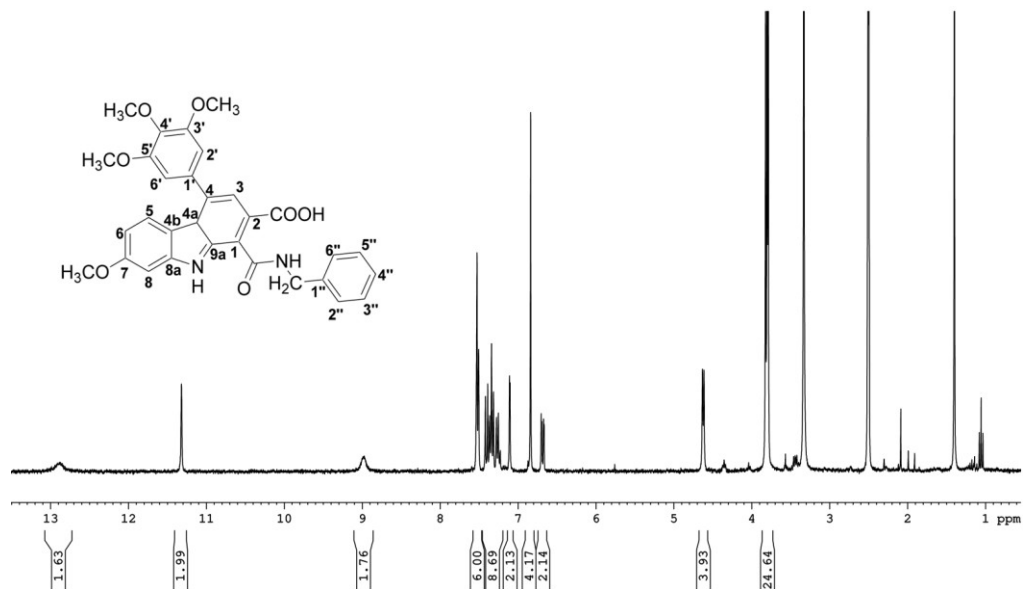


Figura 31 – Spettro ¹H NMR dell'isomero 39a (DMSO-d₆).

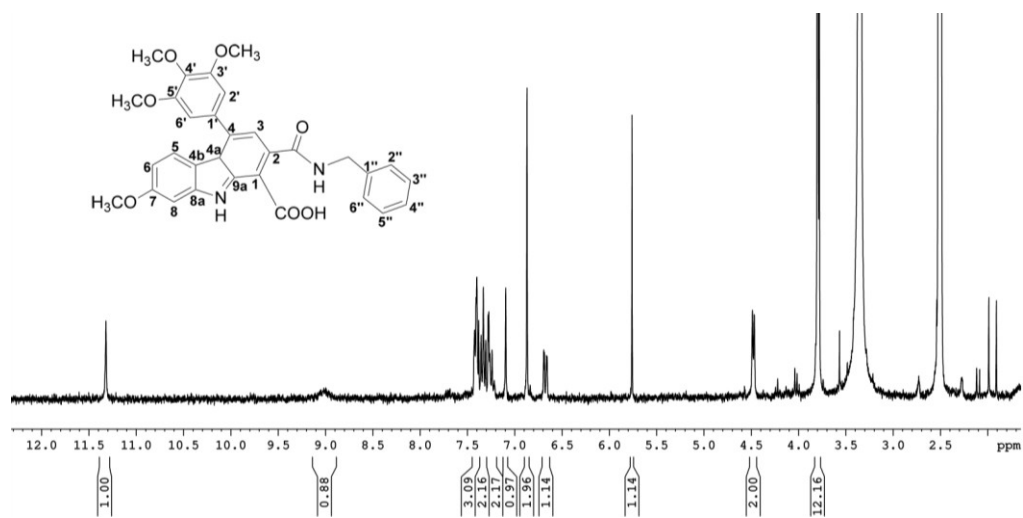


Figura 32 – Spettro ¹H NMR dell'isomero 39b (DMSO-d₆).

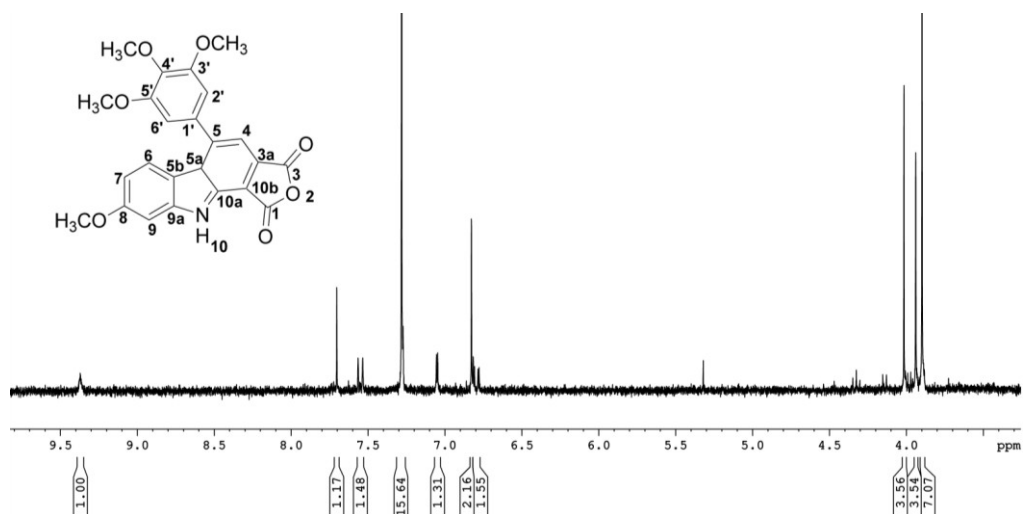


Figura 33 – Spettro ^1H NMR dell'anidride maleica sostituita **38** (CDCl_3).

4.5.4 Sintesi dell'acido *o*-dicarbossilico e dell'anidride maleica sostituiti (serie $R=\text{OCH}_3$)

Così come per la serie precedente si è provveduto alla sintesi dell'acido dicarbossilico corrispondente e, successivamente, alla sintesi dell'anidride maleica.

Per la sintesi dell'acido dicarbossilico, ad una soluzione dei due isomeri **39a** e **39b** in acetonitrile/ H_2O 9:1 sono aggiunti 7 equivalenti di acido cloridrico 1N. La soluzione è portata a 81°C per 6 ore (figura 34). Il prodotto è purificato mediante l'impiego della resina a scambio ionico DOWEX 50WX8-100. La reazione permette di ottenere l'acido *o*-dicarbossilico **40** con una resa del 69% (inferiore a quella ottenuta per l'analogo corrispondente della serie $R=\text{H}$, 94%).

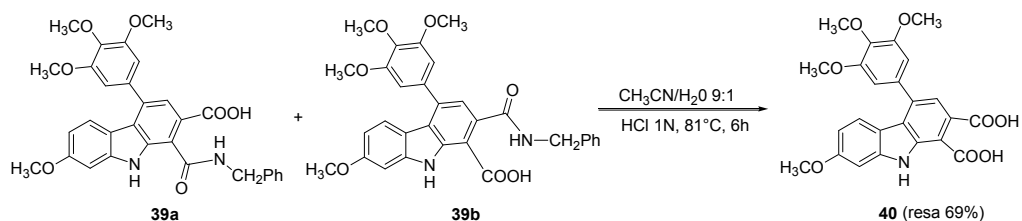


Figura 34 – Sintesi dell'acido *o*-dicarbossilico sostituito in posizione 7.

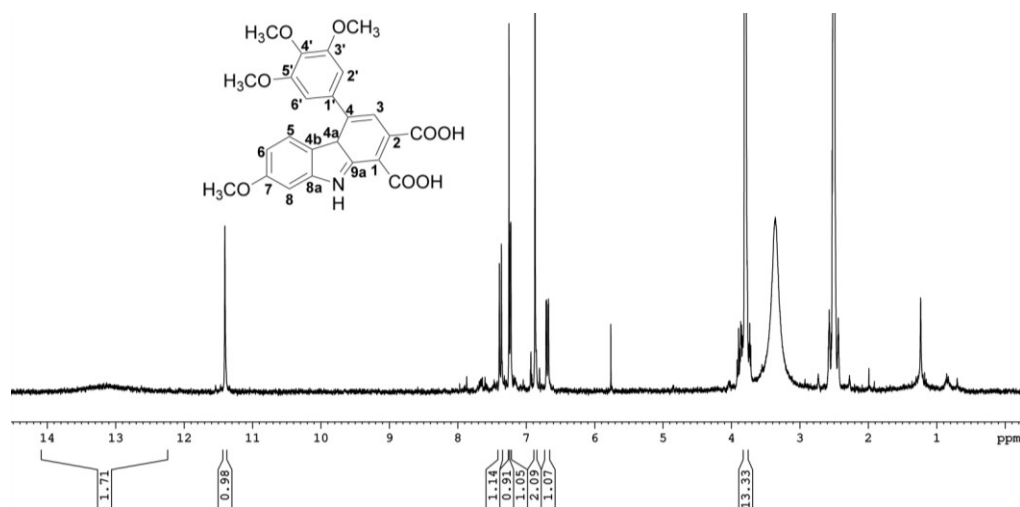


Figura 35 – Spettro ^1H NMR dell'acido *o*-dicarbossilico sostituito **40** ($\text{DMSO-}d_6$).

A partire dall'acido *o*-carbossilico ottenuto è stata dunque sintetizzata l'anidride maleica (figura 36). Ad una soluzione dell'acido dicarbossilico **40** in 1,4-diossano anidro è aggiunta montmorillonite. La soluzione è posta a riflusso a $100\text{ }^\circ\text{C}$ per 24 ore. Il prodotto è purificato per filtrazione, ed il filtrato è lavato con CH_2Cl_2 e poi estratto con HCl 1N. L'anidride è ottenuta con una reazione quantitativa.

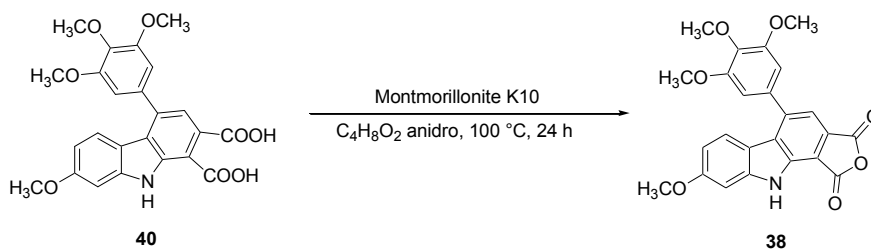


Figura 36 – Sintesi dell'anidride maleica sostituita a partire dall'acido *o*-dicarbossilico **40**.

4.5.5 Sintesi del metossitetraidrocarbazolo debenzilato sull'anello della maleimide: strategia di sintesi

Allo scopo di ottenere il 6-metossicarbazolo non benzilato sull'anello della maleimide sono state ipotizzate diverse strategie di sintesi. Una delle nostre prime ipotesi è stata quella di debenzilare il 6-metossicarbazolo **37** in modo da ottenere l'analogo privo del benzile sull'anello della maleimide. Un'attenta analisi della

letteratura non ha consentito, tuttavia, di identificare delle strategie di sintesi adeguate. Abbiamo pertanto tentato la sintesi *ex novo* del prodotto desiderato.

È stata applicata la metodica generale descritta precedentemente per la realizzazione dei tetraidrocarbazoli, impiegando la maleimide in sostituzione della *N*-benzilmaleimide.

Per la realizzazione del derivato è stata impiegata una reazione *one pot* e tre componenti, utilizzando una soluzione di 6-metossiindolo, maleimide e 3,4,5-trimetossiacetofenone in EtOH assoluto in presenza di quantità catalitiche di HCl (figura 37). La sintesi è stata realizzata mediante impiego di microonde, utilizzando una temperatura di 110 °C per 3 ore.

La miscela di reazione è stata purificata mediante colonna cromatografica, impiegando come miscela eluente una soluzione CH₂Cl₂/AcOEt 99:1, ma è stato osservato che la reazione non fornisce il prodotto desiderato.

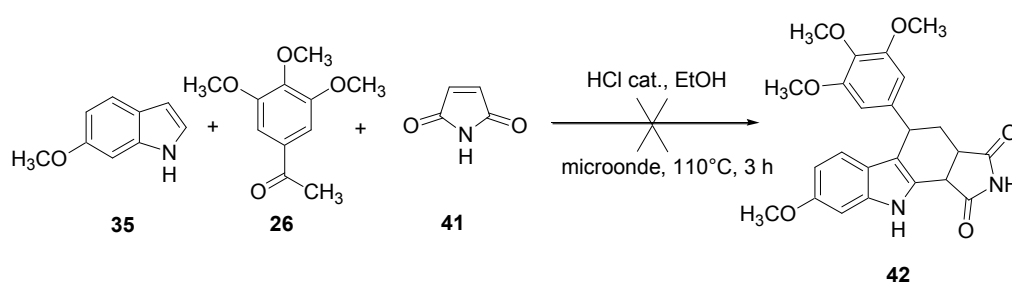


Figura 37– Schema di sintesi per la preparazione del metossitetraidrocarbazolo ottenuto a partire dalla maleimide semplice.

4.5.6 Sintesi della *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide: reazione di Mitsunobu.

Al fine di ottimizzare la strategia di sintesi, l'attività di ricerca è stata dedicata alla sintesi della *p*-metossibenzilmaleimide **46**, al fine di impiegare questa molecola nella reazione *one pot* descritta da Noland e collaboratori per la sintesi del tetraidrocarbazolo **47** e per ottenere, tramite ossidazione, il corrispondente carbazolo **48**. Obiettivo del lavoro, in quest'ultima fase, è stato quello di verificare se una reazione di debenzilazione a partire da quest'ultimo composto potesse risultare più agevole, in modo da ottenere il carbazolo non sostituito sull'anello della maleimide.

Per la sintesi della *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide è stata impiegata la procedura descritta da Smaill e da Jia e collaboratori (Jia *et al.*, 1999; Smaill *et al.*, 2008). La sintesi è stata realizzata mediante una reazione di Mitsunobu (Mitsunobu *et al.*, 1967).

Come descritto da Mitsunobu nel 1967, la reazione di un acido carbossilico con la trifetilfosfina ed il dietil azodicarbossilato in presenza di un alcol determina la formazione dell'estere corrispondente dell'acido carbossilico, di trifetilfosfina ossido, e di dietil idrazinacarbossilato.

Questa reazione costituisce un metodo pratico ed ampiamente utilizzato per l'accoppiamento di un alcol con un acido/pronucleofilo impiegando un azo-reattivo

ossidante, molto spesso il dietil-azodicarbossilato (DEAD, *diethyl azodicarboxylate*), ed un agente riducente fosfinico, solitamente la trifenilfosfina (TPP, *triphenylphosphine*).

Possono essere utilizzati come pronucleofili acidi carbossilici, fenoli, dioli, oppure immidi (figura 38).

La reazione di Mitsunobu può essere applicata, pertanto, alla sintesi di esteri, esteri arilici, esteri ciclici, legami carbonio-carbonio e legami carbonio-azoto, e vari altri tipi di composti. Accanto ai prodotti desiderati, la reazione fornisce sottoprodotti quali il dietil idrazinadicarbossilato (DEAD-H₂, *diethyl hydrazinedicarboxylate*) ottenuto dal DEAD, e un ossido fosfinico come la trifenilfosfina ossido (TPPO, *triphenylphosphine oxide*) a partire dalla TPP (But *et al.*, 2007).

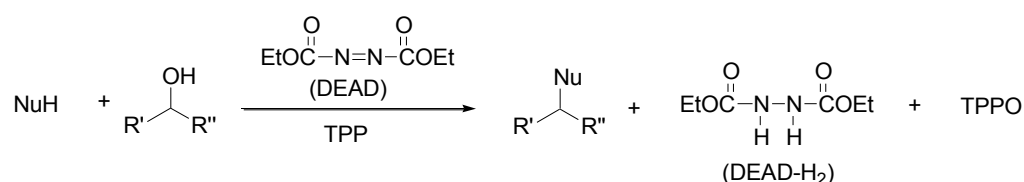


Figura 38 – Reazione di Mitsunobu: schema di sintesi (But *et al.*, 2007).

Per la sintesi della *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide sono stati impiegati trifenilfosfina, maleimide a tetraidrofurano (THF) anidri.

Ad una soluzione di trifenilfosfina e maleimide in THF è aggiunto alcol 4-metossibenzile (alcol anisico) sotto agitazione e, successivamente, è aggiunto goccia a goccia diidropropil azodicarbossilato (DIAD, *diisopropyl azodicarboxylate*).

La sintesi è condotta a temperatura ambiente, e la durata della reazione è di 19 ore (figura 39).

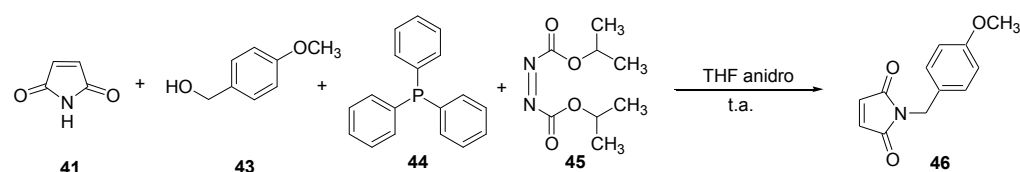


Figura 39 – Sintesi della *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide.

La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica, impiegando come miscela eluente una soluzione cicloesano/AcOEt 99:1. Il prodotto desiderato, la *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide **46** (Martinez *et al.*, 2005; Shults *et al.*, 2005) è ottenuto con una resa del 44%.

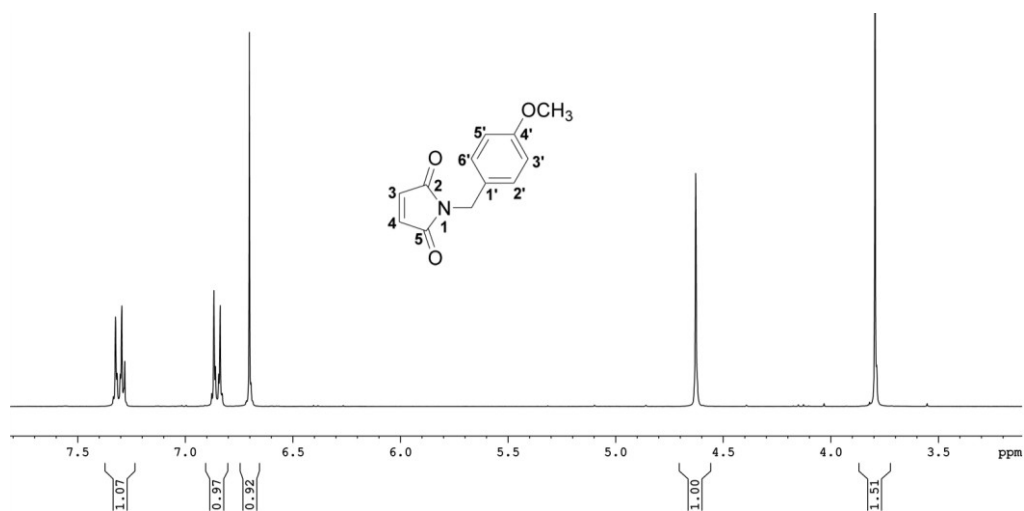


Figura 40 – Spettro ^1H NMR della *N*-(*p*-metossibenil)maleimide (CDCl_3).

4.5.7 Sintesi di un nuovo tetraidrocarbazolo a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide.

La metodica descritta da Noland e collaboratori precedentemente applicata alla sintesi degli analoghi descritti è stata impiegata per la realizzazione di un nuovo tetraidrocarbazolo.

In una reazione *one pot* e tre componenti, una soluzione di 6-metossindolo, 3,4,5-trimetossiacetofenone e *N*-(*p*-metossibenil)maleimide in EtOH assoluto è posta a riflusso sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo circa 18 ore la reazione è terminata ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo. La reazione permette di ottenere il tetraidrocarbazolo desiderato (**47**) con una resa del 13% (figura 41).

La stessa sintesi è stata condotta anche mediante impiego di microonde, utilizzando una temperatura di 110°C per 5 ore, ma non è stato osservato un aumento del rendimento della reazione.

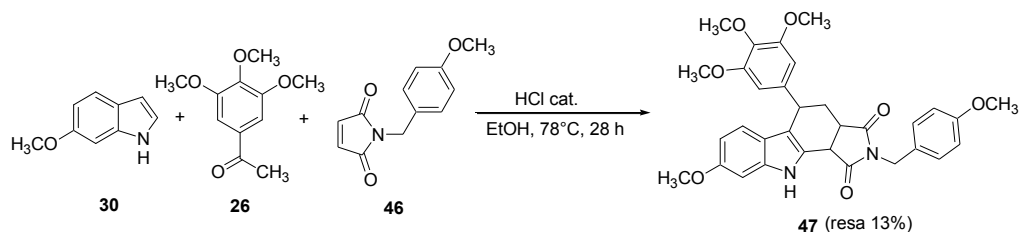


Figura 41 – Sintesi del metossitetraidrocarbazolo ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide.

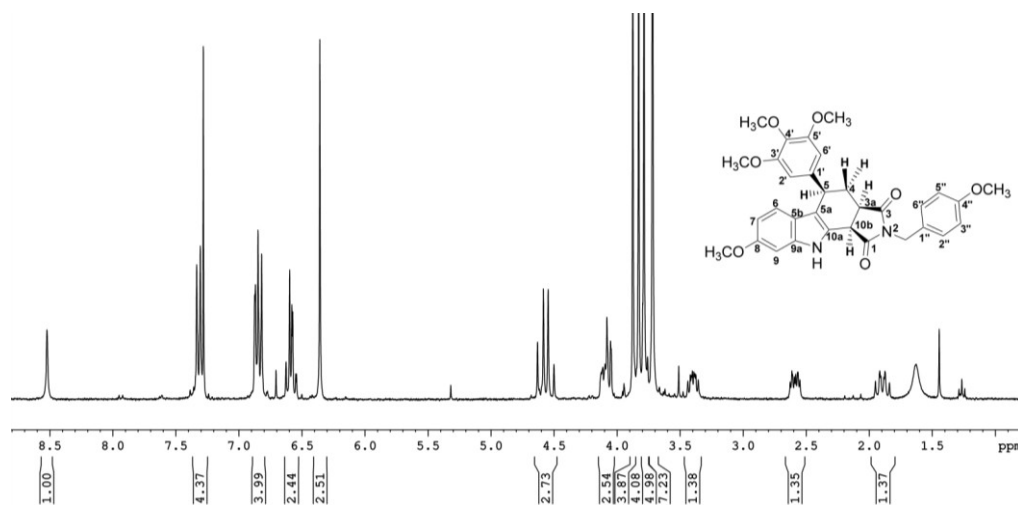


Figura 42 – Spettro ^1H NMR del tetraidrocarbazolo ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide (CDCl_3).

4.5.8 Ossidazione del tetraidrocarbazolo ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide.

Obiettivo del lavoro di sintesi è stato quello di ossidare il composto di partenza e, al contempo, riuscire a debenzilare l'anello della maleimide; pertanto in questa sintesi sono stati impiegati 3,3 equivalenti di DDQ, un quantitativo maggiore rispetto a quello impiegato nelle altre reazioni di ossidazione.

Ad una soluzione del tetraidrocarbazolo in 1,4-diossano è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (3,3 equivalenti). La soluzione è posta a riflusso a $100\text{ }^\circ\text{C}$ per circa 2 ore (figura 43). La miscela di reazione è purificata mediante cromatografia su colonna impiegando come fase eluente una miscela cicloesano/ AcOEt 7:3. Il prodotto della reazione è un nuovo carbazolo (**48**), (resa 88%), ma la reazione non consente la contemporanea debenzilazione dell'anello della maleimide.

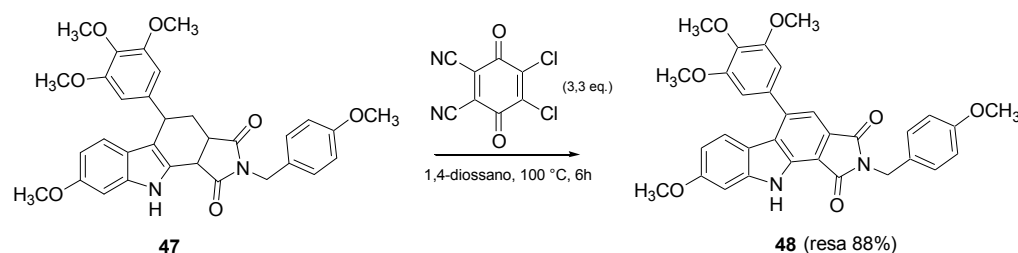


Figura 43 – Reazione di ossidazione del tetraidrocarbazolo ottenuto a partire da dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide: sintesi di un nuovo carbazolo.

Al fine di poter ottenere un prodotto debenzilato, la stessa sintesi è stata condotta nelle medesime condizioni, ma aumentando il tempo di reazione (48 ore). Anche in questo caso, la procedura non ha determinato alcuna debenzilazione.

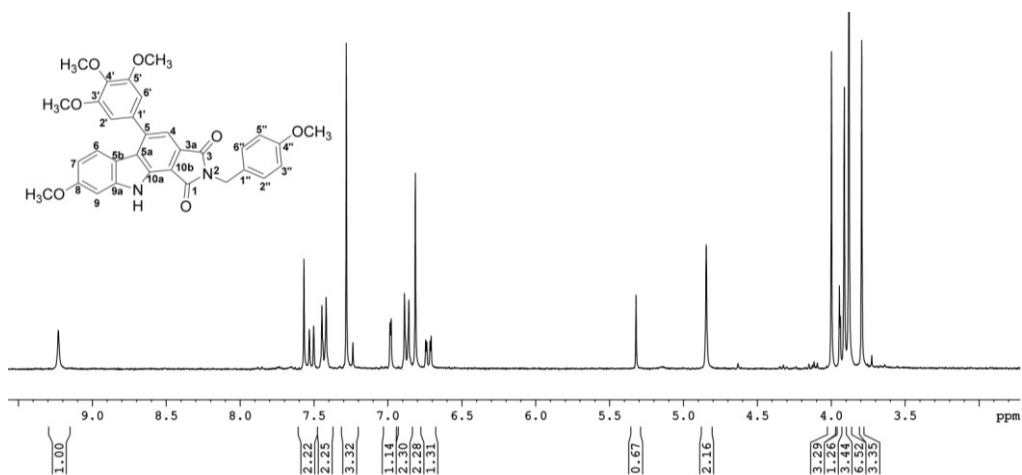


Figura 44 – Spettro ^1H NMR del carbazolo ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide (CDCl_3).

4.5.9 Tentativi di debenzilazione del carbazolo ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide.

Per poter ottenere il prodotto debenzilato è stata infine applicata una procedura descritta da Watson e collaboratori (Watson *et al.*, 2001).

Ad una soluzione del nuovo carbazolo **48** in anisolo (metossibenzene), è aggiunto goccia a goccia acido trifluoroacetico (TFA, *trifluoroacetic acid*) sotto argon ed a temperatura ambiente (figura 45). Successivamente la miscela di reazione è portata a 60°C per 24 ore.

Questa procedura, tuttavia, non consente di ottenere il carbazolo desiderato. Il prodotto della reazione risulta essere, infatti, il composto di partenza.

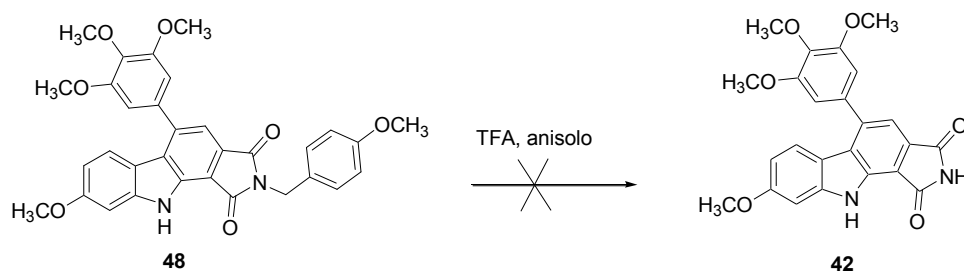


Figura 45 – Tentativo di debenzilazione del carbazolo ottenuto a partire da dalla *N*-(*p*-metossibenil)maleimide.

4.6 Idrazinolisi del metossicarbazolo

Al fine di ottenere degli analoghi diversamente sostituiti, è stata tentata la sintesi della ftalidrazide del 6-metossicarbazolo **37**. Per la sintesi è stata impiegata la procedura descritta da Curley e collaboratori (Curley *et al.*, 2003).

Ad una soluzione del 6-metossicarbazolo in 1,4-diossano è aggiunta idrazina idrata (2 equivalenti). La soluzione è portata a riflusso per 6 ore (figura 46).

Il prodotto della reazione, caratterizzato mediante analisi NMR, risulta essere, tuttavia, la molecola di partenza. Non è stato riscontrato alcun nuovo prodotto.

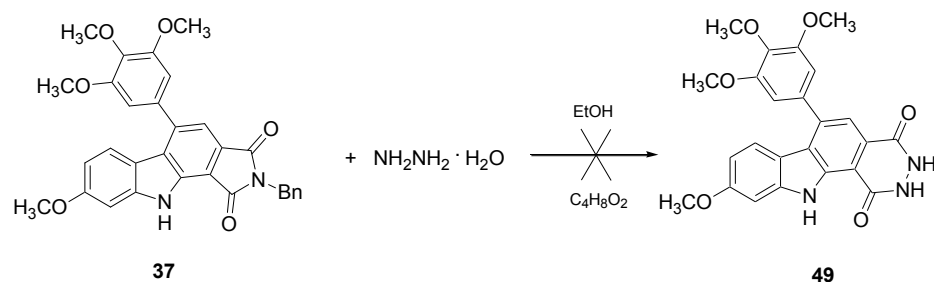


Figura 46 – Schema di sintesi per la preparazione del derivato ftalidrazide.

4.7 Sintesi condotte a partire dal 1-(fenilsulfonyl)indolo

Negli esperimenti seguenti, si è tentato di applicare la procedura impiegata per la sintesi dei vari tetraidrocarbazoli ottenuti anche alla sintesi di nuovi analoghi realizzati a partire dal 1-(fenilsulfonyl)indolo.

In un primo esperimento, in una reazione *one pot* e tre componenti, una soluzione di 1-(fenilsulfonyl)indolo, 3,4,5-trimetossiacetofenone e DIAD in EtOH assoluto è stata posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon (figura 47). La miscela è stata lasciata a riflusso per più giorni (72 ore), ma la reazione non ha fornito alcun prodotto.

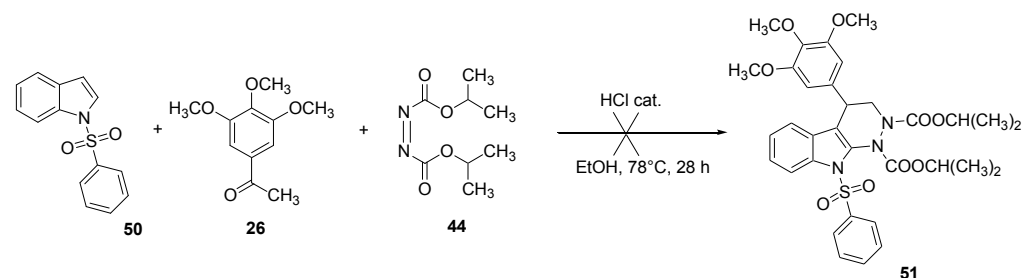


Figura 47 – Sintesi effettuata mediante l'impiego di 1-(fenilsulfonyl)indolo e DIAD.

In esperimenti successivi la stessa reazione è stata testata impiegando anidride maleica anziché DIAD (figura 48). La sintesi è stata condotta nelle medesime condizioni di reazione, ma anche in questo caso la reazione non ha fornito alcun prodotto.

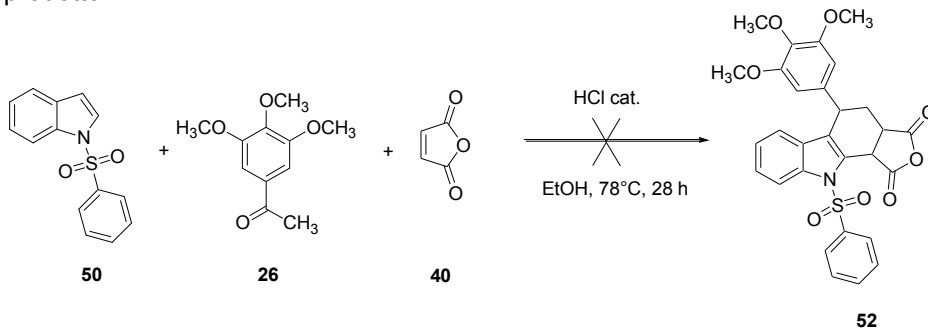


Figura 48 – Sintesi effettuata mediante l'impiego di 1-(fenilsulfonyl)indolo ed anidride maleica.

4.8 Sintesi di carbazoli caratterizzati da un minor ingombro sterico

Allo scopo di sintetizzare nuovi carbazoli che fossero caratterizzati da un minor ingombro sterico, è stata realizzata la reazione mostrata in figura 49.

Con riferimento alla procedura *one pot* a tre componenti descritta precedentemente, una soluzione di indolo, 3,4,5-trimetossiacetofenone e DIAD in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. La durata della reazione è di 3 ore.

La miscela è stata purificata mediante colonna cromatografica impiegando come miscela eluente una soluzione cicloesano/AcOEt 8:2, ma non è stato possibile evidenziare la formazione del prodotto desiderato.

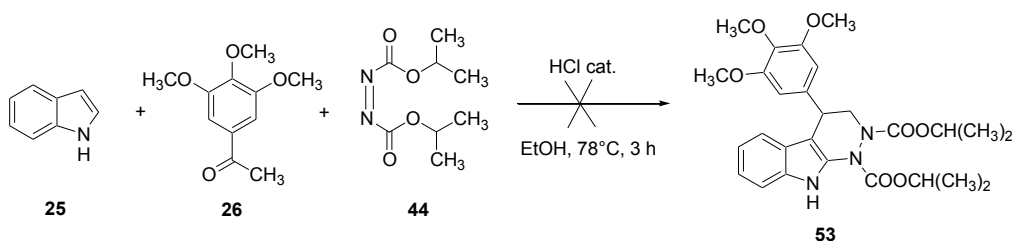


Figura 49 – Procedura *one pot* realizzata con impiego di DIAD.

La stessa procedura è stata realizzata impiegando il DMAD anziché il DIAD, al fine di ottenere i nuovi analoghi mostrati in figura 50.

Una soluzione di indolo, 3,4,5-trimetossiacetofenone e dimetil acetilenedicarbossilato (**54**, DMAD, *dimethyl acetylenedicarboxylate*) in EtOH

assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. La durata della reazione è di 5 ore.

La reazione fornisce un precipitato ed un filtrato che è stato purificato mediante colonna cromatografica impiegando come miscela eluente una soluzione cicloesano/AcOEt 9:1. Anche in questo caso non è stato possibile evidenziare la formazione dei prodotti attesi.

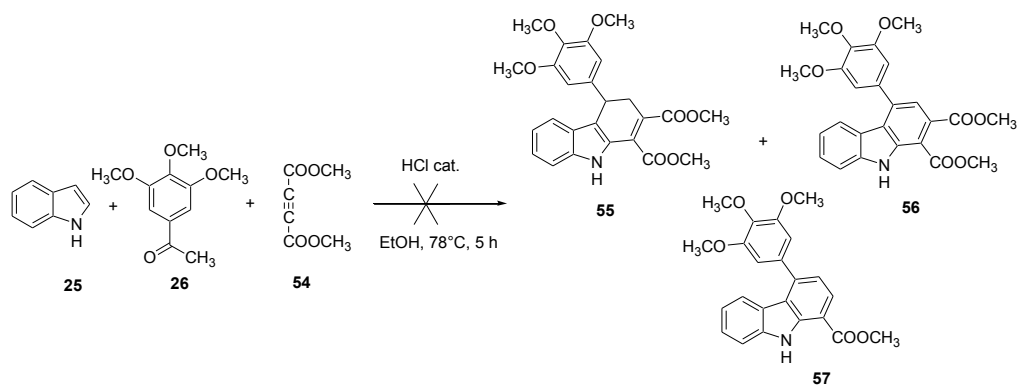


Figura 50 – Procedura *one pot* realizzata con impiego di DMAD.

La stessa procedura è stata realizzata impiegando anidride maleica ed acido maleico insieme all'indolo ed al trimetossiacetofenone, ma anche in questo caso la reazione non ha consentito di ottenere nuovi prodotti (figura 51).

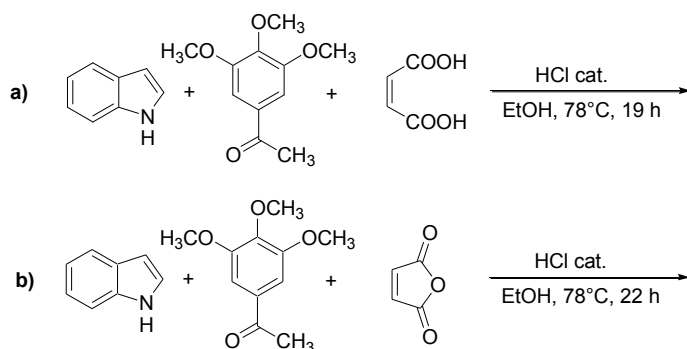


Figura 51 – Procedura *one pot* realizzata con impiego di acido maleico (a) ed anidride maleica (b).

4.9 Trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli ottenuti dal 6-bromoindolo: (serie R=Br)

In un'ulteriore fase del lavoro di sintesi, l'attività di ricerca è stata dedicata alla preparazione di nuovi analoghi ottenuti a partire dal 6-bromoindolo.

Obiettivo perseguito è stato quello ancora una volta quello di riuscire a sintetizzare analoghi che non fossero sostituiti sull'anello della maleimide e, pertanto, che fossero caratterizzati da un minor ingombro sterico rispetto ai composti già ottenuti.

La reazione descritta nel paragrafo 4.5.5, realizzata a partire dal 6-metossindolo, non ha consentito di ottenere il prodotto desiderato. È stata realizzata, pertanto, la stessa sintesi a partire dal 6-bromoindolo.

4.9.1 Sintesi del bromotetraidrocarbazolo

Una soluzione di maleimide, 3,4,5-trimetossiacetofenone e 6-bromoindolo in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo circa 22 ore, quando non vi sono più tracce di indolo su lastra TLC in gel di silice, la reazione è terminata ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo. La reazione permette di ottenere il tetraidrocarbazolo desiderato (**59**) con una resa del 29% (figura 52).

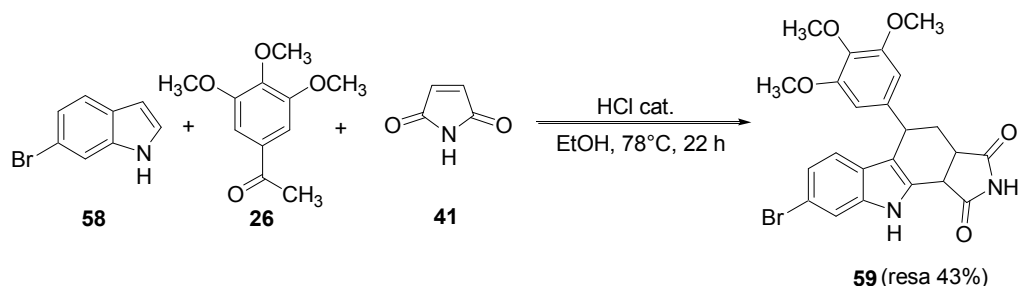


Figura 52 – Sintesi del bromotetraidrocarbazolo.

4.9.2 Ossidazione del bromotetraidrocarbazolo: sintesi del carbazolo corrispondente

Il bromotetraidrocarbazolo **59** è stato successivamente ossidato mediante l'impiego di DDQ al fine di ottenere il carbazolo corrispondente (figura 53).

Ad una soluzione del tetraidrocarbazolo in 1,4-diossano è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (3 equivalenti). La soluzione è posta a riflusso a 100 °C per circa 1 ora. Il prodotto ottenuto risulta insolubile in diossano, ed è ottenuto come solido precipitato giallo, purificato mediante lavaggio con CH₂Cl₂ (resa 80%).

La purificazione del nuovo prodotto risulta più agevole rispetto all'isolamento degli analoghi corrispondenti realizzati nelle serie precedenti.

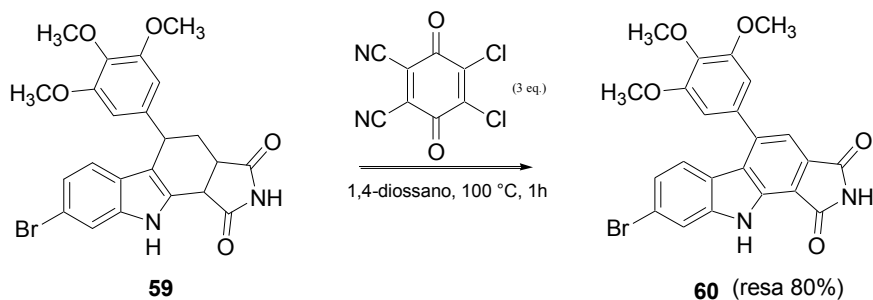


Figura 53 – Ossidazione del bromotetraidrocarbazolo.

4.10 Conclusioni

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, che è stata concepita come modello sperimentale. La realizzazione di questa prima serie di molecole è stata fondamentale, poiché ha consentito di mettere a punto i percorsi di sintesi adeguati per la realizzazione di molecole più complesse.

Nel corso del lavoro di tesi sono dunque stati sintetizzati nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli a partire dall'indolo semplice e, successivamente, 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 tali 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.

Tutte le molecole realizzate sono state successivamente sottoposte a test *in vitro* per la valutazione dell'attività biologica.

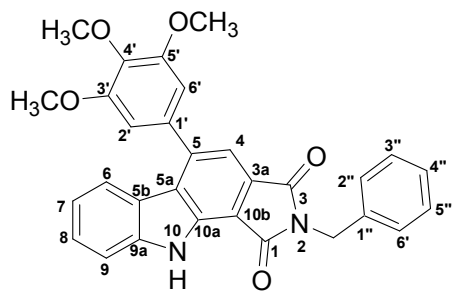
4.11 Parte sperimentale

Materiali e strumenti impiegati:

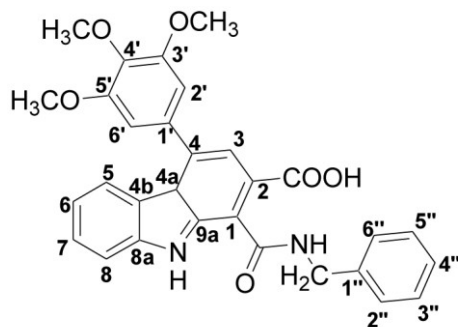
- I solventi utilizzati nel corso del lavoro sperimentale sono stati forniti dalla VWR International s.r.l. Ove necessario i solventi sono stati distillati secondo procedure note.
- I reattivi impiegati sono prodotti Sigma-Aldrich S.p.a., Merck S.p.a. ed Acros Organics, e sono stati utilizzati senza purificazioni supplementari.
- Le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile, utilizzando lastre in alluminio al gel di silice (Merck Kieselgel 60 F254). Le aree di interesse sono state rilevate mediante luce ultravioletta (254 e 365 nm), e successivamente spruzzate con una soluzione etanolica di vanillina e acido solforico e riscaldate.
- La cromatografia su colonna è stata realizzata su gel di silice Merck (35-70 μm o 20-45 μm).
- Le analisi di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) sono state registrate su spettrometri Bruker AC 300 e Avance 400 Rispettivamente a 300 e 400 MHz), utilizzando cloroformio deuterato (CDCl_3), DMSO deuterato ed acetone deuterato come solventi. I segnali ^1H e ^{13}C sono stati confermati mediante esperimenti 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC).
- Gli spettri di massa sono stati registrati mediante uno spettrometro di massa ZQ2000 Waters mediante *elettrospray* (ESI) oppure spettrometro Nerman R10-10C mediante ionizzazione chimica.
- Gli spettri infrarosso sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro Nicolet 510 FT-IR.
- I punti di fusione sono stati misurati per mezzo di un microscopio Leica.

Nomenclatura e numerazione:

La numerazione impiegata per la descrizione degli spettri NMR è la seguente:



Acido 1-benzilcarbamoil-4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-2-carbossilico



31a

Ad una soluzione del carbazolo **29** (238,3 mg, 0,48 mmol) in 1,4-diossano è aggiunto LiOH in H₂O (2,4 mmol) e tetraidrofurano. La soluzione è portata a riflusso per circa 6 ore. Il pH è portato al valore di 5 con aggiunta di HCl 1N. La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica (gel di silice 20-45 μm, fase mobile: AcOEt/cicloesano 8:2, 1% di acido acetico). Il prodotto è ottenuto come solido amorfo giallo (22 mg, resa 9%).

Formula bruta: C₃₀H₂₆N₂O₆

Peso molecolare: 510,54 g/mol

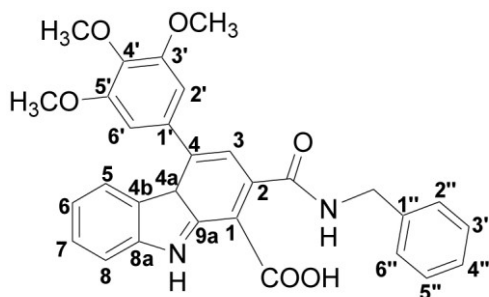
IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3294, 3062, 3008, 2957, 2927, 2848, 1703, 1618, 1585, 1499, 1460, 1451, 1407, 1326, 1274, 1233, 1205, 1180, 1130, 991, 828, 804, 757, 744, 733, 698.

NMR: (dati confermati mediante analisi HMQC ed HMBC)

- **¹H (DMSO-*d*₆):** **3,79** (s, coperto dal segnale di ^{3'-5'}OCH₃, 3H, ^{4'}OCH₃); **3,80** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **4,64** (d, J=5,8 Hz, CH₂); **6,85** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,04** (ddd, J_{6,5}=8 Hz, J_{6,7}=8 Hz, J_{6,8}=1,1Hz, 1H, H₆); **7,25** (m, 1H, H_{4''}); **7,34** (m, 2H, H_{3''-5''}); **7,42** (ddd, J_{7,6}=8 Hz, J_{7,8}=8,2 Hz, J_{7,5}=1,1 Hz, 1H, H₇); **7,52** (dl, J=8 Hz, 3H, H_{2''-6''} + H₅); **7,56** (s, 1H, H₃); **7,64** (dl, J=8,2 Hz, 1H, H₈); **8,96** (t, 1H, NH-CH₂); **11,49** (s, 1H, NH).
- **¹³C (DMSO-*d*₆):** **43,5** (CH₂); **56,4** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (^{4'}OCH₃); **106,5** (C_{2'-6'}); **112,4** (C₈); **119,3** (C₆); **121,2** (C_{4b}); **122,5** (C₁+C₃); **123,3** (C_{4a}+C₅); **125,5** (C₇); **127,1** (C_{4''}); **128,1** (C_{2''}+C_{6''}); **128,6** (C_{3''}+C_{5''}); **135,8** (C_{1'}); **136,8** (C₂); **137,8** (C₄+C_{4'}); **139,8** (C_{1''}+C_{9a}); **142,8** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **167,4** (CO); **168,1** (COOH).

Spettro di massa (ESI⁺): *m/z* 533 [M+Na]⁺, 511 [M+H]⁺.

Acido 2-benzilcarbamoil-4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-1-carbossilico



31b

Ad una soluzione del composto **29** (238,3 mg, 0,48 mmol) in 1,4-diossano è aggiunto LiOH in H₂O (2,4 mmol) e tetraidrofurano. La soluzione è portata a riflusso per circa 6 ore. Il pH è portato al valore di 5 con aggiunta di HCl 1N. La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica (gel di silice 20-45 μm, fase mobile: AcOEt/cicloesano 8:2, 1% di acido acetico). Il prodotto è ottenuto come solido giallo (84,5 mg, resa 34%).

Formula bruta: C₃₀H₂₆N₂O₆

Peso molecolare: 510,54 g/mol

Punto di fusione: 151,4-153,8 °C

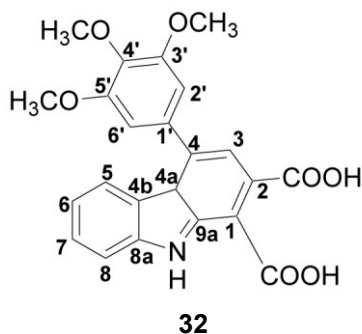
IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3405, 3229, 2924, 2848, 1688, 1655, 1649, 1578, 1571, 1561, 1546, 1535, 1508, 1459, 1322, 1302, 1271, 1234, 1216, 1172, 1126, 1002, 833, 735, 698.

NMR: (dati confermati mediante analisi HMQC ed HMBC)

- **¹H (DMSO-d₆):** **3,79** (s, coperto dal segnale di ^{3'-5'}OCH₃, 3H, ^{4'}OCH₃); **3,80** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **4,48** (d, J=6,4 Hz, CH₂); **6,89** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,04** (td, J=7,4 Hz, J=1 Hz, 1H, H₆); **7,10** (s, 1H, H₃); **7,24** (t, J=7,1 Hz, 1H, H_{4''}); **7,33** (t, J=7,5 Hz, 2H, H_{3'-5''}); **7,41** (m, 3H, H_{2''-6''} + H₇); **7,51** (dl, J=8,1 Hz, 1H, H₅); **7,75** (dl, J=8 Hz 1H, H₈); **8,91** (t, 1H, scambiabile con D₂O, NH-CH₂); **11,47** (s, 1H, scambiabile con D₂O, NH).
- **¹³C (DMSO-d₆):** **43,1** (CH₂); **56,5** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (^{4'}OCH₃); **106,5** (C_{2'-6'}); **112,2** (C₁); **112,8** (C₈); **119,5** (C₆); **119,9** (C₃); **121,2** (C_{4b}); **121,7** (C_{4a}); **122,1** (C₅); **126,8** (C₇); **127,1** (C_{4''}); **127,7** (C_{2''}+C_{6''}); **128,7** (C_{3''}+C_{5''}); **135,5** (C_{1'}); **136,5** (C₂); **137,9** (C_{4'}); **139,4** (C_{9a}); **139,7** (C₄); **140,1** (C_{1''}); **141,6** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **168,2** (COOH); **169,5** (CO).

Spettro di massa (ESI⁺): *m/z* 533 [M+Na]⁺.

Acido 4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-1,2-dicarbossilico



Per la sintesi dell'acido dicarbossilico, ad una soluzione dei due isomeri **31a** e **31b** (510,5 mg, 1,3 mmol) in acetonitrile/H₂O 9:1 sono aggiunti 7 equivalenti di acido cloridrico 1N. La soluzione è portata a 81 °C per 8 ore. Il prodotto è purificato mediante l'impiego della resina a scambio ionico DOWEX 50WX8-100. La reazione permette di ottenere l'acido o-dicarbossilico sotto forma di un solido giallo con una resa del 94% (33,3 mg).

Formula bruta: C₂₃H₁₉NO₇

Peso molecolare: 421,40 g/mol

Punto di fusione: 275-278 °C

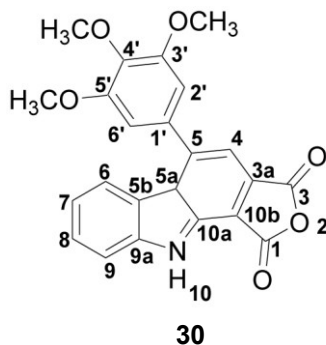
IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3389, 2924, 2848, 1719, 1701, 1686, 1580, 1508, 1459, 1414, 1321, 1236, 1174, 1153, 1125, 1042, 1003, 745.

NMR: (dati confermati mediante analisi HMQC ed HMBC)

- **¹H (DMSO-d₆):** **3,80** (s, 9H, ^{3'-5'}OCH₃ + ^{4'}OCH₃); **6,88** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,02** (t, J=7,8 Hz, 1H, H₆); **7,38** (t, J=7,8 Hz, 1H, H₇); **7,48** (d, J=8 Hz, 1H, H₈); **7,67** (s, 1H, H₃); **7,76** (d, J=8 Hz, 1H, H₅); **11,79** (s, 1H, NH).
- **¹³C (DMSO-d₆):** **56,5** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (^{4'}OCH₃); **106,5** (C_{2'-6'}); **112,7** (C₁+C₈); **119,3** (C₆); **121** (C_{4b}); **122,3** (C₅); **122,9** (C₃+C_{4a}); **126,9** (C₇); **132** (C₂); **135,8** (C_{1'}); **137,7** (C_{4'}); **138,7** (C₄+C_{9a}); **141,6** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **169,2** (COOH₁); **169,5** (COOH₂).

Spettro di massa (ESI⁺): m/z 444 [M+Na]⁺.

5-(3',4',5'-trimetossifenil)-10H-2-ossa-10-aza-ciclopenta[a]fluorene-1,3-dione



Ad una soluzione dell'acido *o*-dicarbossilico **32** (46,5mg, 0,1 mmol) in 1,4-diossano sono aggiunti montmorillonite (200 mg) e 0,1 equivalenti di acido metansolfonico (CH₃SO₃H). La soluzione è posta a riflusso a 100 °C per 22 ore. Il prodotto è purificato per filtrazione, ed il filtrato è lavato con CH₂Cl₂ e poi estratto con HCl 1N. L'anidride è ottenuta con una reazione quantitativa.

Formula bruta: C₂₃H₁₇NO₆

Peso molecolare: 403,38 g/mol

Punto di fusione: 298-307°C (decomposizione)

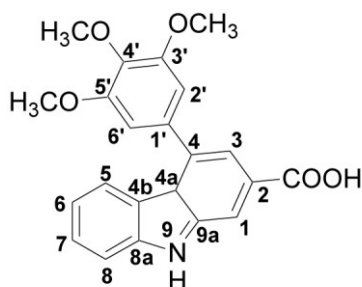
IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3389, 3284, 2918, 2852, 1830, 1768, 1459, 1414, 1356, 1233, 1209, 1122, 875, 727.

NMR: (dati confermati mediante analisi HMQC ed HMBC)

- ¹H (CDCl₃): **3,88** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **4,01** (s, 3H, ^{4'}OCH₃); **6,84** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,2** (ddd, J_{7,6} = 8,1 Hz, J_{7,8} = 8,1 Hz, J_{7,9} = 1,2 Hz, 1H, H₇); **7,58** (ddd, J_{8,7} = 8,1 Hz, J_{8,9} = 8,2 Hz, J_{8,6} = 1,2 Hz, 1H, H₈); **7,63** (dl, J_{9,8} = 8,2 Hz, 1H, H₉); **7,68** (dl, J_{6,7} = 8,1 Hz, 1H, H₆); **7,74** (s, 1H, H₄); **9,36** (sl éch., 1H, NH).
- ¹³C (CDCl₃): **56,3** (^{3'-5'}OCH₃); **61,2** (^{4'}OCH₃); **105,8** (C_{2'-6'}); **110,9** (C_{10b}); **111,9** (C₉); **117,4** (C₄); **121,4** (C₇+C_{5b}); **123,5** (C₆); **128** (C_{3a}); **128,2** (C_{5a}); **129** (C₈); **134,1** (C_{10a}); **134,8** (C_{1'}); **138,6** (C_{4'}); **141,6** (C_{9a}); **145,8** (C₅); **153,7** (C_{3'-5'}); **163,8** (C₁+C₃).

Spettro di massa (ESI⁺): *m/z* 426 [M+Na]⁺, 404 [M+H]⁺.

Acido 4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-2-carbossilico

**33**

All'acido dicarbossilico **32** (116,8 mg, 0,3 mmol) sono aggiunti CuO_2 (3 mg, 0,02 mmol) e fenantrolina (7,5 mg, 0,04 mmol) in una soluzione di *N*-metilpirrolidina e chinolina. La soluzione è posta sotto agitazione alla temperatura di 170 °C, per circa 6 ore. Il prodotto della reazione è diluito con AcOEt, lavato con HCl 1N e purificato mediante cromatografia su colonna (miscela eluente: cicloesano/AcOEt 8:2). Questa reazione consente di ottenere il prodotto desiderato, non facilmente purificabile mediante cromatografia, sotto forma di un solido giallo (8,1 mg, resa 8%).

Formula bruta: $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_5$

Peso molecolare: 377,4 g/mol

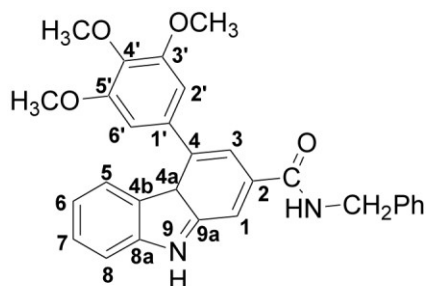
IR (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3339, 2924, 2853, 2359, 2339, 1719, 1676, 1655, 1587, 1508, 1458, 1437, 1427, 1396, 1267, 1235, 1175, 1126.

NMR:

- ^1H (CDCl_3):** **3,90** (s, 6H, $^{3'-5'}$ OCH₃); **4,02** (s, 3H, $^{4'}$ OCH₃); **6,88** (s, 2H, H_{2-6}); **7,01** (ddd, $J_{6,5}=7,9$ Hz, $J_{6,7}=7,9$ Hz, $J_{6,8}=1,3$ Hz, 1H, H_6); **7,47** (ddd, $J_{7,6}=7,9$ Hz, $J_{7,8}=8,1$ Hz, $J_{7,5}=1,3$ Hz, 1H, H_7); **7,52** (dl, $J=8,1$ Hz, 1H, H_8); **7,67** (dl, $J=7,9$ Hz, 1H, H_5); **7,92** (d, $J_{1,3}=1,4$ Hz 1H, H_1); **8,25** (d, $J_{3,1}=1,4$ Hz, 1H, H_3); **8,46** (s, 1H, NH).

Spettro di massa (ESI^+): m/z 400 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Benzilamide dell'acido 4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-2-carbossilico



34

Ad una soluzione dei due isomeri monocarbossilici **31a** e **31b** (50 mg, 0,097 mmol) sono aggiunti CuO_2 (1 mg, 0,007 mmol) e fenantrolina (2,6 mg, 0,015 mmol) in una soluzione di *N*-metilpirrolidina e chinolina. La soluzione è posta sotto agitazione alla temperatura di 170 °C, per circa 6 ore. Il prodotto della reazione è diluito con AcOEt, lavato con HCl 1N e purificato mediante cromatografia su colonna (miscela eluente: cicloesano/AcOEt 8:2). Questa reazione consente di ottenere il prodotto desiderato (2,3 mg), non facilmente purificabile mediante cromatografia, con una resa del 5%.

Formula bruta: $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$

Peso molecolare: 466,53 g/mol

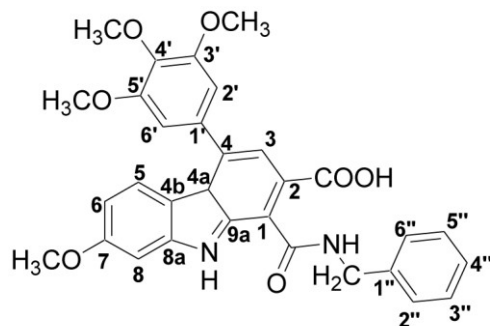
IR (NaCl): ν_{max} cm^{-1} 3334, 2924, 2853, 1723, 1640, 1621, 1583, 1539, 1456, 1396, 1324, 1309, 1282, 1236, 1126, 999, 737, 696.

NMR: (dati confermati mediante analisi COSY45)

- **^1H (CDCl_3):** **3,88** (s, 6H, $^{3'-5'}\text{OCH}_3$); **4,00** (s, 3H, $^4\text{OCH}_3$); **4,75** (d, $J=5,6$ Hz, CH_2); **6,59** (t, 1H, NH-CH_2); **6,83** (s, 2H, $\text{H}_{2'-6'}$); **7,07** (ddd, $J_{6,5}=8$ Hz, $J_{6,7}=8,1$ Hz, $J_{6,8}=1,1$ Hz, 1H, H_6); **7,35** (m, 1H, $\text{H}_{4''}$); **7,39** (s, 1H, H_3); **7,44** (m, 5H, $\text{H}_{3''-5''} + \text{H}_{2''-6''} + \text{H}_7$); **7,5** (d, $J=8,1$ Hz, 1H, H_8); **7,59** (d, $J=8$ Hz, 1H, H_5); **8,1** (d, $J=1,4$ Hz, 1H, H_1); **8,58** (s, 1H, NH).

Spettro di massa (ESI⁺/ESI⁻): m/z 489 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 465 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Acido 1-benzilcarbamoil-7-metossi-4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-2-carbossilico



39a

Ad una soluzione del metossicarbazolo **37** (50 mg, 0,095 mmol) in 1,4-diossano è aggiunto LiOH in H₂O (0,47 mmol) e tetraidrofurano. La soluzione è portata a riflusso per circa 6 ore. Il pH è portato al valore di 5 con aggiunta di HCl 1N. La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica (gel di silice 20-45 μm, fase mobile: AcOEt/cicloesano 8:2, 1% di acido acetico). Il prodotto (20,8 mg) è ottenuto come solido giallo con una resa del 40%.

Formula bruta: C₃₁H₂₈N₂O₇

Peso molecolare: 540,56 g/mol

Punto di fusione: 143,8-147,2 °C

IR (KBr): ν_{\max} cm⁻¹ 3351, 2958, 2927, 2850, 2363, 2342, 1718, 1684, 1654, 1636, 1623, 1617, 1577, 1560, 1544, 1507, 1498, 1460, 1417, 1237, 1203, 1167, 1125, 1019, 793, 699, 670.

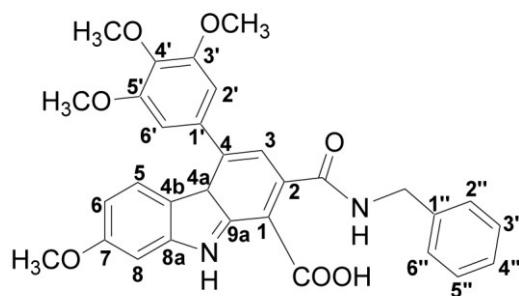
NMR: (dati confermati mediante analisi COSY45, HSQC ed HMBC)

- **¹H (DMSO-*d*₆):** **3,79** (s, coperto dal segnale di ^{3'-5'}OCH₃, 3H, ^{4'}OCH₃); **3,80** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,82** (s, 3H, ⁷OCH₃); **4,62** (d, J=5,7 Hz, CH₂); **6,68** (dd, J_{6,5}=8,8 Hz, J_{6,8}=2,2 Hz, 1H, H₆); **6,84** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,11** (d, J_{8,6}=2,2 Hz, 1H, H₈); **7,25** (t, J=7,2 Hz, 1H, H_{4''}); **7,34** (t, J=7,3 Hz, 2H, H_{3''-5''}); **7,40** (dl, J_{5,6}=8,8 Hz, 1H, H₅); **7,52** (dl, coperto dal segnale di H₃, 2H, H_{2''-6''}); **7,53** (s, 1H, H₃); **8,98** (s, 1H, scambiabile con D₂O, NH-CH₂); **11,32** (s, 1H, scambiabile con D₂O, NH); **12,88** (s, 1H, COOH).
- **¹³C (DMSO-*d*₆):** **43,5** (CH₂); **55,7** (⁷OCH₃); **56,4** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (^{4'}OCH₃); **95,2** (C₈); **106,4** (C_{2'-6'}); **109** (C₆); **115** (C_{4b}); **121,2** (C₃); **121,5** (C₁); **123,3** (C₅);

123,6 (C_{4a}); **127,1** (C_{4''}); **128** (C_{2''}+C_{6''}); **128,6** (C_{3''}+C_{5''}); **135,5** (C_{1'}); **135,8** (C₂); **137,7** (C_{4'}); **137,8** (C₄); **139,8** (C_{1''} + C_{9a}); **143,8** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **160** (C₇); **167,5** (CO); **168,3** (COOH).

Spettro di massa (ESI⁺/ESI⁻) : *m/z* 541 [M+H]⁺; 563 [M+Na]⁺; 1103 [2M+Na]⁺; 1643 [3M+Na]⁺; 539 [M-H]⁻.

Acido 2-benzoilcarbamoil-7-metossi-4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-1-carbossilico



39b

Ad una soluzione del metossicarbazolo **37** (50 mg, 0,095 mmol) in 1,4-diossano è aggiunto LiOH in H₂O (0,47 mmol) e tetraidrofurano. La soluzione è portata a riflusso per circa 6 ore. Il pH è portato al valore di 5 con aggiunta di HCl 1N. La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica (gel di silice 20-45 μm, fase mobile: AcOEt/cicloesano 8:2, 1% di acido acetico). Il prodotto è ottenuto come solido giallo (16,7 mg, resa 32%).

Formula bruta: C₃₁H₂₈N₂O₇

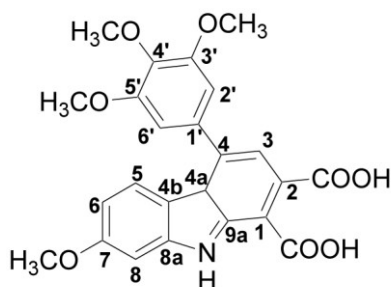
Peso molecolare: 540,56 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi COSY45, HSQC ed HMBC)

- ¹H (DMSO-d₆): **3,78** (s, 3H, ^{4'}OCH₃); **3,80** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,81** (s, 3H, ⁷OCH₃); **4,48** (d, J=5,8 Hz, CH₂); **6,68** (dd, J_{6,5}=8,8 Hz, J_{6,8}=2,3 Hz, 1H, H₆); **6,87** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,10** (s, 1H, H₃); **7,24** (t, J=7,0 Hz, 1H, H_{4''}); **7,28** (d, J_{8,6}=2,2 Hz, 1H, H₈); **7,33** (t, J=7,4 Hz, 2H, H_{3''-5''}); **7,39** (dl, J_{5,6}=8,2 Hz, 1H, H₅); **7,42** (dl, J=7,4 Hz, 2H, H_{2''-6''}); **9,00** (s, 1H, scambiabile con D₂O, NH-CH₂); **11,32** (s, 1H, scambiabile con D₂O, NH).
- ¹³C (DMSO-d₆): **43,2** (CH₂); **55,6** (⁷OCH₃); **56,5** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (^{4'}OCH₃); **106,5** (C_{2'-6'}); **108,9** (C₆); **115** (C_{4b}); **120,7** (C₈+C₁); **122** (C₃); **123** (C₅+ C_{4a}); **127,1** (C_{4''}); **127,7** (C_{2''}+C_{6''}); **128,7** (C_{3''}+C_{5''}); **132,6** (C₁); **135,6** (C₂); **137,8** (C₄); **137,8** (C₄); **140,1** (C_{1''} + C_{9a}); **143,2** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **159,3** (C₇); **168,2** (COOH); **169,6** (CO).

Spettro di massa (ESI⁺) : m/z 539 [M-H]⁺.

Acido 7-metossi-4-(3',4',5'-trimetossifenil)-9H-carbazolo-1,2-dicarbossilico



40

Per la sintesi dell'acido dicarbossilico, ad una soluzione dei due isomeri **39a** e **39b** (129,2 mg, 0,24 mmol) in acetonitrile/H₂O 9:1 sono aggiunti 7 equivalenti di acido cloridrico 1N. La soluzione è portata a 81°C per 6 ore. Il prodotto è purificato mediante l'impiego della resina a scambio ionico DOWEX 50WX8-100. La reazione permette di ottenere l'acido *o*-dicarbossilico sotto forma di un solido giallo (74,2 mg, resa 69%).

Formula bruta: C₂₄H₂₁NO₈

Peso molecolare: 451,43 g/mol

Punto di fusione: 245-248 °C.

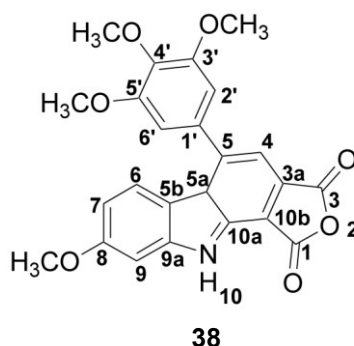
IR (NaCl): ν_{\max} cm⁻¹ 3373, 2920, 2848, 1654, 1585, 1546, 1458, 1449, 1366, 1302, 1236, 1123, 1073, 1042.

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- ¹H (DMSO-*d*₆): **3,78** (s, 3H, ⁴OCH₃); **3,80** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,81** (s, 3H, ⁷OCH₃); **6,69** (dd, J_{6,5}=8,7 Hz, J_{6,8}=2,3 Hz, 1H, H₆); **6,87** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,23** (d, J_{8,6}=2,3 Hz, 1H, H₈); **7,25**(s, 1H, H₃); **7,38** (dl, J_{5,6}=8,7 Hz, 1H, H₅); **11,4** (s, 1H, NH).
- ¹³C (DMSO-*d*₆): **55,7** (⁷OCH₃); **56,4** (^{3'-5'}OCH₃); **60,7** (⁴OCH₃); **95,8** (C₈); **106,5** (C_{2'-6'}); **109,1** (C₆); **113,6** (C₁); **114,9** (C_{4b}); **120** (C₃); **123,1** (C₅+C_{4a}); **129,8** (C₂); **135,4** (C_{1'}); **137,8** (C_{4'}); **138** (C_{9a}); **138,6** (C₄); **143,6** (C_{8a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **159,6** (C₇); **168,2** (COOH₁); **169,9** (COOH₂).

Spettro di massa (ESI) : *m/z* 450 [M-H]⁻.

8-Metossi-5-(3',4',5'-trimetossifenil)-10H-2-ossa-10-azaciclopenta[a]fluorene-1,3-dione



Ad una soluzione dell'acido dicarbossilico **40** (47,1 mg, 0,1 mmol) in 1,4-diossano anidro è aggiunta montmorillonite (200 mg). La soluzione è posta a riflusso a 100 °C per 24 ore. Il prodotto è purificato per filtrazione, ed il filtrato è lavato con CH₂Cl₂ e poi estratto con HCl 1N. L'anidride è ottenuta con una reazione quantitativa.

Formula bruta: C₂₄H₁₉NO₇

Peso molecolare: 433,41 g/mol

Punto di fusione: 181,0-183,6 °C.

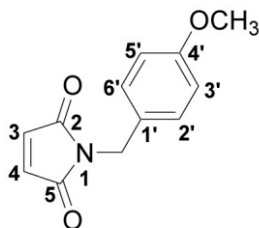
IR (NaCl): ν_{\max} cm⁻¹ 3581, 3383, 2922, 2849, 1835, 1758, 1629, 1584, 1451, 1385, 1345, 1238, 1132, 1068, 1030, 874, 832, 800, 744.

NMR: (dati confermati mediante analisi COSY45, HSQC ed HMBC)

- **¹H (CDCl₃):** **3,90** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,94** (s, 3H, ⁸OCH₃); **4,01** (s, 3H, ^{4'}OCH₃); **6,80** (dd, J_{7,6} = 8,8 Hz, J_{7,9} = 2,2 Hz, 1H, H₇); **6,83** (s, 2H, H_{2'-6'}); **7,05** (d, J_{9,7} = 2,2 Hz, 1H, H₉); **7,55** (dl, J_{6,7} = 8,8 Hz, 1H, H₆); **7,70** (s, 1H, H₄); **9,39** (sl éch., 1H, NH).
- **¹³C (CDCl₃):** **55,7** (⁸OCH₃); **56,3** (^{3'-5'}OCH₃); **61,2** (^{4'}OCH₃); **95,1** (C₉); **105,8** (C_{2'-6'}); **110,8** (C₇ + C_{10b}); **115,2** (C_{5b}); **117,4** (C₄); **124,4** (C₆); **126,4** (C_{3a}+C_{5a}); **134,2** (C_{10a} + C₁); **142,7** (C_{4'}); **143,5** (C_{9a}); **144,1** (C₅); **153,6** (C_{3'-5'}); **161,2** (C₈); **163,9** (C₃); **167,9** (C₁).

Spettro di massa (ESI⁺): m/z 434 [M+H]⁺.

1-(4-metossibenzil)-pirrolo-2,5-dione

N-(*p*-metossibenzil)-maleimide

46

Ad una soluzione di trifenilfosfina (2,7 g, 10,3 mmol) e maleimide (1g, 10,3 mmol) anidri in THF anidro è aggiunto alcol 4-metossibenzile (alcol anisico, 984 μ l, 7,9 mmol) sotto agitazione e, successivamente, è aggiunto goccia a goccia diidopropil azodicarbossilato (DIAD, *diisopropyl azodicarboxylate*, 2,028 ml, 10,3 mmol).

La sintesi è condotta a temperatura ambiente, e la durata è di 19 ore. La miscela di reazione è purificata mediante colonna cromatografica, impiegando come miscela eluente una soluzione cicloesano/AcOEt 99:1. Il prodotto desiderato, la *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide (Martinez *et al.*, 2005; Shults *et al.*, 2005) è ottenuto con una resa del 44% (753,4 mg).

Formula bruta: C₁₂H₁₁NO₃

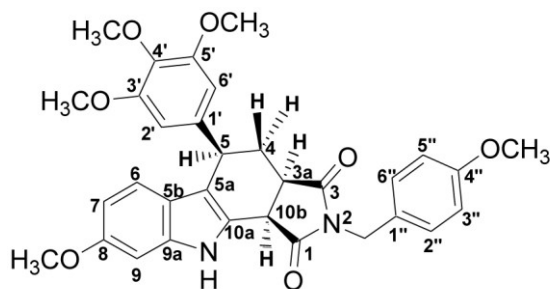
Peso molecolare: 217,22 g/mol

NMR:

- ¹H (CDCl₃): **3,79** (s, 3H, OCH₃); **4,63** (s, 2H, CH₂); **6,70** (s, 2H, H₃₋₄); **6,85**(m, 2H, H_{2'-6'}); **7,31** (m, 2H, H_{3'-5'}).

Spettro di massa (ESI⁺) : *m/z* 272 [M+Na]⁺.

8-Metossi-2-(4-metossibenzil)-5-(3',4',5'-trimetossifenil)-4,5,10,10b-tetraidro-3aH-pirrolo[3,4-a]carbazolo-1,3-dione



47

In una reazione *one pot* e tre componenti, una soluzione di 6-metossindolo (490,8 mg, 3,3 mmol), 3,4,5-trimetossiacetofenone (701,1 mg, 3,3 mmol) e *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide **46** (724,4 mg, 3,3 mmol) in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo circa 18 ore la reazione è terminata ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo. La reazione permette di ottenere il tetraidrocarbazolo desiderato come solido di color beige (235,5 mg, resa 13%).

Formula bruta: C₃₂H₃₂N₂O₇

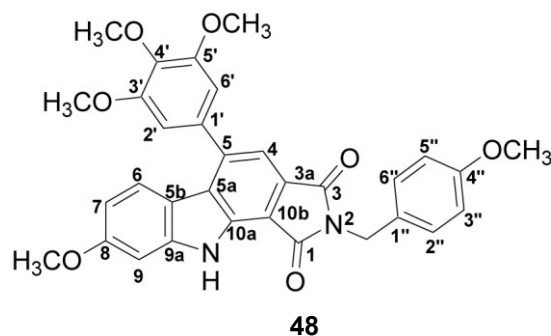
Peso molecolare: 556,61 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- ¹H (CDCl₃): **1,89** (m, 1H, H_a); **2,59** (m, 1H, H_b); **3,40** (m, 1H, H_{3a}); **3,72** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,79** (s, 3H, ⁸OCH₃); **3,83** (s, 3H, ^{4''}OCH₃); **3,88** (s, 3H, ^{4'}OCH₃); **4,09** (m, 2H, H₅ + H_{10b}); **4,52** (dl, J=14 Hz, 1H, CH₂); **4,61** (dl, J=14 Hz, 1H, CH₂); **6,36** (s, 2H, H_{2'-6'}); **6,56** (dd J_{7,6}=8,9 Hz, J_{7,9}=2 Hz, 1H, H₇); **6,61** (dl, J_{6,7}=8,9 Hz, 1H, H₆); **6,83** (d, J=8,9 Hz, 2H, H_{3''-5''}); **6,87** (d, J=2 Hz, 1H, H₉); **7,32** (d, J=8,9 Hz, 2H, H_{2''-6''}); **8,52** (s, 1H, NH).
- ¹³C (CDCl₃): **35,6** (C₄); **39,1** (C_{10b}); **39,5** (C₅); **40,3** (C_{3a}); **42** (CH₂); **55,2** (⁸OCH₃); **55,6** (^{4'}OCH₃); **56,1** (^{3'-5'}OCH₃); **60,9** (^{4''}OCH₃); **94,6** (C₉); **105,2** (C_{2'-6'}); **109,3** (C₇); **114** (C_{3''-5''}); **114,3** (C_{5a}); **120,1** (C_{9a}); **120,9** (C₆); **125,4** (C_{5b}); **127,7** (C_{1''}); **130,3** (C_{2''-6''}); **136,8** (C_{10a}); **137,6** (C_{4'}); **138,6** (C₁); **153,1** (C_{3'-5'}); **156,5** (C_{4''}); **159,4** (C₈); **175,8** (C₁); **177,9** (C₃).

Spettro di massa (ESI) : *m/z* 555 [M-H]⁻.

8-Metossi-2-(4-metossibenil)-5-(3',4',5'-trimetossifenil)-10H-pirrolo[3,4-a]carbazolo-1,3-dione



Ad una soluzione del tetraidrocarbazolo **47** (100 mg, 0,18 mmol) in 1,4-diossano è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (134,5 mg, 0,59 mmol, 3,3 eq.). La soluzione è posta a refluxo a 100 °C per circa 2 ore. La miscela di reazione è purificata mediante cromatografia su colonna impiegando come fase eluente una miscela cicloesano/AcOEt 7:3. Il prodotto è ottenuto come solido di colore giallo (176,3 mg, resa 88%).

Formula bruta: C₃₂H₂₈N₂O₇

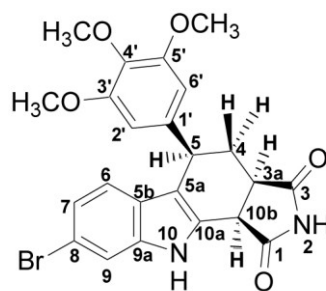
Peso molecolare: 552,57 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- ¹H (CDCl₃): **3,79** (s, 3H, ^{4''}OCH₃); **3,88** (s, 6H, ^{3'-5'}OCH₃); **3,91** (s, 3H, ⁸OCH₃); **4** (s, 3H, ^{4'}OCH₃); **4,85** (s, 2H, CH₂); **6,73** (dd, J_{7,6}=8,9 Hz, J_{7,9}=2,3 Hz, 1H, H₇); **6,81** (s, 2H, H_{2'-6'}); **6,87** (d, J=8,8 Hz, 2H, H_{3''-5''}); **6,98** (d, J_{9,7}=2,3 Hz, 1H, H₉); **7,43** (d, J=8,8 Hz, 2H, H_{2''-6''}); **7,52** (dl, J_{6,7}=8,9 Hz, 1H, H₆); **7,57** (s, 1H, H₄); **9,23** (sl éch., 1H, NH).
- ¹³C (CDCl₃): **40,9** (CH₂); **55,3** (^{4''}OCH₃); **55,6** (⁸OCH₃); **56,2** (^{3'-5'}OCH₃); **61,1** (^{4'}OCH₃); **94,9** (C₉); **105,9** (C_{2'-6'}); **109,8** (C₇); **114** (C_{3''+C_{5''}}); **115,4** (C₄); **116** (C_{5b}); **124,1** (C₆); **127,3** (C_{5a}); **127,7** (C_{3a}); **129** (C_{1''}); **129,9** (C_{2''-6''}); **134,4** (C_{4'+C_{10a}}); **135** (C_{10b}); **138,1** (C₅); **138,6** (C₁); **143,5** (C_{9a}); **153,5** (C_{3'-5'}); **159,1** (C_{4''}); **160,6** (C₈); **169** (C_{1+C₃}).

Spettro di massa (ESI⁺) : m/z 575 [M+Na]⁺.

8-Bromo-5-(3',4',5'-trimetossifenil)-4,5,10,10b-tetraidro-3aH-pirrolo[3,4-a]carbazolo-1,3-dione



59

Una soluzione di 6-bromoindolo (100 mg, 0,5 mmol), maleimide (49,5 mg, 0,5 mmol), e 3,4,5-trimetossiacetofenone (107,2 mg, 0,5 mmol) in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo circa 22 ore, quando non vi sono più tracce di indolo su lastra TLC in gel di silice, la reazione è terminata ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo. La reazione permette di ottenere il tetraidrocarbazolo desiderato come solido giallo (71 mg, resa 29%).

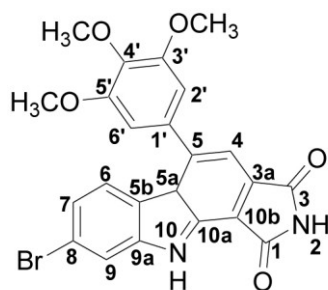
Formula bruta C₂₃H₂₁BrN₂O₅

Peso molecolare: 485,33 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- ¹H (300 MHz, CDCl₃):** 1,40 (m, 1H, H_a); 2,0 (m, 1H, H_b); 2,55 (m, 1H, H_{3a}); 3,43 (s, 3H, ⁵OCH₃); 3,68 (s, 3H, ^{3'}OCH₃); 3,83 (s, 3H, ^{4'}OCH₃); 4,09 (m, 2H, H₅ + H_{10b}); 6,30 (s, 2H, H_{2'-6'}); 6,53 (d, J_{6,7}=8,6 Hz, 1H, H₆); 6,95 (dd, J_{7,6}=8,6 Hz, J_{7,9}=1,6 Hz, 1H, H₇); 7,3 (s, 1H, H₄); 7,49 (d, J_{9,7}=1,6 Hz, 1H, H₉); 7,87 (s, 1H, NH); 8,65 (s, 1H, NH).
- ¹³C (CDCl₃):** 56,2 (^{3'-5'}OCH₃); 60,4 (^{4'}OCH₃); 105,6 (C_{2'-6'}+C₆); 112,5 (C_{10b}); 114,1 (C₈); 114,4 (C₄+C₉); 120,9 (C₇); 121,7 (C_{5b}); 125,0 (C_{5a}); 130,0 (C_{3a}); 136,5 (C_{1''}+C_{10a}); 138,1 (C_{4'}+C_{9a}); 140,0 (C₅); 153,1 (C_{3'-5'}); 177,3 (C₁); 180,2 (C₃).

Spettro di massa (ESI⁺): m/z 507, 509 [M+Na]⁺.

8-Bromo-5-(3',4',5'-trimetossifenil)-10H-pirrolo[3,4-a]carbazolo-1,3-dione**60**

Ad una soluzione del tetraidrocarbazolo **59** (88,7 mg, 0,18 mmol) in 1,4-diossano è aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, una soluzione di DDQ (124,5 mg, 0,57 mmol, 3 eq.). La soluzione è posta a riflusso a 100 °C per circa un'ora. Il prodotto ottenuto risulta insolubile in diossano, ed è ottenuto come solido precipitato giallo, purificato mediante lavaggio con CH₂Cl₂ (resa 80%).

Formula bruta: C₂₃H₁₇BrN₂O₅

Peso molecolare: 481,30 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- **¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** 3,74 (s, 9H, ^{4'}OCH₃+ ^{3'-5'}OCH₃); 6,87 (s, 2H, H_{2'-6'}); 7,23 (dd, J_{7,6}=8,6 Hz, J_{7,9}=1,8 Hz, 1H, H₇); 7,38 (d, J_{6,7}=8,6 Hz, 1H, H₆); 7,40 (s, 1H, H₄); 7,75 (d, J_{9,7}=1,8 Hz, 1H, H₉); 11,2 (s, 1H, NH); 12,4 (s, 1H, NH).
- **¹³C (DMSO-*d*₆):** 56,2 (^{3'-5'}OCH₃); 61,1 (^{4'}OCH₃); 102,1 (C₆); 106,5 (C_{2'-6'}); 113,2 (C_{10b}); 114,2 (C₈); 115,0 (C₄); 116 (C₉); 120,5 (C₇); 120,9 (C₉); 126 (C_{5a}); 130 (C_{3a}); 135,0 (C_{1'+C9a}); 143,5 (C_{4'}); 144,0 (C₅); 154,0 (C_{3'+C5'}); 169 (C₁); 170,0 (C₃).

Spettro di massa (ESI⁺): *m/z* 503, 505 [M+Na]⁺.

CAPITOLO 5

Parte Sperimentale II
Valutazione dell'attività biologica di nuovi
trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli**5.1 Introduzione**

I test *in vitro* atti a valutare l'attività biologica delle molecole ottenute sono stati realizzati in collaborazione con l'équipe del Prof. Guy G. Chabot del Laboratorio di Farmacologia Chimica e Genetica, Facoltà di Scienze Farmaceutiche e Biologiche dell'Università Paris Descartes.

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

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* (Galbraith *et al.*, 2001).

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

5.2 Metodologie impiegate**5.2.1 Citotossicità: MTT test**

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 (Tubaro *et al.*, 1996).

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.

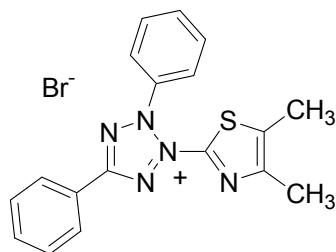


Figura 1 – Struttura del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Il bromuro di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-fenil)-2,5-difenile (figura 1) è un sale di tetrazolio (di colore giallo) che nelle cellule vitali è ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali. Questo composto presenta un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando, per apertura dell'anello tetrazolico, un composto cromogeno azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R^1NH-N=CR^2-N=NR^3$ (figura 2).

La riduzione determina pertanto la formazione di cristalli di formazano, che attribuiscono una caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. La trasformazione dell'MTT determina, infatti, un viraggio della molecola da giallo a blu-violetto.

Questa reazione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, e pertanto in cellule non proliferanti la colorazione risulterà meno intensa.

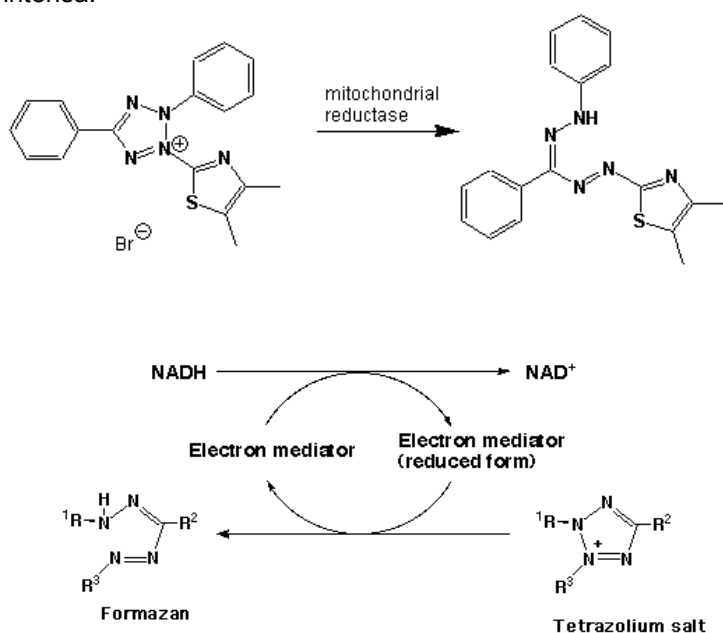


Figura 2 – Riduzione del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) in cristalli di formazano.

I cristalli di formazano possono essere solubilizzati per aggiunta di un idoneo reagente. Il numero di cellule sopravvissute è direttamente proporzionale ai livelli di formazano prodotti, e l'intensità del colore assunto dalla soluzione può essere valutata con l'ausilio di uno spettrofotometro. La produzione di formazano nelle cellule trattate viene valutata in confronto al controllo.

Per la realizzazione del test, la linea cellulare B16 è stata posta in coltura impiegando il mezzo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich S.p.A.) addizionato del 10% di FBS (*fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich S.p.A.), 1% di L-glutammina (Sigma-Aldrich S.p.A.), 1% di penicillina / streptomicina (Sigma-Aldrich S.p.A.), alla temperatura di 37°C ed in presenza di 5% di CO₂.

Le cellule sono state poste in coltura in micropiastre da 96 pozzetti (5000 cellule per pozzetto in 100 μ l di mezzo). Dopo 24 ore sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 μ l di mezzo contenente i composti di interesse a diverse concentrazioni (*range* delle concentrazioni finali da 0.01 a 100 μ M) e le piastre sono state incubate per 48 ore. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. La CA-4 e la colchicina sono state impiegate come controlli positivi.

I pozzetti sono stati lavati con DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), e successivamente sono stati aggiunti 100 μ L di MTT (0,5 mg/ml in DPBS). Le piastre sono state poste ad incubare per 4 ore.

In seguito l'MTT è stato rimosso, e sono stati aggiunti 100 μ L di DMSO per pozzetto. Dopo 30 minuti l'assorbanza è stata letta a 562 nm. L'intensità del colore costituisce un'indicazione del numero delle cellule.

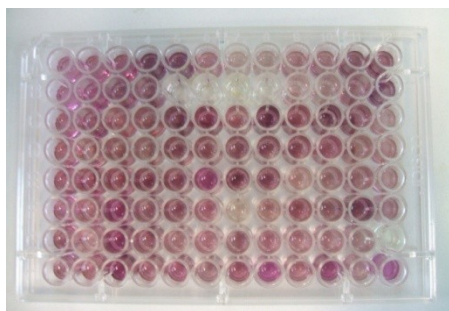


Figura 3 – Colorazione assunta dai pozzetti di una micropiastre dopo solubilizzazione dei cristalli di formazano.

Le cellule sopravvissute sono state misurate come percentuale di assorbanza in confronto al controllo, rappresentato dalle cellule in DMSO 0,5%. La percentuale d'inibizione della vitalità cellulare è stata valutata secondo la seguente formula:

% inibizione MTT = $[1 - \text{assorbanza campione con estratto} / \text{assorbanza controllo senza estratto}] \times 100$

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando lo Student's t test. Le differenze sono state considerate significative a valori di $p \leq 0.05$. Le concentrazioni necessarie per inibire la crescita cellulare del 50%, cioè i valori di IC_{50} , sono state determinate relazionando la percentuale di inibizione ottenuta alla concentrazione impiegata attraverso una curva di regressione non lineare ottenuta utilizzando il Prism GraphPad® (programma statistico).

5.2.2 Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea hy 926

Le cellule endoteliali sono attualmente impiegate per lo studio *in vitro* di molti processi fisiologici e patologici, in particolar modo nello studio dell'angiogenesi. La maggior parte delle nostre informazioni sulle funzioni delle cellule endoteliali deriva da esperimenti condotti su cellule HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Queste cellule, al pari di altre colture di cellule endoteliali primarie, presentano un

arco di vita medio di cinque passaggi seriali, e possono essere mantenute in coltura fino a cinque mesi, dopo i quali le cellule entrano in uno stato di senescenza in cui cessano di proliferare, tendono a formare cellule giganti, multinucleate, ed infine muoiono. Questo implica l'impossibilità di impiegare queste linee cellulari per esperimenti a lungo termine. Inoltre, l'isolamento di colture primarie di cellule HUVEC è laborioso e risultati sperimentali ottenuti su diverse colture di cellulari non possono facilmente essere comparati fra loro, a causa delle differenze che intercorrono tra colture originate da cellule ottenute da donatori diversi. Obiettivo dei ricercatori negli ultimi anni è stato dunque quello di riuscire ad ottenere linee cellulari endoteliali "immortalizzate". Una delle linee endoteliali umane più frequentemente utilizzate e meglio caratterizzate è rappresentato dalle cellule EA.hy 926 (Bouis *et al.*, 2001).

La linea cellulare immortalizzata Ea.hy 926 (*human endothelial cell line*) è una linea ibrida derivante dalla fusione di cellule endoteliali umane da vena ombelicale (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) con la linea cellulare tumorale umana A549 (*human lung adenocarcinoma cell line*) (Claise *et al.*, 1997; Edgell *et al.*, 1983).

Le cellule EA.hy 926 sono state poste in coltura in DMEM (Sigma-Aldrich S.p.A.) addizionato del 10% di FBS (*fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich S.p.A.), 1% di L-glutamina (Sigma-Aldrich S.p.A.), 1% di penicillina / streptomina (Sigma-Aldrich S.p.A.), alla temperatura di 37°C ed in presenza di 5% di CO₂.

Per la realizzazione del test, le cellule sono state poste in coltura in micropiastre da 96 pozzetti (5000 cellule per pozzetto in 100 µl di mezzo). Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di mezzo contenente diverse concentrazioni delle molecole di interesse.

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Dopo due ore di incubazione, sono state realizzate delle fotografie digitali delle aree rappresentative di ogni pozzetto ingrandite con una lente 360x. La CA-4 e la colchicina sono state utilizzate come controllo positivo (Ty *et al.*, 2010; Ty *et al.*, 2008).

Gli effetti di una molecola sulla morfologia delle cellule impiegate sono espressi indicando la più bassa concentrazione (µM) alla quale si osserva un'alterazione della morfologia cellulare, più precisamente un arrotondamento delle cellule in confronto al controllo. A concentrazioni superiori a 100 µM la molecola è considerata essere inattiva.

5.2.3 Inibizione della polimerizzazione della tubulina

La capacità delle molecole di inibire la polimerizzazione della tubulina è stata valutata utilizzando il colorante fluorescente DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) (Bonne *et al.*, 1985), impiegando la procedura descritta da Barron (Barron *et al.*, 2003) e da Bane e collaboratori (Bane *et al.*, 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.

Bane e collaboratori hanno adattato la procedura precedentemente descritta da Barron nel 2003, elaborando un protocollo per la valutazione *in vitro* dell'attività biologica di inibitori e promotori della formazione dei microtubuli che richiede l'impiego di micropiastre da 96 pozzetti e di un lettore a fluorescenza.

Per la realizzazione del test, 1 mg/ml di tubulina (97% purezza) in PME buffer (100 mM PIPES (1,4-piperazinebis(ethanesulfonic acid)); 1 mM MgSO₄; 2 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid)) è posto in ogni pozzetto di una micropiastra da 96 well in presenza di 10 µM DAPI e diverse concentrazioni delle molecole da testare. La colchicina è stata impiegata come controllo positivo.

Dopo un periodo di incubazione di 45 minuti a temperatura ambiente, 5 µl di GTP sono aggiunti ad ogni pozzetto, in modo da promuovere la polimerizzazione della tubulina, e le micropiastre sono incubate a 37 °C per due ore.

La fluorescenza è letta ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 360 nm ed una di emissione di 450 nm.

Il valore di IC₅₀ per ogni composto, la concentrazione che determina l'inibizione del 50 % della polimerizzazione della tubulina, è stata calcolata relazionando la percentuale di inibizione osservata alla concentrazione impiegata attraverso una curva di regressione non lineare.

5.3 Risultati e discussione

5.3.1 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=H

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, che è stata concepita come modello sperimentale. Questi composti non hanno mostrato un'attività biologica significativa, tuttavia la realizzazione di questa prima serie di molecole è stata fondamentale, poiché ha consentito di mettere a punto i percorsi di sintesi adeguati per la realizzazione di analoghi più complessi.

Per quanto concerne la valutazione dell'attività antiproliferativa *in vitro*, in uno *screening* iniziale le molecole sono state testate sulla linea cellulare B16. Come evidenziato nella tabella 1 e nella figura 4, solo le molecole **31a** e **31b** hanno mostrato possedere una certa attività citotossica, con valori di IC₅₀ pari, rispettivamente, a 53,8 e 50,2 µM. Per le altre molecole, invece, non è stata evidenziata attività antiproliferativa.

Tabella 1 – Attività antiproliferativa dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=H sulla linea cellulare B16.

Prodotto	IC ₅₀ (µM)	SEM ^a
31a	53,8	0,7057
31b	50,2	2,1213
30	>100	-
32	>100	-
CA-4	0,011	0,0078

^a Standard error of the mean

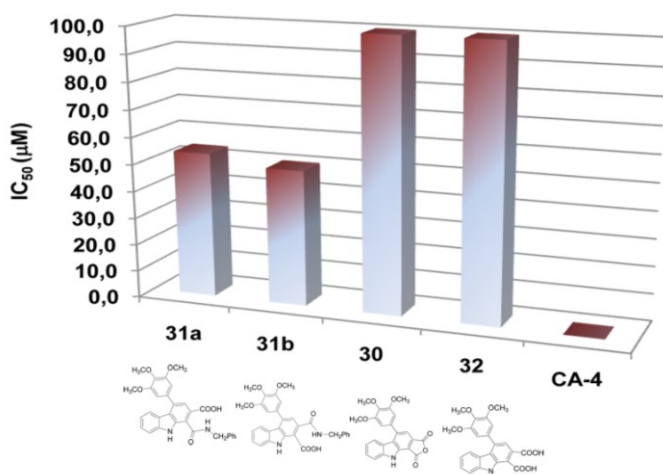


Figura 4 – Illustrazione dell'attività citotossica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=H sulla linea cellulare B16.

Si è proceduto successivamente alla valutazione degli effetti delle molecole della serie R=H sulla morfologia della linea cellulare endoteliale Ea.hy 926.

I trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli analizzati non hanno determinato effetti significativi sulla morfologia delle cellule endoteliali alla concentrazione più alta testata, di 100 µM (tabella 2).

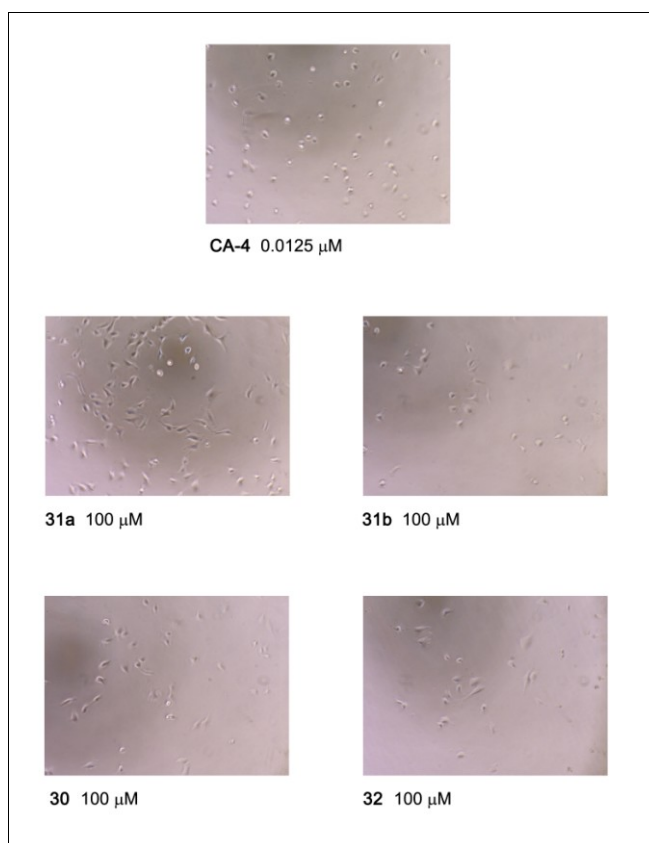
La figura 5 mostra la morfologia delle cellule dopo il trattamento con le molecole di interesse ed i cambiamenti indotti invece dalla combretastatina A-4, impiegata come controllo positivo.

Tabella 2 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli **31a-b**, **30** e **32** serie R=H.

Concentrazione	Effetto sulla morfologia delle cellule EA.hy 926			
	31a	31b	30	32
100 µM	-	-	-	-
50 µM	-	-	-	-
25 µM	-	-	-	-
12,5 µM	-	-	-	-
6,25 µM	-	-	-	-
3,12 µM	-	-	-	-
1,56 µM	-	-	-	-
0,78 µM	-	-	-	-

Tabella 3 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dalla combretastatina A-4.

Concentrazione	Effetto sulla morfologia delle cellule EA.hy 926 CA-4
0,05 μM	+
0,025 μM	+
0,0125 μM	+
0,0063 μM	+
0,0031 μM	+
0,0016 μM	-
0,0008 μM	-
0,0004 μM	-

Figura 5 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dalla CA-4 e dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli **31a-b**, **30** e **32** serie R=H (fotografie digitali delle aree rappresentative di ogni pozzetto ingrandite con una lente 360x).

5.3.2 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=OCH₃

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.

Per quanto concerne la valutazione degli effetti sulla morfologia della linea cellulare endoteliale Ea.hy 926, i trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli appartenenti alla seconda serie realizzata (R=OCH₃), hanno mostrato effetti significativi. In particolar modo, l'anidride maleica **38**, l'acido monocarbossilico **39a** e l'acido o-dicarbossilico **40** determinano un arrotondamento delle cellule a concentrazione pari a 50 µM (tabella 4, figura 6). Una buona attività è stata evidenziata per il tetraidrocarbazoletto **47**, ottenuto a partire dalla *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide, che ha determinato un'alterazione della morfologia delle cellule endoteliali ad una concentrazione pari a 1,56 µM. La combretastatina A-4 risulta essere attiva fino a concentrazioni di 0,0031 µM.

Tabella 4 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea'hy 926 indotti dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **38**, **39a**, **40** e **47** serie R=OCH₃.

Concentrazione	Effetto sulla morfologia delle cellule EA'hy 926			
	38	39a	40	47
100 µM	+	+	+	+
50 µM	+	+	+	+
25 µM	-	-	-	+
12,5 µM	-	-	-	+
6,25 µM	-	-	-	+
3,12 µM	-	-	-	+
1,56 µM	-	-	-	+
0,78 µM	-	-	-	-

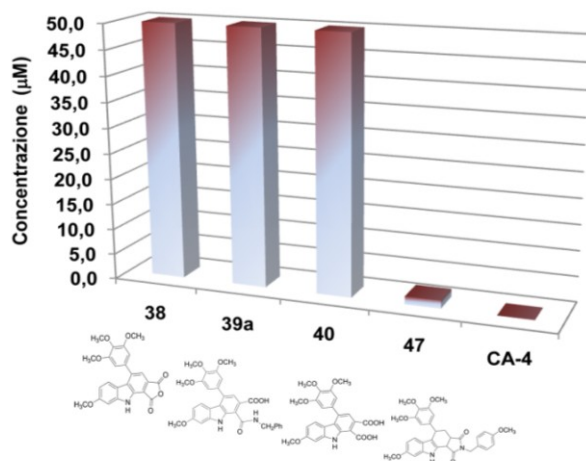


Figura 6 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **38**, **39a**, **40** e **47** serie R=OCH₃.

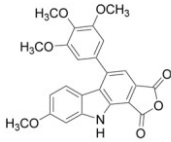
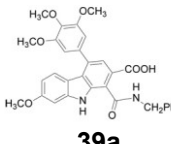
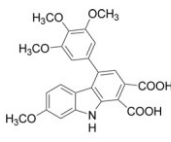
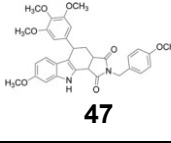
Questi composti, che hanno mostrato un'attività significativa per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali, sono stati sottoposti successivamente ad altri test. È stata valutata quindi la loro capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina impiegando la procedura precedentemente descritta.

La tabella 5 mostra i risultati ottenuti per questa serie di molecole. L'acido monocarbossilico **39a** ed il tetraidrocarbazolo sostituito **47** non hanno mostrato possedere attività significativa (valore di IC₅₀ superiore a 30 µM). Alla più alta concentrazione testata, 30 µM, le due molecole hanno determinato tuttavia un'inibizione, rispettivamente, del 44% e del 48%.

Una buona attività è stata evidenziata invece per l'anidride maleica sostituita **38**, con un valore di IC₅₀ pari a 2,09 µM.

Ottima attività è stata mostrata dall'acido dicarbossilico **40**, con un valore di IC₅₀ di 0,83 µM. Questo risultato è estremamente significativo se paragonato all'attività *in vitro* esibita dal composto di riferimento, la combretastatina A-4, per la quale è stata evidenziato un valore di IC₅₀ pari a 1,2 µM.

Tabella 5 – Inibizione della polimerizzazione della tubulina indotta dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **38**, **39a**, **40** e **47** serie R=OCH₃.

Prodotto	ITP ^a (IC ₅₀ μM)	% inibizione a 30 μM
 <p>38</p>	2,09 μM	-
 <p>39a</p>	>30 μM	44%
 <p>40</p>	0,83 μM	-
 <p>47</p>	>30 μM	48%
Colchicina	1,8 μM ^b	
Combretastatina A-4	1,2 μM ^c	

^a ITP, Inhibition of tubulin polymerization. ^b Il valore di IC₅₀ (colchicina) varia da 1.8 a 6.7 μM in esperimenti diversi in base alla concentrazione di tubulina impiegata (Ty *et al.* 2008). ^c Valore di IC₅₀ da Hall *et al.* (2008); Kaffy *et al.* (2005); Kaffy *et al.* (2006); Pinney *et al.* (2000); Pettit *et al.* (2000).

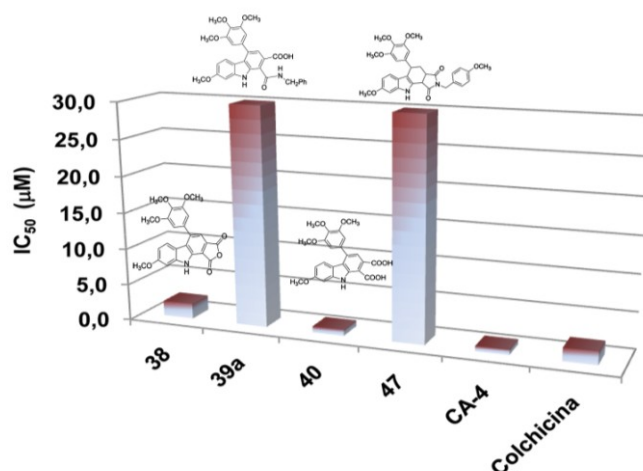


Figura 7 – Capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina mostrata dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **38**, **39a**, **40** e **47** serie R=OCH₃.

5.3.3 Attività biologica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=Br

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.

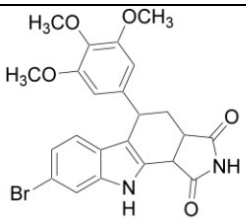
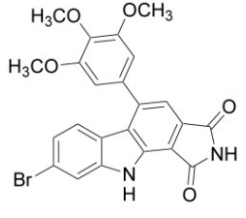
Gli effetti antiproliferativi delle due molecole sintetizzate sono state testate, in uno *screening* iniziale, sulla linea cellulare B16. La tabella 6 e la figura 8 mostrano i risultati ottenuti. Il carbazolo **60** ha mostrato una buona attività citotossica, con un valore di IC₅₀ pari a 2,09 µM.

Un'ottima attività è stata evidenziata per il tetraidrocarbazolo **59**, con un valore di IC₅₀ pari a 0,4 µM, ottimo risultato se paragonato al valore di inibizione della CA-4 (IC₅₀=0,011 µM).

Si è proceduto successivamente alla valutazione degli effetti delle molecole sulla morfologia della linea cellulare endoteliale Ea.hy 926.

Per il trimetossifenil-pirroloindolocarbazolo **60** la concentrazione limite di arrotondamento (la più bassa concentrazione alla quale è stato possibile osservare un arrotondamento delle cellule) corrisponde ad una concentrazione di 1 µM (tabella 7). Anche in questi esperimenti la maggiore attività è stata osservata per il tetraidrocarbazolo corrispondente **59**, che è in grado di alterare la morfologia delle cellule ad una concentrazione di 0,125 µM.

Tabella 6 – Attività antiproliferativa dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=Br sulla linea cellulare B16.

Prodotto	IC ₅₀ (μM)
 <p>59</p>	0,4
 <p>60</p>	2,09
CA-4	0,011

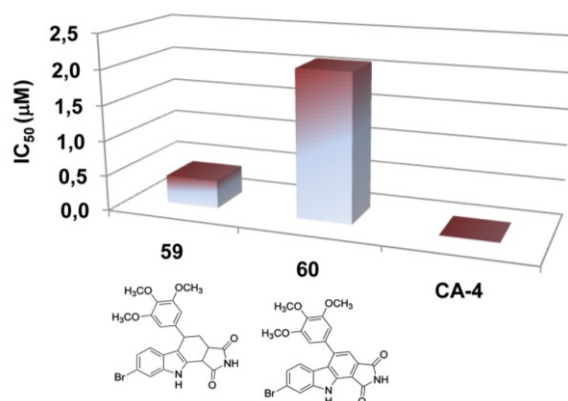


Figura 8 – Illustrazione dell'attività citotossica dei trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli serie R=Br sulla linea cellulare B16.

Tabella 7 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **59** e **60** serie R=Br.

Concentrazione	Effetto sulla morfologia delle cellule EA'hy 926	
	59	60
100 μ M	+	+
50 μ M	+	+
25 μ M	+	+
12,5 μ M	+	+
6,25 μ M	+	+
3,12 μ M	+	+
1,56 μ M	+	+
1 μ M	+	+
0,78 μ M	+	-
0,50 μ M	+	-
0,25 μ M	+	-
0,125 μ M	+	-

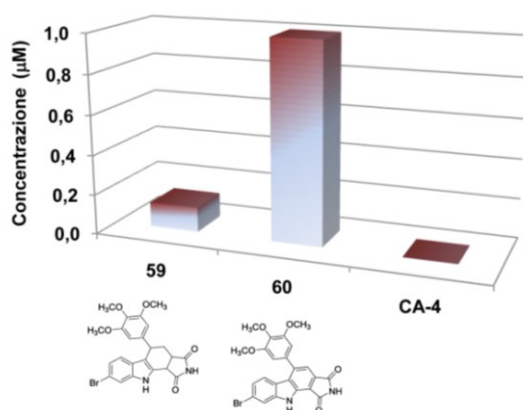


Figura 9 – Effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926 indotti dai trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli sostituiti **59** e **60** serie R=Br.

5.4 Conclusioni

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, che è stata concepita come modello sperimentale. La realizzazione di questa prima serie di molecole, sebbene

non caratterizzata da attività biologica degna di nota, è stata fondamentale, poiché ha consentito di mettere a punto percorsi di sintesi adeguati alla realizzazione di analoghi più complessi.

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

I risultati ottenuti hanno consentito 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, coerentemente a quanto da noi ipotizzato sulla base delle relazioni-struttura attività note. Queste molecole hanno mostrato risultati promettenti, infatti, sia per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali, sia per quanto riguarda l'attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina.

Per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926, le molecole appartenenti alla serie OCH₃ hanno mostrato attività degna di nota. La presenza quindi di un metossile in posizione 7 dell'acido monocarbossilico (molecola **39a**) e dell'acido *o*-dicarbossilico (molecola **40**) ed in posizione 8 dell'anidride maleica **38** e del tetraidrocarbazolo **47** aumenta pertanto l'attività biologica della molecola. Questa relazione è conforme alle relazioni struttura-attività note per la combretastatina A-4. Il metossile in posizione 4 sull'anello benzenico B della CA-4 è ritenuto essere infatti fondamentale per l'attività biologica della molecola.

Le molecole **38**, **39a** e **40**, a differenza degli analoghi corrispondenti della serie R=H, si sono rivelati in grado di alterare la morfologia delle cellule endoteliali a concentrazione pari a 50 µM. Eccellente attività è stata dimostrata per il prodotto **47**, un nuovo tetraidrocarbazolo con un sostituente 4-metossibenzilico sull'anello della maleimide, ottenuto da una reazione *one pot* effettuata a partire dalla *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide, dal 6-metossindolo e dal 3,4,5-trimetossiacetofenone. Il prodotto è in grado di determinare un arrotondamento delle cellule endoteliali ad una concentrazione di 1,56 µM.

Per quanto concerne la valutazione della capacità delle molecole di inibire la polimerizzazione della tubulina, i derivati della serie (R=OCH₃) hanno mostrato eccellenti risultati *in vitro*. Le molecole meno attive, l'acido monocarbossilico **39a** ed il tetraidrocarbazolo **47** (il più attivo per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule Ea.hy 926) determinano una percentuale di inibizione, rispettivamente, del 44% e del 48% alla concentrazione più alta testata, 30 µM.

La presenza di un anello lattionico aumenta notevolmente l'attività inibitoria nei confronti della formazione dei microtubuli, come evidenziato dai risultati ottenuti per l'anidride maleica sostituita **38**, che mostra un valore di IC₅₀ di 2,09 µM.

Un'eccellente attività è stata dimostrata per l'acido *o*-dicarbossilico **40**, con valore di IC₅₀ di 0,83 µM. L'apertura dell'anello della maleimide e la presenza di due gruppi carbossilici determina dunque un incremento dell'attività biologica. Questo risultato è estremamente significativo se paragonato all'attività *in vitro* esibita dal composto di riferimento, la combretastatina A-4, per la quale è stata evidenziato un valore di IC₅₀ pari a 1,2 µM.

In conclusione, i percorsi di sintesi da noi progettati hanno consentito la realizzazione di una serie di molecole sostituite (serie R=OCH₃), per le quali è stata evidenziata una notevole attività biologica *in vitro*, coerentemente a quanto ipotizzato sulla base delle relazioni-struttura attività note. Queste molecole hanno mostrato risultati promettenti, infatti, sia per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle

cellule endoteliali, sia per quanto riguarda l'attività inibitoria sulla polimerizzazione della tubulina.

Sono state sintetizzate, infine, nuove molecole ottenute a partire dal 6-bromoindolo (serie Br), per le quali è stato possibile evidenziare un'ottima attività biologica *in vitro*.

Questi ultimi analoghi hanno mostrato un'ottima attività antiproliferativa sulla linea cellulare B16, con valori di IC_{50} pari a 2,09 μ M per il trimetossifenil-pirroloindolocarbazolo **60**, e di 0,4 μ M per il tetraidrocarbazolo **59**.

Per quanto concerne gli effetti sulle cellule endoteliali, le molecole sostituite in posizione 8 della serie R=Br, hanno mostrato un'attività superiore a quella osservata per la serie R=OMe.

Per il trimetossifenil-pirroloindolocarbazolo **60** la concentrazione limite di arrotondamento (la più bassa concentrazione alla quale è stato possibile osservare un arrotondamento delle cellule) corrisponde ad una concentrazione di 1 μ M. Anche in questi esperimenti la maggiore attività è stata osservata per il tetraidrocarbazolo corrispondente **59**, che è in grado di alterare la morfologia delle cellule ad una concentrazione di 0,125 μ M.

La presenza di un atomo di bromo in posizione 8 determina quindi una buona attività antiproliferativa, ed un'ottima attività sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926.

CAPITOLO 6

Parte Sperimentale III

Sintesi e valutazione dell'attività biologica di nuovi diindolilmetani

6.1 Sintesi di diindolilmetani

Durante l'ultima parte del lavoro sperimentale, l'attività di ricerca è stata dedicata alla sintesi di nuovi diindolilmetani. Queste molecole ed i loro derivati costituiscono un'importante classe di composti eterociclici impiegati dall'industria farmaceutica (Ghorbani-Vaghei *et al.*).

Allo scopo di sintetizzare nuovi carbazoli che fossero caratterizzati da un minor ingombro sterico, la procedura *one pot* impiegata per la sintesi dei tetraidrocarbazoli descritti è stata applicata impiegando l'indolo ed il trimetossiacetofenone in combinazione con diversi prodotti di partenza (paragrafo 4.8). Queste reazioni non hanno condotto alla sintesi di nuovi carbazoli, ma è stato possibile, tuttavia osservare la formazione di un nuovo prodotto, il diindolilmetano **62**.

Con riferimento alla procedura *one pot* a tre componenti descritta nel capitolo precedente, una soluzione di indolo, 3,4,5-trimetossiacetofenone ed acido maleico in EtOH assoluto è posta sotto agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo 19 ore la reazione è terminata, ed il precipitato è recuperato per filtrazione con etanolo assoluto freddo.

Questa procedura ha condotto alla sintesi del diindolilmetano mostrato in figura 1 con una resa del 26%, ottenuto come solido bianco.

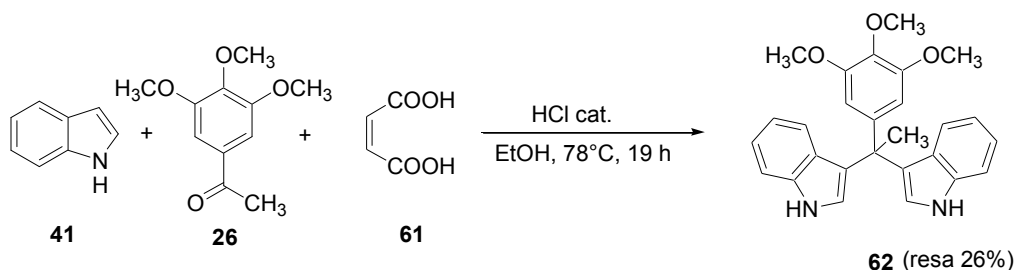


Figura 1 – Sintesi del diindolilmetano.

Per la formazione di questo composto è stato ipotizzato il meccanismo di reazione mostrato in figura 3.

L'indolo reagisce con il trimetossiacetofenone in presenza di acido cloridrico concentrato, determinando la formazione di un intermedio che non è convertito al 3-vinilindolo atteso mediante una reazione di eliminazione, ma reagisce preferenzialmente con una seconda molecola di indolo mediante una reazione di

sostituzione elettrofila in posizione 3 della seconda molecola di indolo, in modo da dare il diindolilmetano.

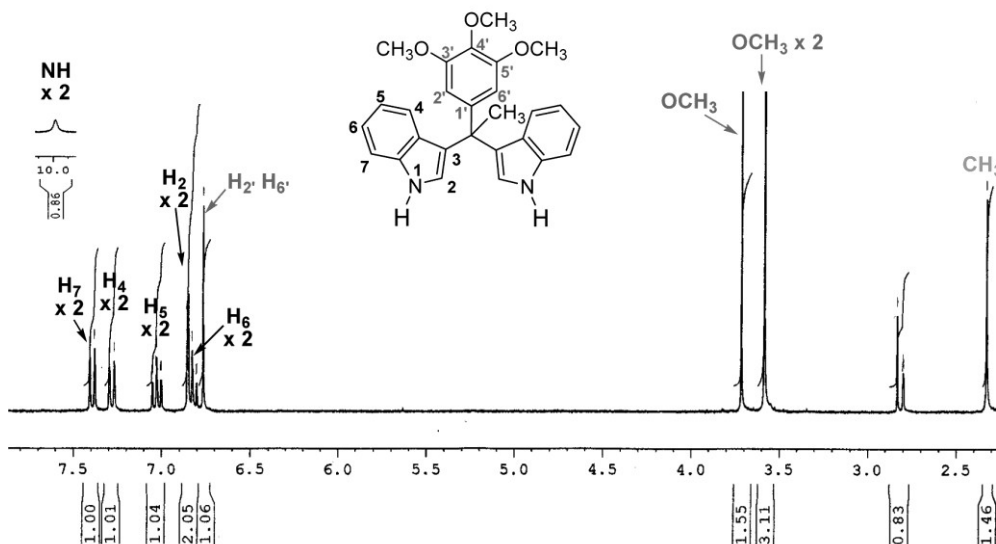


Figura 2– Spettro ^1H NMR del diindolilmetano **62** (acetone- d_6).

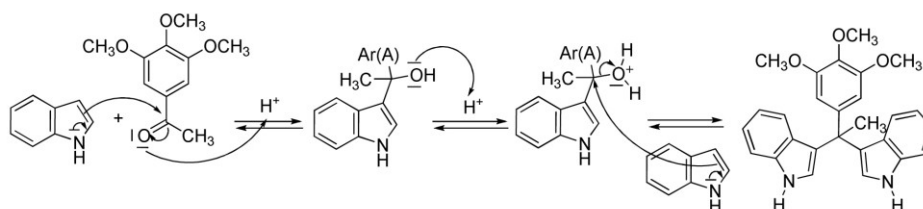


Figura 3 – Meccanismo di reazione ipotizzato per la formazione del diindolilmetano **62**.

La stessa procedura, realizzata a partire da una soluzione di indolo, trimetossiacetofenone e DMAD, ha consentito di ottenere lo stesso prodotto con una resa del 19% (figura 4).

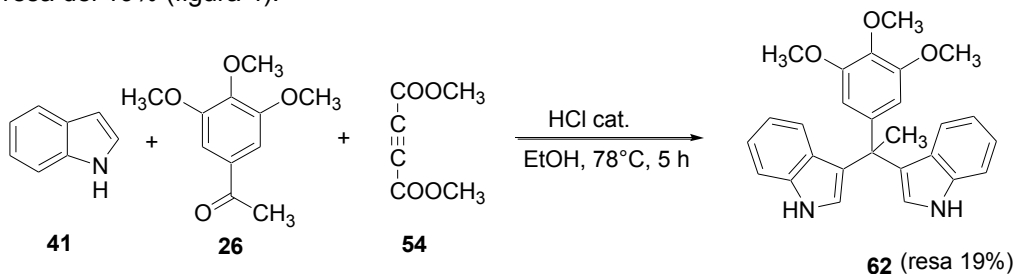


Figura 4 – Sintesi del diindolilmetano **62**.

Anche la sintesi realizzata a partire da una soluzione di indolo, trimetossiacetofenone ed anidride maleica ha consentito di ottenere lo stesso prodotto, seppure con una resa ben più bassa, del 3% (figura 5).

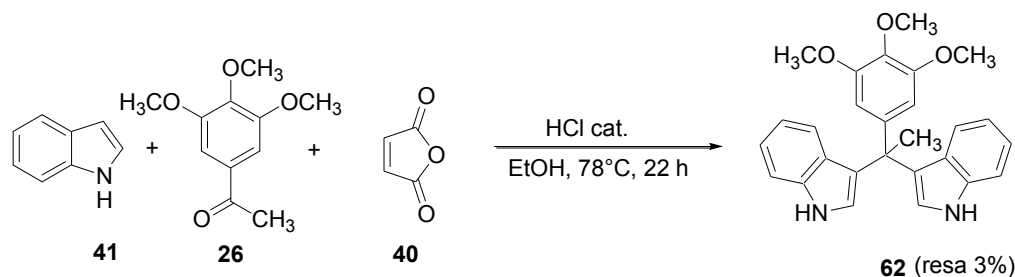


Figura 5 – Sintesi del diindolilmetano **62**.

Si è inteso dunque migliorare la strategia di sintesi del composto **62** utilizzando una procedura più opportuna, in modo da aumentare le rese di reazione.

La sintesi del composto desiderato è stata pertanto realizzata utilizzando la procedura descritta da Ghorbani-Vaghei e collaboratori (Ghorbani-Vaghei *et al.*). Una soluzione di indolo (2 mmol) e 3,4,5-trimetossiacetofenone (1 mmol) in presenza di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB, *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide, 5 mol%) e acido ossalico diidrato (CO₂H)₂·2H₂O (50 mol%) è posta sotto agitazione a temperatura ambiente in acqua. Dopo circa 7 ore la reazione è terminata ed il prodotto precipitato è filtrato ed ottenuto mediante ricristallizzazione da una soluzione EtOH/H₂O, con una resa del 62% (figura 6).

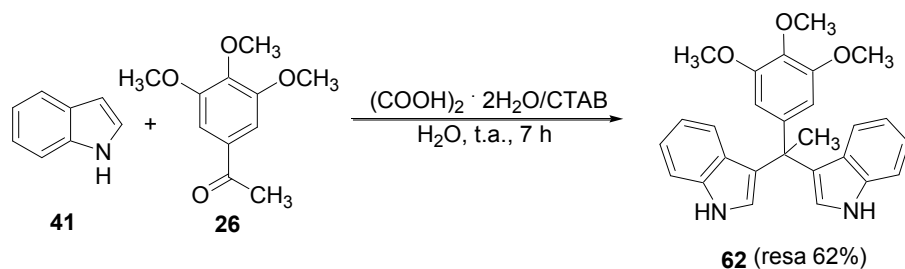


Figura 6 – Sintesi del diindolilmetano **62**.

6.2 Sintesi di diindolilmetani sostituiti

Nelle fasi successive si è inteso appurare se la procedura che ha consentito la sintesi del diindolilmetano descritto nel paragrafo precedente potesse essere applicata anche alla sintesi di diindolilmetani sostituiti.

A questo scopo, una soluzione di 6-metossindolo (impiegato in sostituzione dell'indolo semplice) e 3,4,5-trimetossiacetofenone in EtOH assoluto è posta sotto

agitazione alla temperatura di 78°C in presenza di quantità catalitiche di HCl, sotto argon. Dopo 22 ore la reazione è terminata. La miscela di reazione è purificata tramite colonna cromatografica, impiegando come fase mobile CH₂Cl₂.

La procedura consente di ottenere il diindolilmetano sostituito **63** con una resa del 9%.

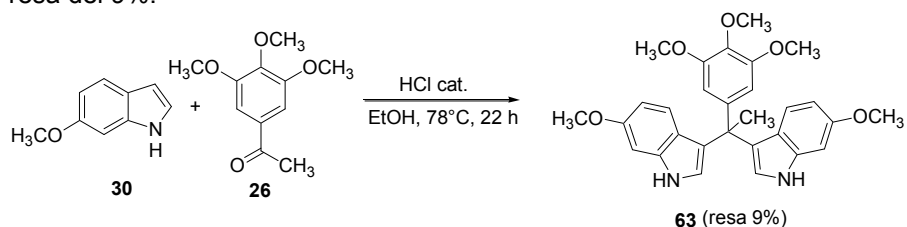


Figura 7 – Sintesi del diindolilmetano sostituito.

La sintesi del composto desiderato è stata dunque realizzata utilizzando la procedura descritta da Ghorbani-Vaghei e collaboratori. Una soluzione di 6-metossiindolo e 3,4,5-trimetossiacetofenone in presenza di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB, *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide) ed acido ossalico diidrato (CO₂H)₂·2H₂O è posta sotto agitazione a temperatura ambiente in acqua. Dopo circa 10 ore la reazione è terminata. La miscela di reazione è purificata tramite colonna cromatografica, impiegando come fase mobile CH₂Cl₂, ed il prodotto è ottenuto con una resa del 42% (figura 8).

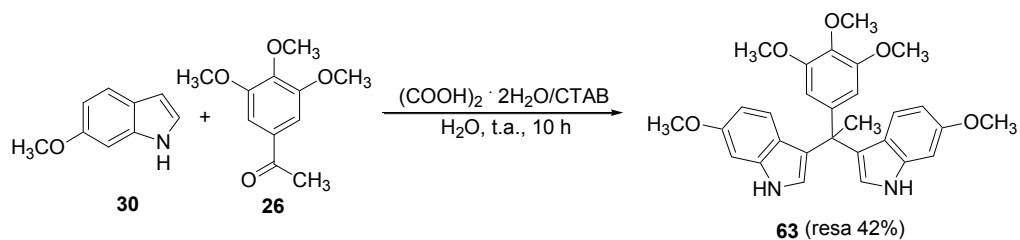
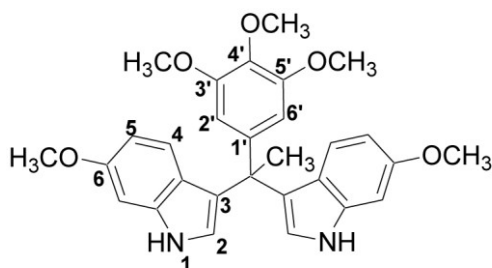


Figura 8 – Sintesi del diindolilmetano sostituito.

6.3 Parte sperimentale: 3-[1-(6-metossi-1*H*-indol-3-il)-1-(3',4',5'-trimetossifenil)etil]-6-metossi-1*H*-indolo



63

Una soluzione di 6-metossindolo (50 mg, 0.34 mmol) e 3,4,5-trimetossiacetofenone (35.7 mg, 0.17 mmol) in presenza di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB, *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide) (5 mol%) e acido ossalico diidrato (CO₂H)₂·2H₂O è posta sotto agitazione a temperatura ambiente in acqua. Dopo circa 10 ore la reazione è terminata. La miscela di reazione è purificata tramite colonna cromatografica, impiegando come fase mobile CH₂Cl₂. La procedura consente di ottenere il diindolilmetano sostituito come solido giallo (69 mg, resa 42%).

Formula bruta: C₂₉H₃₀N₂O₅

Peso molecolare: 486,56 g/mol

NMR: (dati confermati mediante analisi HSQC ed HMBC)

- ¹H (300 MHz, CDCl₃):** 1,62 (s, 3H, CH₃); 3,78 (s, 9H, ^{4'}OCH₃+ ^{3'-5'}OCH₃); 3,79 (s, 6H, ⁶OCH₃ x 2); 6,19 (s, 4H, H_{2'-6'} + H₂x2); 6,66 (dd, J_{5,4}=8,6 Hz, J_{5,7}=2,3 Hz, 2H, H₅ x 2); 6,81 (d, J_{7,5}=2,2 Hz, 2H, H₇ x2); 7,24 (d, J_{4,5}=8,6 Hz, 2H, H₄ x2); 7,85 (s, 2H, NH x 2).

6.4 Valutazione dell'attività biologica

6.4.1 Introduzione

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 (Chen *et al.*, 2001; Ghorbani-Vaghei *et al.*).

Il 3,3'-diindolilmetano (DIM, *diindolylmethane*) è il principale prodotto derivato dal metabolismo dell'indolo-3-carbinolo (I3C, *indole-3-carbinole*), un glucosinolato contenuto negli ortaggi della famiglia delle *Cruciferae*, quali broccoli, cavolo bianco e cavolfiore. Il DIM costituisce un promettente agente antitumorale (Hong *et al.*, 2002; Leong *et al.*, 2001).

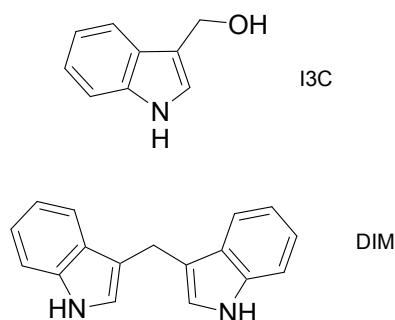


Figura 9 – Struttura dell'indolo-3-carbinolo (I3C) e del diindolilmetano (DIM).

I test *in vitro* atti a valutare l'attività biologica delle molecole ottenute sono stati realizzati presso la Facoltà di Farmacia e Scienze della Nutrizione e della Salute dell'Università della Calabria.

6.4.2 Attività antiproliferativa *in vitro*

L'attività antiproliferativa delle molecole è stata testata su diverse linee cellulari tumorali umane mediante il saggio *in vitro* MTT (Tubaro *et al.*, 1996).

Sono state impiegate, in particolare, due linee cellulari di tumore mammario umano, MCF-7 (*human breast cancer*, ormono-dipendente) ed SKBR3 (*human breast cancer*, ormono-indipendente), ed una linea di tumore prostatico LNCaP (*human prostatic adenocarcinoma*).

Per la realizzazione del test, le cellule sono state poste in coltura utilizzando diversi mezzi: il DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich S.p.A.), per la linea cellulare MCF-7, e l'RPMI 1640 per le linee cellulari LNCaP ed SKBR3. I mezzi sono stati addizionati del 10% di FBS (*fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich S.p.A.), l'1% di L-glutamina (Sigma-Aldrich S.p.A.), 1% di penicillina / streptomicina (Sigma-Aldrich S.p.A.). Le cellule sono state incubate alla temperatura di 37°C ed in presenza di 5% di CO₂.

Le cellule sono state poste in coltura in micropiastre da 24 pozzetti (100000 cellule per pozzetto in 500 μ l di mezzo). Dopo 24 ore sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 500 μ l di mezzo contenente i composti di interesse a diverse concentrazioni (*range* concentrazioni finali da 0,015 μ M a 100 μ M) e le piastre sono state incubate per 48 ore.

I pozzetti sono stati lavati con DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), e sono stati aggiunti 500 μ L di MTT (0,5 mg/ml in DPBS). Le micropiastre sono state poste ad incubare per 4 ore.

Successivamente l'MTT è stato rimosso, e sono stati aggiunti 500 μ L di DMSO per pozzetto. Dopo 30 minuti l'assorbanza è stata letta a 562 nm. L'intensità del colore formato nei pozzetti è un'indicazione del numero delle cellule.

Per ogni concentrazione e per il controllo sono state effettuate 4 repliche. Le cellule sopravvissute sono state misurate come percentuale di assorbanza in confronto al controllo, rappresentato dalle cellule in DMSO 0,5%. La percentuale di inibizione della vitalità cellulare è stata valutata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione MTT} = [1 - \text{assorbanza campione con estratto} / \text{assorbanza controllo senza estratto}] \times 100.$$

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando lo Student's t test. Le differenze sono state considerate significative a valori di $p \leq 0.05$. Le concentrazioni necessarie per inibire la crescita cellulare del 50%, cioè i valori di IC_{50} , sono state determinate relazionando la percentuale di inibizione ottenuta alla concentrazione impiegata attraverso una curva di regressione non lineare ottenuta utilizzando il Prism GraphPad® (programma statistico).

La molecola non sostituita **62**, su tutte le linee cellulari impiegate, non ha mostrato attività antiproliferativa alla più alta concentrazione testata (100 μ M).

Attività degna di nota è stata invece osservata per il diindolimetano **63** (tabella 1).

Tabella 1 – Attività antiproliferativa del diindolimetano **63** sulle linee cellulari LNCaP, SKBR3 ed MCF-7.

Linea cellulare	IC_{50} (μ M)	ER ^a	p
LNCaP	0,64	0,09	< 0,0000
SKBR3	9,6	1,36	< 0,0000
MCF-7	20,03	2,18	< 0,0002

^a Errore standard

La più bassa attività è stata riscontrata sulla linea di tumore mammario ormono-dipendente MCF-7, con un valore di IC_{50} pari a $20,03 \pm 2,18$ μ M.

Per la linea di tumore mammario SKBR3 (ormono-indipendente) è stato ottenuto un valore di IC_{50} pari a $9,6 \pm 1,36$ μ M.

Ottima attività è stata invece osservata nei confronti della linea cellulare di adenocarcinoma prostatico LNCaP, con un valore di IC_{50} pari a $0,64 \pm 0,09$ μ M.

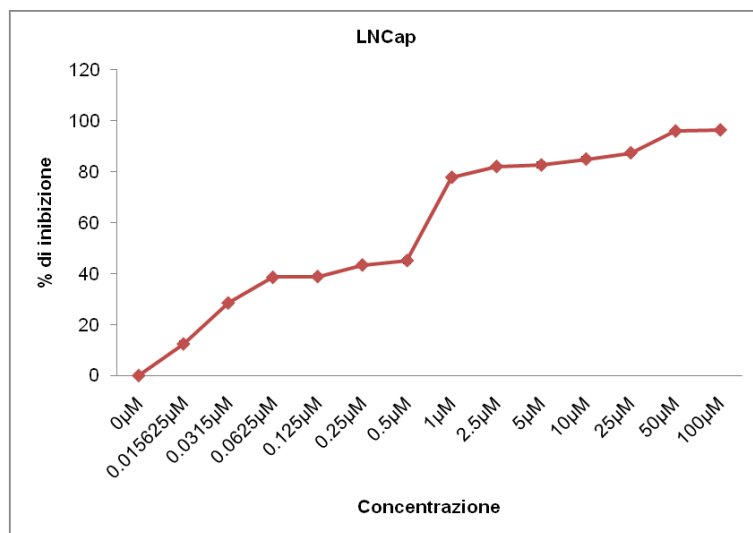


Figura 10 – Illustrazione dell'attività antiproliferativa del composto **63** sulla linea cellulare LNCaP.

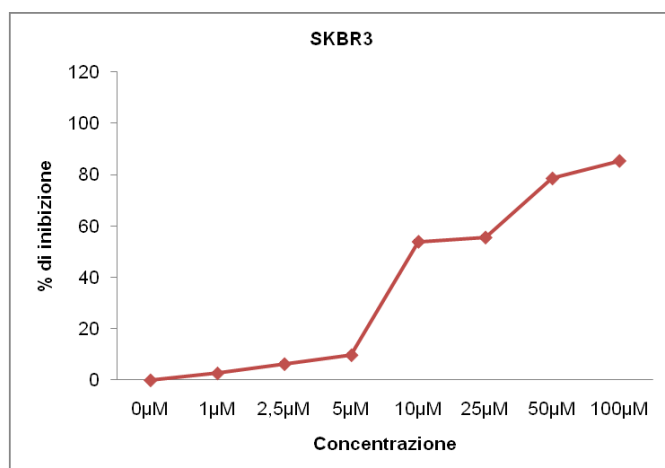


Figura 11 – Illustrazione dell'attività antiproliferativa del composto **63** sulla linea cellulare SKBR3.

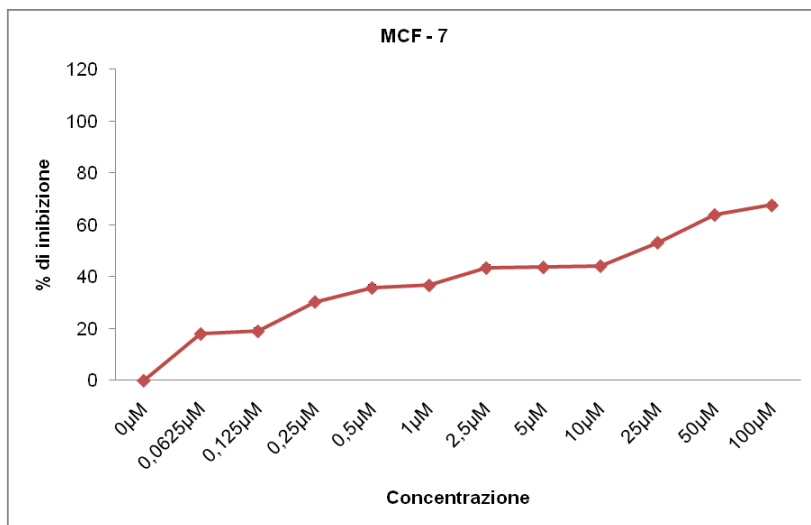


Figura 12 – Illustrazione dell'attività antiproliferativa del composto **63** sulla linea cellulare MCF-7.

6.4.3 Valutazione dell'apoptosi

In una seconda fase della valutazione dell'attività biologica si è inteso verificare se l'attività antiproliferativa mostrata dal composto **63** fosse correlata ad induzione di apoptosi.

L'apoptosi è stata valutata sulla linea cellulare tumorale prostatica LNCaP. Per la realizzazione del test, è stato impiegato il colorante Hoechst 33342 (Sigma).

Le cellule sono incubate per 24 ore in presenza ed in assenza del composto **63** (1 μM) e successivamente fissate con paraformaldeide 4% e colorate con Hoechst 33342 ad una concentrazione finale di 5 μg/ml (150 μM) per circa 20 minuti a temperatura ambiente (Montanaro *et al.*, 2005).

Successivamente, le cellule sono lavate con PBS (*Phosphate Buffered Saline*), ed osservate con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza (Olympus BX51).

Le cellule LNCaP trattate con il diindolilmetano **63** ad una concentrazione di 1 μM, hanno mostrato le alterazioni morfologiche caratteristiche dell'apoptosi dopo un periodo di incubazione di sole 24 ore in presenza del composto in esame in confronto al controllo (costituito dalle cellule non trattate).

6.5 Conclusioni

Nel tentativo di sintetizzare nuovi carbazoli che fossero caratterizzati da un minor ingombro sterico, la procedura *one pot* impiegata per la sintesi dei tetraidrocarbazoli descritti è stata applicata impiegando l'indolo ed il trimetossiacetofenone in combinazione con diversi prodotti di partenza. Queste reazioni hanno condotto alla sintesi di un nuovo prodotto, il diindolilmetano **62**.

L'ultima parte dell'attività di ricerca è stata dunque dedicata alla sintesi di nuovi diindolimetani, molecole presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle *Cruciferae*, note per la loro capacità di promuovere il metabolismo degli estrogeni e di indurre apoptosi in cellule tumorali umane, e che costituiscono una importante classe di composti eterociclici impiegati dall'industria farmaceutica (Ghorbani-Vaghei *et al.*).

La strategia di sintesi del composto **62** è stata migliorata utilizzando una procedura più opportuna, in modo da aumentare le rese di reazione. Nelle fasi successive si è inteso appurare se la procedura che ha consentito la sintesi di questo nuovo prodotto potesse essere applicata anche alla sintesi di diindolimetani sostituiti.

Le procedure impiegate hanno portato alla realizzazione di un nuovo diindolimetano sostituito (**63**), ottenuto con una resa del 42%.

L'ultima parte del lavoro di sintesi è stata dunque dedicata alla valutazione dell'attività biologica di queste molecole. È stata testata la loro attività antiproliferativa nei confronti di diverse linee cellulari tumorali umane. La molecola non sostituita **62**, non ha mostrato attività antiproliferativa alla più alta concentrazione testata (100 μM), mentre ottimi risultati sono stati osservati per il diindolimetano **63**.

La più bassa attività è stata riscontrata sulla linea di tumore mammario ormono-dipendente MCF-7, con un valore di IC_{50} pari a $20,03 \pm 2,18 \mu\text{M}$.

Per la linea di tumore mammario SKBR3 (ormono-indipendente) è stato ottenuto un valore di IC_{50} pari a $9,6 \pm 1,36 \mu\text{M}$.

Ottima attività è stata invece osservata nei confronti della linea cellulare di adenocarcinoma prostatico LNCaP, con un valore di IC_{50} pari a $0,64 \pm 0,09 \mu\text{M}$.

Le cellule LNCaP, trattate con il diindolimetano **63** ad una concentrazione di 1 μM , hanno mostrato le alterazioni morfologiche caratteristiche dell'apoptosi dopo un periodo di incubazione di sole 24 ore in presenza del composto in esame.

CONCLUSIONI

Obiettivo attuale della ricerca in campo oncologico è quello di trovare nuovi approcci terapeutici mirati, che comportino minori effetti collaterali rispetto alle terapie classiche.

I vasi sanguigni costituiscono un nuovo interessante *target* per le terapie antitumorali. E' possibile distinguere due metodiche terapeutiche differenti: l'approccio antiangiogenico, che mira a contrastare il processo di neovascolarizzazione, e quello antivascolare, finalizzato invece alla distruzione selettiva dei vasi sanguigni tumorali neoformati.

Una classe di composti che ha mostrato possedere effetti antivascolari è rappresentata dalle combretastatine. Il composto naturale combretastatina A-4 (CA-4), capostipite di questo gruppo di molecole, è un *cis*-stilbene isolato nel 1989 dall'arbusto sud-africano *Combretum caffrum* (Eckl. and Zeyh.) Kuntze (Combretaceae) da Pettit e collaboratori. Questo composto lega il sito di legame per la colchicina sulla subunità β della tubulina, ed inibisce la polimerizzazione della tubulina e quindi la formazione dei microtubuli.

In seguito alle potenziali applicazioni degli agenti antivascolari, nel corso degli ultimi anni sono stati sintetizzati molti nuovi analoghi, ed alcuni VDAs sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

In conformità e queste considerazioni ed alle nuove esigenze della ricerca scientifica, scopo del presente lavoro di tesi, 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, è stato quello di sintetizzare una serie di nuovi carbazoli concepiti come analoghi della CA-4 e di valutarne l'attività biologica *in vitro*.

Sono stati realizzati nuovi trimetossifenil-pirroloindolocarbazoli, ed è stata successivamente valutata la loro attività biologica. E' stata determinata la citotossicità dei composti, gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali EA.hy 926, e la loro capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina.

Il progetto di ricerca ha previsto inizialmente la sintesi di una prima serie di molecole realizzata a partire dall'indolo non sostituito, che è stata concepita come modello sperimentale. La realizzazione di questa prima serie di molecole, sebbene non caratterizzata da attività biologica degna di nota, è stata fondamentale, poiché ha consentito di mettere a punto percorsi di sintesi adeguati alla realizzazione di analoghi più complessi.

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

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

Per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926, le molecole appartenenti alla serie OCH₃ hanno mostrato attività degna di nota. La presenza quindi di un metossile in posizione 7 dell'acido monocarbossilico (molecola **39a**) e dell'acido *o*-dicarbossilico (molecola **40**) ed in posizione 8 dell'anidride maleica **38** e del tetraidrocarbazolo **47** aumenta pertanto l'attività biologica della molecola. Questa relazione è conforme alle relazioni struttura-attività note per la combretastatina A-4. Il metossile in posizione 4 sull'anello benzenico B della CA-4 è ritenuto essere infatti fondamentale per l'attività biologica della molecola.

Le molecole **38**, **39a** e **40**, a differenza degli analoghi corrispondenti della serie R=H, si sono rivelati in grado di alterare la morfologia delle cellule endoteliali a concentrazione pari a 50 µM. Eccellente attività è stata dimostrata per il prodotto **47**, un nuovo tetraidrocarbazolo con un sostituito 4-metossibenzilico sull'anello della maleimide, ottenuto da una reazione *one pot* effettuata a partire dalla *N*-(*p*-metossibenzil)maleimide, dal 6-metossindolo e dal 3,4,5-trimetossiacetofenone. Il prodotto è in grado di determinare un arrotondamento delle cellule endoteliali a concentrazione pari a 1,56 µM.

Per quanto concerne la valutazione della capacità delle molecole di inibire la polimerizzazione della tubulina, i derivati della serie (R=OCH₃) hanno mostrato eccellenti risultati *in vitro*. Le molecole meno attive, l'acido monocarbossilico **39a** ed il tetraidrocarbazolo **47** (il più attivo per quanto concerne gli effetti sulla morfologia delle cellule Ea.hy 926) determinano una percentuale di inibizione, rispettivamente, del 44% e del 48% alla concentrazione più alta testata, 30 µM.

La presenza di un anello lattonico aumenta notevolmente l'attività inibitoria nei confronti della formazione dei microtubuli, come evidenziato dai risultati ottenuti per l'anidride maleica sostituita **38**, che mostra un valore di IC₅₀ di 2,09 µM.

Un'eccellente attività è stata dimostrata per l'acido *o*-dicarbossilico **40**, con valore di IC₅₀ di 0,83 µM. L'apertura dell'anello della maleimide e la presenza di due gruppi carbossilici determina dunque un incremento dell'attività biologica. Questo risultato è estremamente significativo se paragonato all'attività *in vitro* esibita dal composto di riferimento, la combretastatina A-4, per la quale è stata evidenziato un valore di IC₅₀ pari a 1,2 µM.

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 tali 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.

Le molecole ottenute a partire dal 6-bromoindolo (serie R=Br) hanno mostrato un'ottima attività biologica *in vitro*.

Questi ultimi analoghi hanno mostrato un'ottima attività antiproliferativa sulla linea cellulare B16, con valori di IC₅₀ pari a 2,09 µM per il trimetossifenil-pirroloindolocarbazolo **60**, e di 0,4 µM per il tetraidrocarbazolo **59**.

Per quanto concerne gli effetti sulle cellule endoteliali, le molecole sostituite in posizione 8 della serie R=Br, hanno mostrato un'attività superiore a quella osservata per la serie R=OMe.

Per il trimetossifenil-pirroloindolocarbazolo **60** la più bassa concentrazione alla quale è stato possibile osservare un arrotondamento delle cellule corrisponde ad una concentrazione di 1 µM. Anche in questi esperimenti la maggiore attività è stata

osservata per il tetraidrocarbazolo corrispondente **59**, che è in grado di alterare la morfologia delle cellule ad una concentrazione di 0,125 μM .

La presenza di un atomo di bromo in posizione 8 determina quindi una buona attività antiproliferativa, ed un'ottima attività sulla morfologia delle cellule endoteliali Ea.hy 926.

Nel tentativo 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 l'indolo ed il trimetossiacetofenone in combinazione con diversi prodotti di partenza. Queste reazioni hanno condotto alla sintesi di un nuovo prodotto, il diindolimetano **62**.

L'ultima parte dell'attività di ricerca è stata dunque dedicata alla sintesi di nuovi diindolimetani, molecole presenti nelle piante appartenenti alla famiglia delle *Cruciferae*, note per la loro capacità di promuovere il metabolismo degli estrogeni e di indurre apoptosi in cellule tumorali umane, e che costituiscono un'importante classe di composti eterociclici impiegati dall'industria farmaceutica (Ghorbani-Vaghei *et al.*).

La strategia di sintesi del composto **62** è stata migliorata utilizzando una procedura più opportuna, in modo da aumentare le rese di reazione. Nelle fasi successive si è inteso appurare se la procedura che ha consentito la sintesi di questo nuovo prodotto potesse essere applicata anche alla sintesi di diindolimetani sostituiti.

Le procedure impiegate hanno portato alla realizzazione di un nuovo diindolimetano sostituito (**63**), ottenuto con una resa del 42%.

L'ultima parte del lavoro di sintesi è stata dunque dedicata alla valutazione dell'attività biologica di queste molecole. È stata testata la loro attività antiproliferativa nei confronti di diverse linee cellulari tumorali umane. La molecola non sostituita **62**, non ha mostrato attività antiproliferativa alla più alta concentrazione testata (100 μM), mentre ottimi risultati sono stati osservati per il diindolimetano **63**.

La più bassa attività è stata riscontrata sulla linea di tumore mammario ormono-dipendente MCF-7, con un valore di IC_{50} pari a $20,03 \pm 2,18 \mu\text{M}$.

Per la linea di tumore mammario SKBR3 (ormono-indipendente) è stato ottenuto un valore di IC_{50} pari a $9,6 \pm 1,36 \mu\text{M}$.

Ottima attività è stata invece osservata nei confronti della linea cellulare di adenocarcinoma prostatico LNCaP, con un valore di IC_{50} pari a $0,64 \pm 0,09 \mu\text{M}$.

Le cellule LNCaP, trattate con il diindolimetano **63** ad una concentrazione di 1 μM , hanno mostrato le alterazioni morfologiche caratteristiche dell'apoptosi dopo un periodo di incubazione di sole 24 ore in presenza del composto in esame.

ABBREVIAZIONI

A549	<i>human lung adenocarcinoma cell line</i>
B16	<i>murine melanoma cell line</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CA-4	<i>combretastatina A-4</i>
CA4P	<i>combretastatina A-4 disodio fosfato</i>
CTAB	<i>N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DDQ	<i>2,3-dicloro-5,6-dicianobenzochinone</i>
DEAD	<i>diethyl azodiarboxylate</i>
DEAD-H ₂	<i>diethyl hydrazinedicarboxylate</i>
DIAD	<i>diisopropyl azodicarboxylate</i>
DLT	<i>dose limiting toxicity</i>
DIM	<i>diindolylmethane</i>
DMAD	<i>dimethyl acetylenedicarboxylate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMXAA	<i>5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
Ea'hy 926	<i>human endothelial cell line</i>
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>
EGTA	<i>ethylene glicol tetraacetic acid</i>
FAA	<i>flavone acetic acid</i>
GDP	<i>guanosina difosfato</i>
GTP	<i>guanosina 5'-trifosfato</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIFs	<i>hypoxia inducible transcription factors</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
I3C	<i>indole-3-carbinole</i>
IC ₅₀	<i>Median Inhibition Concentration</i>
ITP	<i>Inhibition of Tubulin Polymerization</i>
K _i	<i>Inhibition constant value</i>
LNCaP	<i>human prostatic adenocarcinoma</i>
MCF-7	<i>human breast cancer cell line</i>
MDAs	<i>microtubule-targeted agents</i>
MDR	<i>multidrug resistant cancer cell lines</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MTD	<i>maximum tolerated dose</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PIPES	<i>1,4-piperazinebis(ethanesulfonic acid)</i>
SAR	<i>structure.activity relationships</i>
SKBR3	<i>human breast cancer cell line</i>
THF	<i>tetraidrofurano</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TPP	<i>triphenylphosphine</i>

Abbreviazioni

TPS-1	trombospondina 1
TPPO	<i>triphenylphosphine oxide</i>
VDAs	<i>vascular disrupting agents</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VTAs	<i>antivascular agents</i>
WSU-CLL	<i>lymphocytic leukemia cell line</i>

BIBLIOGRAFIA

Adams J, Elliott PJ **2000**. New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* **19(56)**: 6687-6692.

Bane SL, Ravindra R, Zaydman AA **2007**. High-throughput screening of microtubule-interacting drugs. *Methods Mol Med* **137**: 281-288.

Barron DM, Chatterjee SK, Ravindra R, Roof R, Baloglu E, Kingston DG, Bane S **2003**. A fluorescence-based high-throughput assay for antimicrotubule drugs. *Anal Biochem* **315(1)**: 49-56.

Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M **2008**. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal Research Reviews* **28(1)**: 155-183.

Bonne D, Heusele C, Simon C, Pantaloni D **1985**. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *J Biol Chem* **260(5)**: 2819-2825.

Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH **2001**. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* **4(2)**: 91-102.

Brown T, Holt H, Lee M **2006**. Synthesis of Biologically Active Heterocyclic Stilbene and Chalcone Analogs of Combretastatin. *Top Heterocycl Chem* **2006(2)**: 51.

But TY, Toy PH **2007**. The Mitsunobu reaction: origin, mechanism, improvements, and applications. *Chem Asian J* **2(11)**: 1340-1355.

Camacho-Davila AA **2008**. Kumada–Corriu Cross Coupling Route to the Anti-Cancer Agent Combretastatin A-4. *Synthetic Communications* **38(21)**: 11.

Cenciarelli C, Tanzarella C, Vitale I, Pisano C, Crateri P, Meschini S, Arancia G, Antoccia A **2008**. The tubulin-depolymerising agent combretastatin-4 induces ectopic aster assembly and mitotic catastrophe in lung cancer cells H460. *Apoptosis* **13(5)**: 659-669.

Chaplin DJ, Hill SA **2002**. The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54(5)**: 1491-1496.

Chaudhary A, Pandeya SN, Kumar P, Sharma PP, Gupta S, Soni N, Verma KK, Bhardwaj G **2007**. Combretastatin A-4 analogs as anticancer agents. *Mini Rev Med Chem* **7(12)**: 1186-1205.

Chen DZ, Qi M, Auburn KJ, Carter TH **2001**. Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *J Nutr* **131(12)**: 3294-3302.

Citrin D, Camphausen K, 2008. Advancement of antiangiogenic and vascular disrupting agents combined with radiation. *Radiation Oncology Advances*, Springer US, pp. 150-168.

Claise C, Chalas J, Edeas M, Abella A, Khalfoun Y, Laurent D, Lindenbaum A **1997**. Comparison of oxidized low-density lipoprotein toxicity on EA.hy 926 cells and human vein endothelial cells: Influence of antioxidant systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* **53(2)**: 156-161.

Curley OMS, McCormick JE, McElhinney RS, McMurry TBH **2003**. Intermediates in the Ing-Manske reaction. *Arkivoc* 180-189.

Davis PD, Tozer GM, Naylor MA, Thomson P, Lewis G, Hill SA **2002**. Enhancement of vascular targeting by inhibitors of nitric oxide synthase. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54(5)**: 1532-1536.

Dowlati A, Robertson K, Cooney M, Petros WP, Stratford M, Jesberger J, Rafie N, Overmoyer B, Makkar V, Stambler B, Taylor A, Waas J, Lewin JS, McCrae KR, Remick SC **2002**. A phase I pharmacokinetic and translational study of the novel vascular targeting agent combretastatin a-4 phosphate on a single-dose intravenous schedule in patients with advanced cancer. *Cancer Res* **62(12)**: 3408-3416.

Dupeyre G, Chabot GG, Thoret S, Cachet X, Seguin J, Guenard D, Tillequin F, Scherman D, Koch M, Michel S **2006**. Synthesis and biological evaluation of (3,4,5-trimethoxyphenyl)indol-3-ylmethane derivatives as potential antivascular agents. *Bioorg Med Chem* **14(13)**: 4410-4426.

Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB **1983**. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80(12)**: 3734-3737.

Galbraith SM, Chaplin DJ, Lee F, Stratford MRL, Locke RJ, Vojnovic B, Tozer GM **2001**. Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo. *Anticancer Research* **21(1A)**: 93-102.

Gardner MK, Hunt AJ, Goodson HV, Odde DJ **2008**. Microtubule assembly dynamics: new insights at the nanoscale. *Curr Opin Cell Biol* **20(1)**: 64-70.

Gaukroger K, Hadfield JA, Hepworth LA, Lawrence NJ, McGown AT **2001**. Novel syntheses of cis and trans isomers of combretastatin A-4. *J Org Chem* **66(24)**: 8135-8138.

Gaya A, Daley F, Taylor NJ, Tozer G, Qureshi U, Padhani A, Pedley RB, Begent R, Wellsted D, Stirling JJ, Rustin G **2008**. Relationship between human tumour angiogenic profile and combretastatin-induced vascular shutdown: an exploratory study. *Br J Cancer* **99(2)**: 321-326.

Ghorbani-Vaghei R, Veisi H, Keypour H, Dehghani-Firouzabadi AAA practical and efficient synthesis of bis(indolyl)methanes in water, and synthesis of di-, tri-, and

tetra(bis-indolyl)methanes under thermal conditions catalyzed by oxalic acid dihydrate. *Mol Divers* **14(1)**: 87-96.

Goossen LJ, Rodriguez N, Melzer B, Linder C, Deng G, Levy LM **2007**. Biaryl synthesis via Pd-catalyzed decarboxylative coupling of aromatic carboxylates with aryl halides. *J Am Chem Soc* **129(15)**: 4824-4833.

Griggs J, Hesketh R, Smith GA, Brindle KM, Metcalfe JC, Thomas GA, Williams ED **2001a**. Combretastatin-A4 disrupts neovascular development in non-neoplastic tissue. *Br J Cancer* **84(6)**: 832-835.

Griggs J, Metcalfe JC, Hesketh R **2001b**. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. *Lancet Oncol* **2(2)**: 82-87.

Griggs J, Skepper JN, Smith GA, Brindle KM, Metcalfe JC, Hesketh R **2002**. Inhibition of proliferative retinopathy by the anti-vascular agent combretastatin-A4. *Am J Pathol* **160(3)**: 1097-1103.

Hall JJ, Sriram M, Strecker TE, Tidmore JK, Jelinek CJ, Kumar GD, Hadimani MB, Pettit GR, Chaplin DJ, Trawick ML, Pinney KG **2008**. Design, synthesis, biochemical, and biological evaluation of nitrogen-containing trifluoro structural modifications of combretastatin A-4. *Bioorg Med Chem Lett* **18(18)**: 5146-5149.

Harrowven DC, Guy IL, Howell JC, Packham G **2006**. The Synthesis of a Combretastatin A-4 Based Library and Discovery of New Cooperative *ortho*-Effects in Wittig Reactions Leading to (Z)-Stilbenes. *Synlett* **2006(18)**: 4.

Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF **2002**. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **63(6)**: 1085-1097.

Howard J, Hyman AA **2003**. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422(6933)**: 753-758.

Imbert TF **1998**. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* **80(3)**: 207-222.

James C, Pettit GR, Nielsen OF, Jayakumar VS, Joe IH **2008**. Vibrational spectra and ab initio molecular orbital calculations of the novel anti-cancer drug combretastatin A-4 prodrug. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **70(5)**: 1208-1216.

Jelic S, Babovic N, Stamatovic L, Kreacic M, Matkovic S, Popov I **2001**. Vinblastin-carboplatin for metastatic cutaneous melanoma as first-line chemotherapy and in dacarbazine failures: a single-center study. *Med Oncol* **18(3)**: 189-195.

Jia ZJ, S. K, Olsson L, Anilkumar G, Fraser-Reid B **1999**. The Mitsunobu Reaction of Tetrachlorophthalimide. *Synlett* **1999(5)**: 565-566.

Johnson M, Younglove B, Lee L, LeBlanc R, Holt H, Hills P, Mackay H, Brown T, Mooberry SL, Lee M **2007**. Design, synthesis, and biological testing of

pyrazoline derivatives of combretastatin-A4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17(21)**: 5897-5901.

Jordan MA, Thrower D, Wilson L **1991**. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* **51(8)**: 2212-2222.

Kador PF, Blessing K, Randazzo J, Makita J, Wyman M **2007**. Evaluation of the vascular targeting agent combretastatin a-4 prodrug on retinal neovascularization in the galactose-fed dog. *J Ocul Pharmacol Ther* **23(2)**: 132-142.

Kaffy J, Pontikis R, Carrez D, Croisy A, Monneret C, Florent JC **2006**. Isoxazole-type derivatives related to combretastatin A-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14(12)**: 4067-4077.

Kaffy J, Pontikis R, Florent JC, Monneret C **2005**. Synthesis and biological evaluation of vinylogous combretastatin A-4 derivatives. *Org Biomol Chem* **3(14)**: 2657-2660.

Kanthou C, Tozer GM **2009**. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int J Exp Pathol* **90(3)**: 284-294.

Kerr DJ, Hamel E, Jung MK, Flynn BL **2007**. The concise synthesis of chalcone, indanone and indenone analogues of combretastatin A4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15(9)**: 3290-3298.

Kim Y, Nam NH, You YJ, Ahn BZ **2002**. Synthesis and cytotoxicity of 3,4-diaryl-2(5H)-furanones. *Bioorg Med Chem Lett* **12(4)**: 719-722.

Kirwan IG, Loadman PM, Swaine DJ, Anthoney DA, Pettit GR, Lippert JW, 3rd, Shnyder SD, Cooper PA, Bibby MC **2004**. Comparative preclinical pharmacokinetic and metabolic studies of the combretastatin prodrugs combretastatin A4 phosphate and A1 phosphate. *Clin Cancer Res* **10(4)**: 1446-1453.

Klocker J, Pont J, Schumer J, Pruger J, Kienzer H **1991**. Carboplatin, methotrexate and vinblastin (Carbo-MV) for advanced urothelial cancer. A phase II trial. *Am J Clin Oncol* **14(4)**: 328-330.

Kuo CC, Hsieh HP, Pan WY, Chen CP, Liou JP, Lee SJ, Chang YL, Chen LT, Chen CT, Chang JY **2004**. BPR0L075, a novel synthetic indole compound with antimetabolic activity in human cancer cells, exerts effective antitumoral activity in vivo. *Cancer Res* **64(13)**: 4621-4628.

Lara-Ochoa F., Espinosa-Pérez G **2007**. A new synthesis of combretastatins A-4 and AVE-8062A. *Tetrahedron Letters* **48(39)**: 4.

Lawrence NJ, Hepworth LA, Rennison D, McGown AT, Hadfield JA **2003**. Synthesis and anticancer activity of fluorinated analogues of combretastatin A-4. *Journal of Fluorine Chemistry* **123(1)**: 101-108.

Lee L, Davis R, Vanderham J, Hills P, Mackay H, Brown T, Mooberry SL, Lee M **2008**. 1,2,3,4-Tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin-A4. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43(9)**: 2011-2015.

Leong H, Firestone GL, Bjeldanes LF **2001**. Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor- α expression. *Carcinogenesis* **22(11)**: 1809-1817.

Liou JP, Chang YL, Kuo FM, Chang CW, Tseng HY, Wang CC, Yang YN, Chang JY, Lee SJ, Hsieh HP **2004**. Concise synthesis and structure-activity relationships of combretastatin A-4 analogues, 1-aryloindoles and 3-aryloindoles, as novel classes of potent antitubulin agents. *J Med Chem* **47(17)**: 4247-4257.

Martinez A, Alonso M, Castro A, Dorransoro I, Gelpi JL, Luque FJ, Perez C, Moreno FJ **2005**. SAR and 3D-QSAR studies on thiazolidinone derivatives: Exploration of structural requirements for glycogen synthase kinase 3 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **48(23)**: 7103-7112.

Mathews CK, van Holde KE, 1998. *Biochimica*. Casa Editrice Ambrosiana.

Maya AB, del Rey B, Lamamie de Clairac RP, Caballero E, Barasoain I, Andreu JM, Medarde M **2000**. Design, synthesis and cytotoxic activities of naphthyl analogues of combretastatin A-4. *Bioorg Med Chem Lett* **10(22)**: 2549-2551.

McCabe RW, Adams JM, Martin K **1985**. Clay- and zeolite-catalysed cyclic anhydride formation. *Journal of Chemical Research* **1985**: 356-357.

Mitsunobu O, Yamada M **1967**. Preparation of esters of carboxylic and phosphoric acid *via* quaternary phosphonium salts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **40(10)**: 2380-2382.

Montanaro D, Maggiolini M, Recchia AG, Sirianni R, Aquila S, Barzon L, Fallo F, Ando S, Pezzi V **2005**. Antiestrogens upregulate estrogen receptor beta expression and inhibit adrenocortical H295R cell proliferation. *J Mol Endocrinol* **35(2)**: 245-256.

Nam NH **2003**. Combretastatin A-4 analogues as antimitotic antitumor agents. *Curr Med Chem* **10(17)**: 1697-1722.

Nam NH, Kim Y, You YJ, Hong DH, Kim HM, Ahn BZ **2001**. Combretoxazolones: synthesis, cytotoxicity and antitumor activity. *Bioorg Med Chem Lett* **11(23)**: 3073-3076.

Nam NH, Kim Y, You YJ, Hong DH, Kim HM, Ahn BZ **2002**. Synthesis and anti-tumor activity of novel combretastatins: combretocyclopentenones and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **12(15)**: 1955-1958.

Niel E, Scherrmann JM **2006**. Colchicine today. *Joint Bone Spine* **73(6)**: 672-678.

Nogales E, Downing KH, 2008. Tubulin and microtubule structures. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology, Humana Press, pp. 211-225.

Nogales E, Wolf SG, Downing KH **1998**. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391(6663)**: 199-203.

Noland WE, Walhstrom MJ, Konkel MJ, Brigham ME, Trowbridge AG, Konkel LMC, Gourneau RP, Scholten CA, Lee NH, Condoluci JJ, Gac TS, Pour MM, Radford PM **1993**. *In situ* vinylindole synthesis. Diels-Alder reactions with maleimides to give tetrahydrocarbazoles. *J Heterocyclic Chem* **30**:11.

Noland WE, Xia GM, Gee KR, Konkel MJ, Walhstrom MJ, Condoluci JJ, Rieger DL **1996**. *In situ* vinylindole synthesis. Diels-Alder reactions with maleic anhydride and maleic acid to give tetrahydrocarbazoles and carbazoles. *Tetrahedron* **52**:18.

Odlo K, Hentzen J, dit Chabert JF, Ducki S, Gani OABSM, Sylte I, Skrede M, Florenes VA, Hansen TV **2008**. 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles as cis-restricted analogues of combretastatin A-4: Synthesis, molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16(9)**: 4829-4838.

Ohsumi K, Hatanaka T, Fujita K, Nakagawa R, Fukuda Y, Nihei Y, Suga Y, Morinaga Y, Akiyama Y, Tsuji T **1998**. Syntheses and antitumor activity of cis-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **8(22)**: 3153-3158.

Pettit GR, Grealish MP, Herald DL, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK **2000**. Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug. *J Med Chem* **43(14)**: 2731-2737.

Pettit GR, Minardi MD, Hogan F, Price PM **2010**. An efficient synthetic strategy for obtaining 4-methoxy carbon isotope labeled combretastatin A-4 phosphate and other Z-combretastatins. *J Nat Prod* **73(3)**: 399-403.

Pettit GR, Rhodes MR **1998**. Antineoplastic agents 389. New syntheses of the combretastatin A-4 prodrug. *Anticancer Drug Des* **13(3)**: 183-191.

Pettit GR, Singh SB, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK, Schmidt JM, Hogan F **1995**. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a). *J Med Chem* **38(10)**: 1666-1672.

Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, Garcia-Kendall D **1989**. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* **45(2)**: 209-211.

Photiou A, Shah P, Leong LK, Moss J, Retsas S **1997**. *In vitro* synergy of paclitaxel (Taxol) and vinorelbine (navelbine) against human melanoma cell lines. *Eur J Cancer* **33(3)**: 463-470.

Pinney KG, Mejia MP, Villalobos VM, Rosenquist BE, Pettit GR, Verdier-Pinard P, Hamel E **2000**. Synthesis and biological evaluation of aryl azide derivatives of combretastatin A-4 as molecular probes for tubulin. *Bioorg Med Chem* **8(10)**: 2417-2425.

Rappl C, Barbier P, Bourgarel-Rey V, Gregoire C, Gilli R, Carre M, Combes S, Finet JP, Peyrot V **2006**. Interaction of 4-arylcoumarin analogues of combretastatins with microtubule network of HBL100 cells and binding to tubulin. *Biochemistry* **45(30)**: 9210-9218.

Robinson JE, Taylor RJ **2007**. A Ramberg-Backlund route to the stilbenoid anti-cancer agents combretastatin A-4 and DMU-212. *Chem Commun (Camb)* **(16)**: 1617-1619.

Rustin GJ, Galbraith SM, Anderson H, Stratford M, Folkes LK, Sena L, Gumbrell L, Price PM **2003**. Phase I clinical trial of weekly combretastatin A4 phosphate: clinical and pharmacokinetic results. *J Clin Oncol* **21(15)**: 2815-2822.

Shults EE, Shakirov MM, Tolstikov GA, Kalinin VN, Schmidhammer G **2005**. Thebaine adducts with maleimides. Synthesis and transformations. *Russian Journal of Organic Chemistry* **41(8)**: 1132-1144.

Siemann DW, Chaplin DJ, Horsman MR **2004**. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. *Cancer* **100(12)**: 2491-2499.

Siemann DW, Mercer E, Lepler S, Rojiani AM **2002**. Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy. *Int J Cancer* **99(1)**: 1-6.

Simoni D, Romagnoli R, Baruchello R, Rondanin R, Grisolia G, Eleopra M, Rizzi M, Tolomeo M, Giannini G, Alloatti D, Castorina M, Marcellini M, Pisano C **2008**. Novel A-ring and B-ring modified combretastatin A-4 (CA-4) analogues endowed with interesting cytotoxic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **51(19)**: 6211-6215.

Singh R, Kaur H **2009**. Advances in Synthetic Approaches for the Preparation of Combretastatin-Based Anti-Cancer Agents. *Synthesis* **2009(15)**: 21.

Smaill JB, Lee HH, Palmer BD, Thompson AM, Squire CJ, Baker EN, Booth RJ, Kraker A, Hook K, Denny WA **2008**. Synthesis and structure-activity relationships of soluble 8-substituted 4-(2-chlorophenyl)-9-hydroxypyrrolo[3,4-c]carbazole-1,3(2H,6H)-diones as inhibitors of the Wee1 and Chk1 checkpoint kinases. *Bioorg Med Chem Lett* **18(3)**: 929-933.

Stevenson JP, Rosen M, Sun W, Gallagher M, Haller DG, Vaughn D, Giantonio B, Zimmer R, Petros WP, Stratford M, Chaplin D, Young SL, Schnall M, O'Dwyer PJ **2003**. Phase I trial of the antivascular agent combretastatin A4 phosphate on a 5-day schedule to patients with cancer: magnetic resonance imaging evidence for altered tumor blood flow. *J Clin Oncol* **21(23)**: 4428-4438.

Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC **2005**. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* **5(6)**: 423-435.

Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhirst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ **2001**. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res* **61(17)**: 6413-6422.

Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA **2006**. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J Med Chem* **49(11)**: 3033-3044.

Tubaro A, Florio C, Luxich E, Vertua R, DellaLoggia R, Yasumoto T **1996**. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon* **34(9)**: 965-974.

Ty N, Dupeyre G, Chabot GG, Seguin J, Quentin L, Chiaroni A, Tillequin F, Scherman D, Michel S, Cachet X **2010**. Structure-activity relationships of indole compounds derived from combretastatin A4: synthesis and biological screening of 5-phenylpyrrolo[3,4-a]carbazole-1,3-diones as potential antivascular agents. *Eur J Med Chem* **45(9)**: 3726-3739.

Ty N, Dupeyre G, Chabot GG, Seguin J, Tillequin F, Scherman D, Michel S, Cachet X **2008**. Synthesis and biological evaluation of new disubstituted analogues of 6-methoxy-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-1H-indole (BPR0L075), as potential antivascular agents. *Bioorg Med Chem* **16(15)**: 7494-7503.

van Heeckeren WJ, Bhakta S, Ortiz J, Duerk J, Cooney MM, Dowlati A, McCrae K, Remick SC **2006**. Promise of new vascular-disrupting agents balanced with cardiac toxicity: is it time for oncologists to get to know their cardiologists? *J Clin Oncol* **24(10)**: 1485-1488.

VanBuren V, Cassimeris L, Odde DJ **2005**. Mechanochemical model of microtubule structure and self-assembly kinetics. *Biophys J* **89(5)**: 2911-2926.

Wang L, Woods KW, Li Q, Barr KJ, McCroskey RW, Hannick SM, Gherke L, Credo RB, Hui YH, Marsh K, Warner R, Lee JY, Zielinski-Mozng N, Frost D, Rosenberg SH, Sham HL **2002**. Potent, orally active heterocycle-based combretastatin A-4 analogues: synthesis, structure-activity relationship, pharmacokinetics, and in vivo antitumor activity evaluation. *J Med Chem* **45(8)**: 1697-1711.

Watson DJ, Dowdy ED, Li W, Wang J, Polniaszek R **2001**. Electronic effects in the acid-promoted deprotection of *N*-2,4-dimethoxybenzyl maleimides. *Tetrahedron Letters* **42(10)**: 1827-1830.

West CM, Price P **2004**. Combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Drugs* **15(3)**: 179-187.

SITOGRAFIA

http://oxigene.com/pipeline/clinical_trials/

Ringraziamenti

Questi quattro anni sono stati per me di fondamentale importanza, non solo per tutto ciò che ho avuto modo di imparare ma, soprattutto, per il cammino che mi hanno indotto a percorrere, le scelte che, a volte, mi hanno costretto a fare ... e le circostanze e gli incontri fortunati ed inattesi che mi hanno regalato. Tengo in modo particolare a ringraziare tutte le meravigliose persone che, con la loro presenza, hanno costellato e reso prezioso questo percorso ...

Vorrei ringraziare il Prof. Giancarlo Statti, per essere stato il mio tutor, per la sua guida e per quanto ho potuto apprendere in questi anni. Con lui ringrazio la Dr.ssa Filomena Conforti, le cui competenze e la cui vicinanza sono state fondamentali per me, e per la realizzazione di questa tesi ...

... ma, ancor di più, ringrazio Giancarlo e Filomena, per l'affetto e la stima reciproca, per i bei momenti vissuti in questi anni di lavoro insieme, e per essere tra le persone sulla cui amicizia so di poter sempre contare ...

Vorrei esprimere tutta la mia riconoscenza al Prof. Francesco Menichini, Direttore del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università della Calabria, per avermi dato la possibilità di svolgere la mia tesi presso il Laboratorio di Fitofarmacia da lui diretto, per la sua gentilezza, per la quotidiana cordialità, e per aver rinnovato più volte, da tanti anni a questa parte, la sua ospitalità.

Je voudrais remercier le Pr. Sylvie Michel, pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse au sein du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris Descartes, pour sa gentillesse, et sa disponibilité.

Je remercie aussi le Dr Xavier Cachet, pour tous sa disponibilité, pour tous les choses que j'ai apprises sur la chimie et la synthèse... et pour sa grande patience.

Merci à le Pr. François Tillequin, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Pharmacognosie, et à le Pr. Marie José Foglietti, pour sa disponibilité et son aide.

Ringrazio in modo particolare la Prof. Antonietta Leone, per la sua infinita disponibilità e per aver saputo gestire in modo egregio tutte le problematiche legate alla realizzazione di una tesi in cotutela. La ringrazio, in particolar modo, per la vicinanza dimostratami nei momenti più difficili.

Ringrazio mia madre e mia sorella...per essermi state tanto vicine quando ero lontana... Fabrizio...per esserci... Francesco, per la sua gentilezza e per l'affetto che ha sempre dimostrato nei miei confronti, e tutto il resto della mia famiglia.

Grazie ad Asmà Ladjouzi e Clémence Moiron, due grandi amiche che sfortunatamente non posso avere vicino; grazie anche a Chloé Feltesse per la sua amicizia. Merci à Ludovic Donati, Missam El Mourabet, Christelle Lémus pour leur amitié. Merci aussi à Rana Putrus, Nancy Ty, Alicia Merve Dilmac, Mays Khazem, Enana Khoury, Constance, Nicolas, Lihn, Katerina.

Grazie a tutto il Laboratorio di Fitofarmacia dell'Università della Calabria.

Merci à tous les membres du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Paris Descartes.

*Per la realizzazione di questa tesi, un grazie particolare va a ...
... Fabrizio, per i grafici e le traduzioni nei momenti più duri, mamma, esperta di tabulazioni nei momenti difficili, e Manu, esperta di "jumbo mail" nei momenti cruciali!*

Tengo a dedicare queste pagine a mio nonno Peppino, la cui morte mi ha insegnato tanto sulla vita, perché è stata la sua improvvisa e prematura scomparsa a motivare il mio entusiasmo per la ricerca e a dare il via a questo percorso, che mi ha condotta qui, alla fine di questo lavoro di tesi.