



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTÀ DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZA DEL FARMACO"
XX CICLO 2004-2007**

Nuove molecole bioattive da organismi marini:
isolamento, caratterizzazione
chimica e farmacologica.

Tutor
Ch.ma Prof. ssa
Anna Aiello

Dott.ssa
Antonella Giordano

INDICE

Introduzione	pag. 1
1. Prodotti naturali di origine marina	pag. 4
1.1 Prodotti naturali marini ad attività antitumorale	pag. 9
1.1.1 <i>Kahalalide F</i>	pag. 11
1.1.2 <i>Didemmina B</i>	pag. 12
1.1.3 <i>Psammaphine</i>	pag. 14
1.1.4 <i>Ecteina</i> scidina-743	pag. 16
1.1.5 <i>Halicondrina B</i>	pag. 17
1.1.6 <i>Dolastatina 10</i>	pag. 19
1.1.7 <i>Dolastatina 15</i>	pag. 21
1.1.8 (+)- <i>Discodermolide</i>	pag. 22
1.1.9 <i>Briostatina 1</i>	pag. 23
1.1.10 <i>Diazonamide A</i>	pag. 24
1.1.11 <i>Eleuterobina</i>	pag. 25
2. Tecniche spettroscopiche	pag. 26
2.1 Spettrometria di massa	pag. 26
2.2 Risonanza magnetica nucleare	pag. 28
3. Tunicati.	pag. 33
3.1 Fisiologia dei cordati	pag. 36
3.2 Nutrizione e scambi gassosi	pag. 37
3.3 Riproduzione e sviluppo	pag. 38
4. Clavaminoli da <i>Clavelina phlegraea</i>	pag. 39
4.1 Amminoalcoli	pag. 39
4.2 <i>Clavelina phlegraea</i>	pag. 41
4.3 Nuovi clavaminoli isolati da <i>Clavelina phlegraea</i>	pag. 42
4.3.1 <i>Clavaminolo A</i>	pag. 44
4.3.2 <i>Clavaminolo B</i>	pag. 50
4.3.3 <i>Clavaminolo C</i>	pag. 52
4.3.4 <i>Clavaminolo D</i>	pag. 53
4.3.5 <i>Clavaminolo E</i>	pag. 54
4.3.6 <i>Clavaminolo F</i>	pag. 55
4.3.7 <i>Clavaminolo G</i>	pag. 56
4.3.8 <i>Clavaminolo H</i>	pag. 58
4.3.9 <i>Clavaminolo I</i>	pag. 61
4.3.10 <i>Clavaminolo L</i>	pag. 62
4.3.11 <i>Clavaminolo M</i>	pag. 63
4.3.12 <i>Clavaminolo N</i>	pag. 65
4.4 Attività biologica dei clavaminoli A-N	pag. 69
4.4.1 Saggio dell'uptake della calceina	pag. 69
4.4.2 Determinazione del ciclo cellulare e della frammentazione del DNA	pag. 70
4.4.3 Effetti dei clavaminoli B-N sulla vitalità cellulare	pag. 73
5. Polyzorritine isolate dalla <i>Polyandrocarpa zorritensis</i>	pag. 76
5.1 Metaboliti indolici e fenolici da ascidie	pag. 76
5.2 La <i>Polyandrocarpa zorritensis</i>	pag. 78
5.3 Isolamento delle polyzorritine A-C	pag. 80
6. Poriferi	pag. 90
7. Damipipecolina e damituricina da <i>Axinella damicornis</i>	pag. 93
7.1 Alcaloidi bromopirrolici da Poriferi	pag. 93

7.2	<i>Axinella damicornis</i>	pag. 99
7.3	Analisi chimica del campione di <i>A. damicornis</i>	pag. 100
7.3.1	<i>Damipipecolina da A. damicornis</i>	pag. 102
7.3.2	<i>Damituricina da A. damicornis</i>	pag. 108
7.4	Regolazione della trasmissione serotoninergica	pag. 113
7.5	Attività biologica della damipipecolina e della damituricina sui recettori serotoninergici	pag. 115
7.6	Effetti citotossici	pag. 120
7.7	Effetti della damipipecolina, della damituricina e della serotonina sui livelli di calcio nei neuroni primari	pag. 120
7.8	Effetti della damipipecolina, della damituricina e della serotonina sui livelli di Ca ²⁺ nelle cellule PC12 e HEK	pag. 122
7.9	Effetti della damituricina e dell'acido L-Glutammico sui livelli di Ca ²⁺ nei neuroni primari.	pag. 124
7.10	Effetti della damipipecolina, della damituricina e dell'acido <i>N</i> -metil-D-aspartico sui livelli di Ca ²⁺ nei neuroni primari	pag. 125
7.11	Effetti della damipipecolina e della serotonina sui livelli di calcio nelle cellule di spugne	pag. 126
8.	Parte sperimentale	pag. 128
8.1	Strumentazione	pag. 128
8.2	Procedure di estrazione e di isolamento dei clavaminoli A-N	pag. 128
8.2.1	<i>Preparazione del derivato dibenzoilato 44a.</i>	pag. 132
8.2.2	<i>Preparazione del derivato diacetilato 44b</i>	pag. 133
8.2.3	<i>Preparazione dell'idrolizzato HY-G (50a)</i>	pag. 134
8.2.4	<i>Preparazione dell'idrolizzato HY-H (51a)</i>	pag. 134
8.2.5	<i>Preparazione dell'idrolizzato HY-L (53a=44a)</i>	pag. 134
8.2.6	<i>Preparazione dell'idrolizzato HY-N (55a)</i>	pag. 134
8.2.7	<i>Preparazione del derivato tribenzoilato 51b</i>	pag. 135
8.2.8	<i>Colture cellulari</i>	pag. 135
8.2.9	<i>Saggio dell'uptake della calceina.</i>	pag. 136
8.2.10	<i>Analisi del ciclo cellulare e delle rotture del filamento di DNA</i>	pag. 136
8.3	Procedure di estrazione e di isolamento della damipipecolina e damituricina	pag. 137
8.3.1	<i>Idrolisi della damipipecolina</i>	pag. 138
8.3.2	<i>Idrolisi della damituricina</i>	pag. 139
8.3.3	<i>Linee cellulari</i>	pag. 139
8.3.4	<i>Saggi con MTT</i>	pag. 140
8.3.5	<i>Misura del Ca²⁺ nei neuroni primari nelle cellule PC12, HeLa e Hek</i>	pag. 140
8.4	Procedure di estrazione e di isolamento delle polyzorritine	pag. 142
9.	Dati spettroscopici	pag. 145

Introduzione

Preparati ottenuti da piante terrestri trovano impiego nel trattamento di diverse patologie umane fin dai tempi antichi. Nel 1800, i primi studi condotti sui metaboliti secondari ottenuti da organismi vegetali hanno dimostrato che la flora terrestre è una ricca risorsa di farmaci¹, utili nel trattamento di malattie letali come cancro (taxolo) e infezioni microbiche (penicilline). Tuttavia, a causa della resistenza sviluppata da alcuni agenti patogeni ai trattamenti farmacologici e della carenza di efficacia delle chemioterapie tradizionali, i ricercatori nel campo delle sostanze naturali hanno rapidamente rivolto la loro attenzione a nuove risorse di composti biologicamente attivi quali organismi animali e vegetali marini^{2,3}. Negli oceani vivono milioni di specie animali e vegetali diverse da quelle terrestri; l'ambiente marino, offrendo quindi una nuova frontiera di ricerca, ha attirato l'interesse di scienziati di diverse discipline come chimici organici, biochimici, farmacologi, biologi ed ecologi. Lo sviluppo delle tecniche SCUBA e più recentemente dei veicoli sommergibili ha consentito a partire dagli anni sessanta un rapido accesso sia agli organismi che vivono in superficie che a quelli che popolano le acque profonde, rendendoli disponibili alle analisi chimiche. Gli studi condotti hanno già largamente provato che l'habitat marino è una fonte straordinaria di nuovi metaboliti bioattivi.

Molti composti di origine marina sono strutturalmente complessi, sono caratterizzati da funzionalità uniche e possiedono spiccate attività biologiche. Ciò

¹ Sondheimer, E.; Sniegowski, J. B. *Chemical Ecology*, **1970**, Academic Press, New York.

² Frommann, S.; Jas, G. Business Briefing: *Future Drug Discover.* **2002**, 84-90

³ Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2000**, 9, 2783-2797.

è ascrivibile talvolta alle condizioni estreme dell'habitat, alla mancanza di luce, all'alta pressione, all'alta concentrazione ionica, a temperature variabili e alla poca disponibilità di cibo, oppure a spazi vitali ristretti. L'alta concentrazione di organismi coesistenti in un territorio limitato li rende molto competitivi e complessi. Gli organismi sviluppano una serie di adattamenti e comportamenti atti alla salvaguardia della specie quali strategie di difesa dalla predazione, dalla proliferazione di specie competitive ovvero soppressione delle prede mobili per ingestione⁴. Le strategie chimiche di una specie si avvalgono del ricco bagaglio di molecole del suo "metabolismo secondario" comprendente composti come terpeni, alcaloidi, polichetidi, peptidi, derivati dell'acido shikimico, glicosidi, steroidi e metaboliti originati da diverse vie biogenetiche. Inoltre, ed unica all'ambiente marino, è relativamente comune la presenza di atomi di alogeno, principalmente cloro e bromo, legati covalentemente allo scheletro molecolare, il che è probabilmente dovuto alla loro buona disponibilità nel mare⁵.

Poiché le condizioni degli oceani sono così marcatamente distinte, la chimica dei prodotti ottenuti dagli organismi marini è molto varia. Inoltre, mentre le risorse terrestri sono considerate esplorate dal punto di vista farmaceutico e biochimico, meno dell'1% delle specie marine esistenti sono state esaminate riguardo il loro potenziale farmacologico⁶.

Gli oceani rappresentano, quindi, una fonte ricca e non ancora sfruttata di composti biologicamente attivi, ma anche di nuove vie biochimiche ancora

⁴ D.H. Williams, M.J. Stone, P.R. Hauck, S.K. Rahman, *J Nat Prod*, **1989**, 52, 1189–208.

⁵ T. L. Simmons, E. Andrianasolo, K. McPhail, P. Flatt, and W. H. Gerwick, *Molecular Cancer Therapeutics*, **2005**, 4(2), 333.

⁶ Capon, R. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4, 633-645; Jaspars, M. *Chemistry and Industry*, **1999**, 2, 51-55; Wallace, R. W. *Mol. Med. Today*, **1997**, 3, 291-295.; Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52-60.

sconosciute in patogeni, che potrebbero essere mirate portando allo sviluppo di nuovi agenti terapeutici.

L'attività di ricerca svolta durante il mio triennio di dottorato si inserisce nel campo di studio dei metaboliti secondari di origine marina; gli studi condotti hanno permesso di acquisire informazioni sulla chimica di alcune specie di invertebrati marini a diverso livello evolutivo appartenenti ai *phyla* Chordata (subphylum Tunicata) e Porifera. In particolare, superando problemi connessi sia al reperimento del materiale biologico sia alla loro identificazione, l'indagine chimica è stata condotta sulle specie *Clavelina phlegraea*, *Polyandrocarpa zorritensis* e *Axinella damicornis*, specie di organismi dal metabolismo secondario molto promettente presenti nell'area mediterranea.

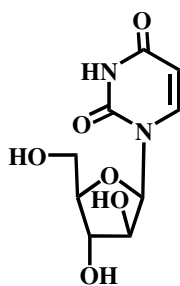
La disponibilità delle più moderne tecniche cromatografiche di isolamento e purificazione, l'impiego di metodiche di purificazione guidate da screening farmacologici, l'utilizzazione di numerose tecniche spettroscopiche per l'indagine strutturale, tra le quali va ricordata la spettroscopia di massa, ma soprattutto la risonanza magnetica nucleare (NMR), hanno permesso di isolare e caratterizzare diversi nuovi composti alcuni dei quali dotati di interessanti attività antitumorali. I risultati ottenuti sono stati oggetto di pubblicazioni su riviste con referee e di un brevetto internazionale.

1. Prodotti naturali di origine marina.

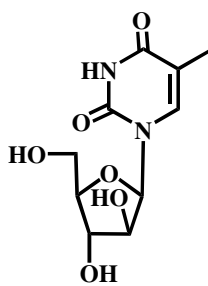
Un gran numero di molecole bioattive isolate da fonti marine sono state selezionate come candidate promettenti per estese valutazioni precliniche nel trattamento di diverse degenerazioni patologiche ed alcune di esse sono passate alla fase avanzata di studi clinici per la cura del cancro.

La maggior parte delle molecole naturali marine sono prodotte da invertebrati come spugne, coralli, ascidie e briozoi ed appartengono a diverse classi strutturali come polieterei, terpeni, alcaloidi, macrolidi, polipeptidi.⁷

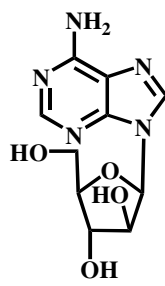
I primi agenti terapeutici di origine marina risalgono al 1950 quando Bergmann e Feeney isolarono i nucleosidi spongouridina (**1**) e spongotimidina (**2**) dalla spugna *Tethya cripta*.⁸ Il successivo sviluppo di analoghi sintetici ha fornito due composti di importante rilevanza clinica, l'arabinosil adenina (Ara-A, **3**), e l'arabinosil citosina (Ara-C, **4**), molecole anticancro per il trattamento della leucemia mielocitica acuta e del linfoma non-Hodgkin's.⁹



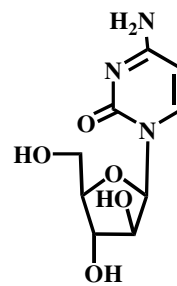
(1)



(2)



(3)



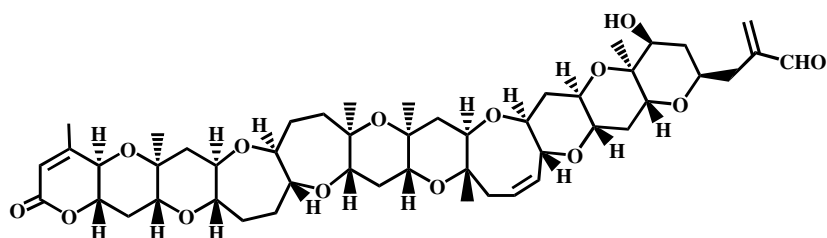
(4)

⁷ Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 1-6.

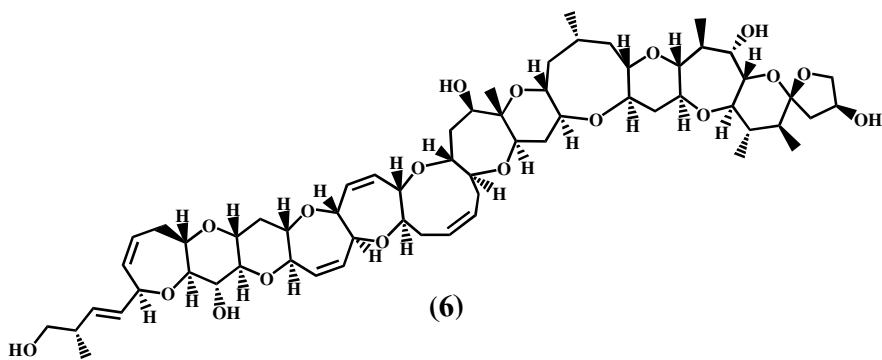
⁸ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.

⁹ Bodey, G. P.; Freirich, E. J.; Monto, R. W.; Hewlett, J. S. *Cancer Chemother.*, **1969**, *53*, 59-66.

Un'importante classe di macromolecole di origine marina, appartenente principalmente alla classe strutturale dei polieteri, costituisce un grande gruppo di tossine marine tra le quali si possono ricordare: la brevetossina (5), isolata dal dinoflagellato *Gymnodinium breve*¹⁰, la ciguatossina (6), un costituente tossico implicato nella ciguatera¹¹, la maitotossina (7) isolata dal *Gambierdiscus toxicus*^{12,13} e l'acido okadaico (8), un agente che causa diarrea, presente in frutti di mare infetti, prodotto da specie di dinoflagellati come *Prorocentrum lima* e *Dinophysis sp.*^{13,14}, infine la palitossina (9), un complesso polialcol isolato dallo zoantide *Palythoa toxicus*¹⁵.



(5)



(6)

¹⁰Lin, Y.-Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J.C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773-6775.

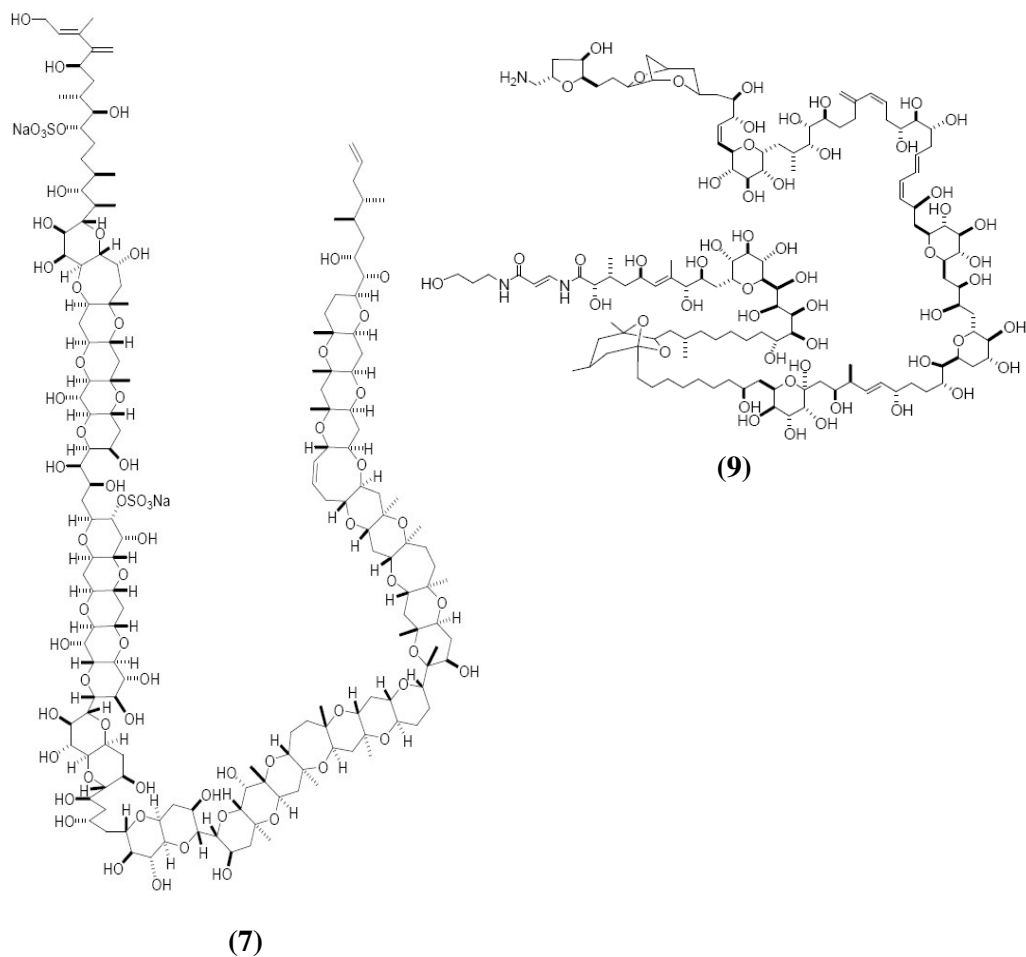
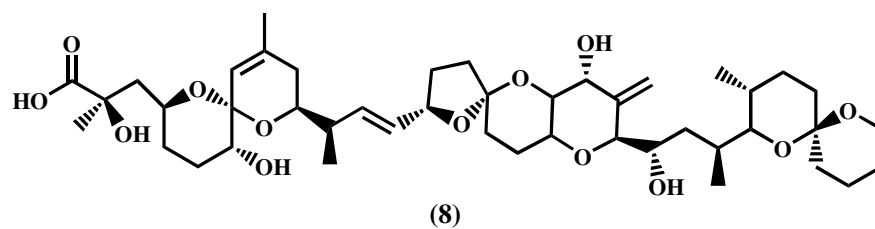
¹¹Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8927-8931.

¹²Murata, M.; Nakoi, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2060-2062.

¹³Norimura, T.; Sasaki, M.; Matsumori, N.; Miata, M.; Tachibana, K.; Yasumoto, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1675-1678.

¹⁴Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N. *Nippon Suisan Gakkaishi* **1980**, *46*, 1405-1411.

¹⁵Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Nippon Suisan Gakkaishi* **1982**, *48*, 69-72.

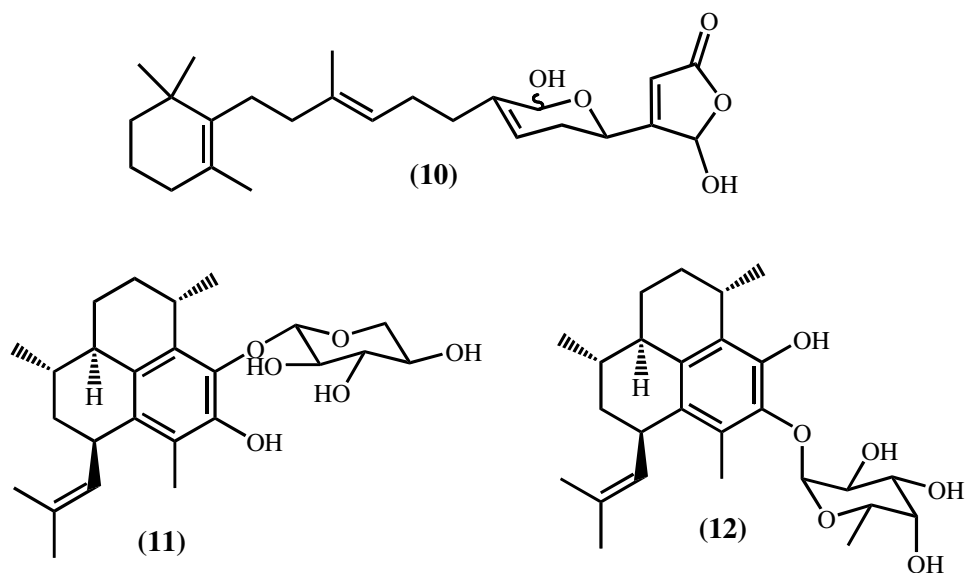


Un'altra interessante classe strutturale è quella dei terpeni e tra questi va menzionato il manoalide (10). Questo composto è stato isolato dalla spugna *Luffariella variabilis* dal gruppo di Scheuer e riportato come antibiotico.¹⁶

¹⁶ de Silva, E. D.; Scheuer, P. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611-14.

Successivamente, il gruppo di Jacobs e Dennis^{17, 18} ha stabilito che questo composto agisce come potente inibitore dell'enzima fosfolipasi A₂.

Inoltre, due diterpeni glicosidati, le pseudopterosine A (11) ed E (12) isolate dalla gorgonia caraibica *Pseudopteroergorgia elisabethae*, hanno mostrato promettenti attività *in vitro* ed *in vivo* come agenti antinfiammatori.^{19,20}



Le manzamine appartengono ad una nuova classe di alcaloidi isolati dalle spugne ed hanno attirato l'attenzione come agenti antimalarici. Quattro composti di questa serie, le manzamine A (13), l'8-hydroxymanzamine A (14), il suo enantiomero (15), ed il dimero della manzamina, la neo-kauluamina (16) hanno dato risultati incoraggianti nei test preliminari *in vivo*²¹.

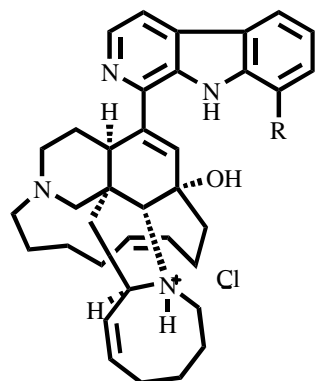
¹⁷ Jacobs, R. S.; Culver, P.; Langdon, R.; O'Brien, T.; White, S. *Tetrahedron* **1985**, 41, 981-4.

¹⁸ Deems, R. A.; Lombardo, D.; Morgan, D. P.; Mihelich, E. D.; Dennis, E. A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, 917, 258-68.

¹⁹ Look, S. A.; Fenical, W.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 5140-5145.

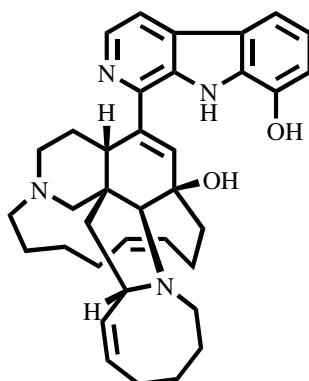
²⁰ Roussis, V.; Wu, Z.; Fenical, W.; Strobel, S. A.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4916-4922

²¹ Baldwin J. E.; Whitehead, R. C., *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2059.

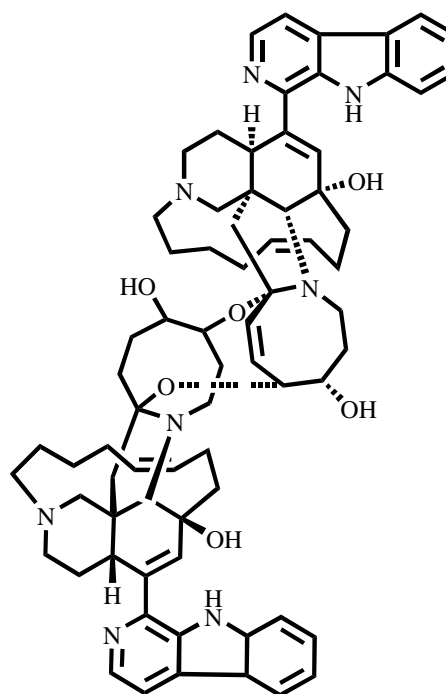


(13) R=H

(14) R=OH



(15)

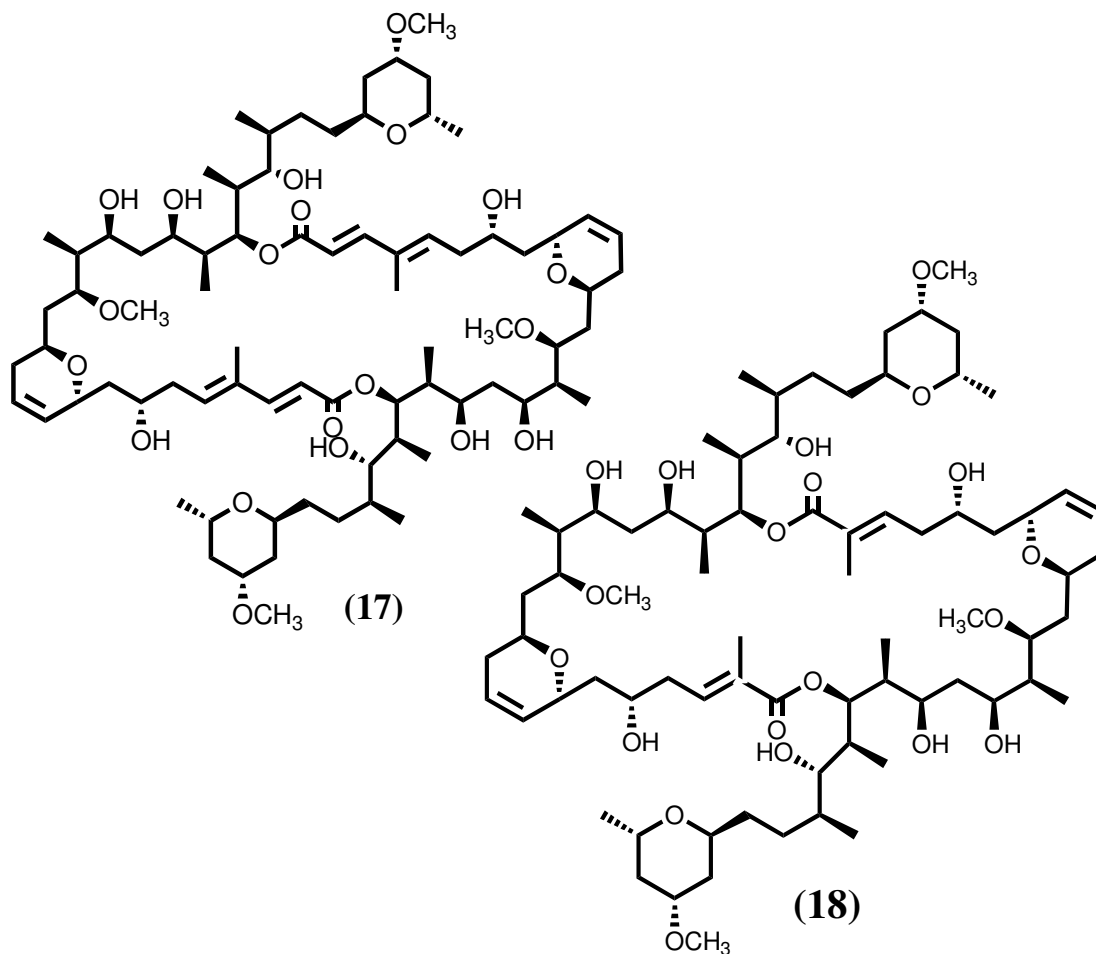


(16)

Altri metaboliti secondari, divenuti importanti come molecole guida nello sviluppo di nuovi farmaci, sono il macrolide swinholide A (17)²², ed il suo analogo misakinolide (18)²³, in grado di legarsi specificatamente al sistema dell'actina intracellulare, che rappresenta un utile strumento nello studio della funzione, delle dinamiche e dell'organizzazione dell'actina.

²² Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Katori, T.; Yamashita, M.; Tanaka, J.; Doi, M.; Ishida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3710-3712.

²³ Kobayashi, M.; Tsukamoto, S.; Tanabe, A.; Sakai, T.; Ishibashi, M. *J. Chem. Soc. Perkin trans. 1* **1991**, 2379-2389.



1.1 Prodotti naturali marini ad attività antitumorale

Uno degli obiettivi principali della ricerca nel campo delle sostanze naturali marini è stato la scoperta di nuovi agenti antitumorali; attualmente, un gran numero di metaboliti derivanti da organismi marini si trovano in fase di studio preclinico e clinico per il trattamento dei tumori. Simmons *et al.*, hanno riportato recentemente la fase di studio come antitumorali di diversi prodotti naturali marini, un indice tra l'altro della diversità chimica offerta dall'habitat marino²⁴ (vedi tabella 1).

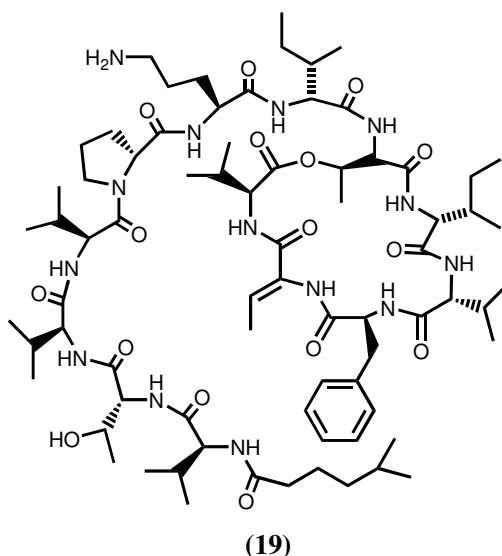
²⁴ Simmons, T. L.; Andrianasolo, E.; McPhail, K.; Flatt, P.; Gerwick, W. H. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 333-342.

Tabella 1: Prodotti naturali marini impiegati come antitumorali attualmente in fase preclinica o clinica.

Compound	Source organism	Chemical class	Molecular target	Current status
Ecteinascinidin 743	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (tunicate; possible bacterial source)	Tetrahydroisoquinolone alkaloid	Tubulin	Phase II
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia/Symploca sp.</i> (mollusc/cyanobacterium)	Linear peptide	Tubulin	Phase II
Bryostatin I	<i>Bugula neritina</i> (bryozoan)	Macrocyclic lactone	PKC	Phase II
Synthadotin	<i>D. auricularia/Symploca sp.</i>	Linear peptide	Tubulin	Phase II
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens/Bryopsis sp.</i> (mollusc/green alga)	Cyclic depsipeptide	Lysosomes/erbB pathway	Phase II
Squalamine	<i>Squalus acanthias</i> (shark)	Aminosteroid	Phospholipid bilayer	Phase II
Dehydrodidemnin B	<i>Trididemnum solidum</i> (tunicate, synthetic; possible bacterial/cyanobacterial source)	Cyclic depsipeptide	Ornithine decarboxylase	Phase II
Didemnin B	<i>Trididemnum solidum</i> (tunicate)	Cyclic depsipeptide	FK-506 bp	Phase II (discontinued)
Cemadotin	<i>D.auricularia/Symploca sp.</i> (synthetic analogue)	Linear peptide	Tubulin	Phase II (discontinued)
Soblidotin	<i>D. auricularia/Symploca sp.</i>	Linear peptide	Tubulin	Phase I
E7389	<i>Halichondria okadai</i> (sponge, synthetic)	Macrocyclic polyether	Tubulin	Phase I
NVP-LAQ824	<i>Psammaphysilla sp.</i>	Indolic cinnamyl hydroxamate	HDAC/DNMT	Phase I
Discodermolide	<i>Discodermia dissolute</i> (sponge)	Lactone	Tubulin	Phase I
HTI-286 (Hemiasterlin deriv.)	<i>Cymbastella sp.</i>	Linear peptide	Tubulin	Phase I
LAF-389 (Bengamide B derivative)	<i>Jaspis digonoxea</i> (sponge, synthetic)	q-Lactam peptide derivative	Methionine aminopeptidase	Phase I
KRN-7000 (Agelasphin derivative)	<i>Agelas mauritanus</i> (sponge, synthetic)	a-Galacosylceramide	Va24 + NKT cell activation	Phase I
Curacin A	<i>Lyngbya majuscula</i>	Thiazole lipid	Tubulin	Preclinical
DMMC	<i>Lyngbya majuscula</i>	Cyclic depsipeptide	Tubulin	Preclinical
Salinosporamide A	<i>Salinospora sp.</i> (bacterium)	Bicyclic g-lactam-hlactone	20S proteasome	Preclinical
Laulimalide	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (sponge)	Macrolide	Tubulin	Preclinical
Vitilevuamide	<i>Didemnin cuciferum/Polysyncracion lühostrutum</i>	Cyclic peptide	Tubulin	Preclinical
Diazonamide	<i>Diazona angulata</i>	Cyclic peptide	Tubulin	Preclinical
Eleutherobin	<i>Eleutherobia sp./Erythropodium caribaeorum</i> (soft corals)	Diterpene glycoside	Tubulin	Preclinical
Sarcodictyin	<i>Sarcodictyon roseum</i> (sponge)	Diterpene	Tubulin	Preclinical
Peloruside A	<i>Mycale hentscheli</i> (sponge)	Macrocyclic lactone	Tubulin	Preclinical
Salicylhalimides A and B	<i>Haliclona sp.</i> (sponge)	Polyketide	Vo-ATPase	Preclinical
Thiocoraline	<i>Micromonospora marina</i> (bacterium)	Depsipeptide	DNA-polymerase	Preclinical
Ascididemin	<i>Didemnum sp.</i> (sponge)	Aromatic alkaloid	Caspase-2/mitochondria	Preclinical
Variolins	<i>Kirkpatrickia variolosa</i> (sponge)	Heterocyclic alkaloid	Cdk	Preclinical
Lamellarin D	<i>Lamellaria sp.</i>	Pyrrrole alkaloid	Topoisomerase I /mitochondria	Preclinical
Dictyodendrins	<i>Dictyodendrilla verongiformis</i> (sponge)	Pyrrrolocarbazole derivatives	Telomerase	Preclinical
ES-285 (Spisulosine)	<i>Mactromeris polynyma</i> (mollusc)	Alkylamino alcohol	Rho (GTP- bp)	Preclinical
Dolastatin 15	<i>Dolabella auricularia</i>	Linear peptide	Tubulin	Preclinical (discontinued)
Halichondrin B	<i>Halichondria okadai</i>	Macrocyclic polyether	Tubulin	Preclinical (discontinued)

1.1.1 Kahalalide F

Le kahalalidi sono una serie di peptidi citotossici isolati nel 1993 dall'*Elysia rufescens*, un mollusco delle Hawaii²⁵. Durante la raccolta di questi molluschi erbivori per una valutazione chimica, si è osservato che l'*E. rufescens* si nutre di un'alga verde, appartenente alla specie *Bryopsis*. La successiva raccolta dell'alga e la purificazione dei suoi costituenti attivi ha mostrato che la *Bryopsis* possedeva una chimica identica a quella isolata dall'*E. rufescens*, incluso il kahalalide F (**19**). Studi preclinici attualmente in corso hanno evidenziato che il kahalalide F (**19**) possiede una selettività nei confronti di diverse linee cellulari di tumori solidi²⁶. I dati di tossicità hanno anche indicato che alte concentrazioni del composto **19** sono tossiche per i neuroni del sistema nervoso centrale, suggerendo un potenziale uso per il trattamento di determinati tumori come il neuroblastoma; la molecola dovrebbe entrare a breve nella fase I di sperimentazione clinica.



²⁵ (a) Hamann, M. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5825-5826. (b) Hamann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer, P. J.; Dunbar, D. C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6594-6600. (c) Goetz, G.; Nakao, Y.; Scheuer, P. J. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 562-567.
²⁶ (a) Jimeno, J. M. *Anti-Cancer Drugs* **2002**, *13*, S15-S19. (b) Nuijen, B.; Bouma, M.; Manada, C.; Jimeno, J. M.; Lazaro, L. L.; Bult, A.; Beijnen, J. H. *Inv. New Drugs* **2001**, *19*, 273-281.

1.1.2 *Didemnina B*

La didemnina B (**20**), un depsipeptide ciclico isolato dal tunicato caraibico *Trididemnum solidum*²⁷, è stato il primo prodotto marino ad entrare negli studi clinici come agente antitumorale²⁸. Sulla base di una forte somiglianza strutturale delle didemnine ai metaboliti di origine cianobatterica, Rinehart ha teorizzato che queste potenti citotossine derivino probabilmente da cianobatteri simbiotici che vivono in associazione con il tunicato²⁹.

La didemnina B (**20**) ha dimostrato attività antitumorale contro diversi modelli tumorali ed è stata studiata in fase II degli studi clinici per il trattamento del cancro della mammella, delle ovaie, della cervice, oltre che mieloma, glioblastoma, astrocitoma e cancro del polmone. Inoltre, la didemnina B (**20**) possiede diverse attività *in vitro*, anche se con potenze che variano largamente (> 5 ordini di grandezza)³⁰, suggerendo che le attività sono regolate da differenti meccanismi. La didemnina B (**20**) inibisce la sintesi di RNA, DNA e proteine³¹ e si lega in modo non competitivo alla palmitoil-proteina tioesterasi³². In più la rapamicina inibisce l'apoptosi indotta dalla didemnina nelle cellule umane HL60, indicando l'attivazione della via apoptotica dell'FK-506; probabilmente la didemnina B modula l'attività dell'FK-506 nel legame alle proteine come parte

²⁷ Rinehart, K.; Gloer, J.; Cook, J.; Carter, Jr.; Mizensak, S.; Scahill, T., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *103*, 1857-1859.

²⁸ Nuijen, B.; Bouma, M.; Manada, C.; Jimeno, J. M.; Schellens, J. H.M.; Bult, A.; Beijnen, J. H. *Anti-Cancer Drugs* **2000**, *11*, 793-811.

²⁹ Sings, H.; Rinehart, K., *J Ind Microbiol Biotech* **1996**, *17*, 385-96.

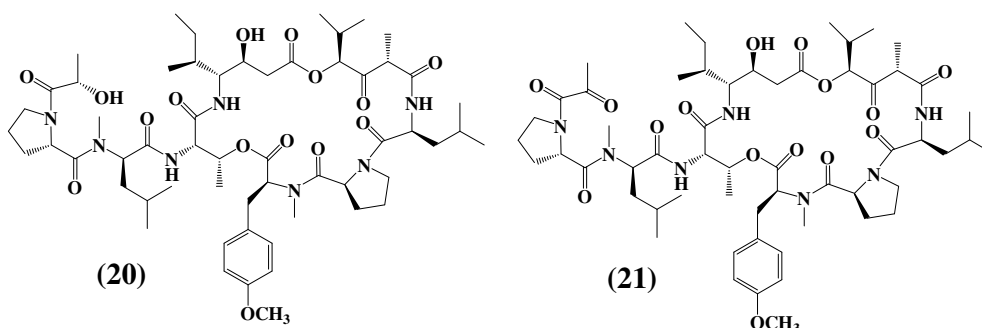
³⁰ Crampton, S.; Adams, E.; Kuentzel, S.; Li, L.; Badiner, G.; Bhuyan, B. *Cancer Res.* **1984**, *23*, 1796-1801.

³¹ Vera, M.; Joullie, M.; *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 102-145.

³² Crews, C.; Collins, J.; Lane, W.; Snapper, M.; Schreiber, S. J. *Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15411-15414.

del suo processo immunomodulatore e perciò porta alla morte cellulare *via* apoptosi³³.

Nonostante la varietà dei protocolli di trattamento e la valutazione contro differenti tipi di cancro, il composto **20** è risultato troppo tossico per il suo utilizzo, con l'interruzione degli studi clinici da parte dell'NCI nel 1990. L'esperienza acquisita da questi studi ha portato alla sintesi di molecole analoghe strettamente correlate, come l'aplidina (**21**)³⁴.



Analogamente alla didemnina B (**20**), l'aplidina (**21**) interferisce con la sintesi del DNA e delle proteine ed induce l'arresto del ciclo cellulare³⁵. L'aplidina (**21**) possiede un meccanismo di citotossicità unico e differenziale che coinvolge l'inibizione dell'ornitina decarbossilasi, un enzima critico nel processo della crescita tumorale e nell'angiogenesi. Inoltre, l'aplidina (**21**) blocca la sintesi proteica nello stadio di allungamento del polipetide³⁶. Questo derivato sintetico si è dimostrato, in fase preclinica, più attivo della didemnina B (**20**) ed è risultato

³³ Johnson, K.; Lawen, A. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 242-248.

³⁴ Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Kundu, B.; Faircloth, G.; Gloer, J. B.; Carney, J. R.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Hughes, R. G., Jr.; Gravalos, D. G.; de Quesada, T. G.; Wilson, G. R.; Heid, R. M.; et al. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2819-2834.

³⁵ Erba, E.; Serafini, M.; Gaipa, G.; Tognon, G.; Marchini, S.; Celli, N.; Rotilio, D.; Broggin, M.; Jimeno, J.; Faircloth, G.; Biondi, A.; D'Incalci, M. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 763-773.

³⁶ Urdiales, J.; Morata, P.; Nunez D. Castro, I.; Sanchez-Jimenez, F. *Cancer Lett.* **1996**, *102*, 31-37.

attivo contro diversi modelli di tumori solidi, incluso tumori che erano resistenti alla didemmina B (**20**). Sulla base dell'attività preclinica e del successo degli studi di fase I, l'aplidina (**21**) è entrata negli studi clinici di fase II contro tumori solidi.^{37, 38}

1.1.3 *Psammapline*

L'iniziale isolamento della psammapline A (**22**) da varie spugne verongidi appartenenti al genere *Psammaplysilla* è stato riportato simultaneamente da diversi gruppi di ricerca nel 1987^{39, 40}. La psammapline A (**22**), un bromotirosina disulfuro simmetrico che presenta gruppi di ossime, possiede una potente citotossicità contro le cellule P388 (IC₅₀ di 0.3 Qg/ml) e coesiste con un metabolita dimerico, la biprasina (**23**)⁴¹.

Sono state successivamente isolate ulteriori psammapline, inclusi vari derivati solfati e salificati (psammmapline B-L) e la prepsammapline A. Molti di questi composti possiedono potenti attività antibatteriche. Il fatto che le psammapline siano state isolate da diverse spugne e che gli aminoacidi aromatici bromurati derivati sono comuni in batteri marini, ha suggerito che questi metaboliti possono realmente originare da vie biosintetiche in microrganismi che vivono in associazione con le spugne.

³⁷ Amador, M.; Jimeno, J.; Paz-Ares, L.; Cortes-Funes, H.; Hidago, M. *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 607-1615.

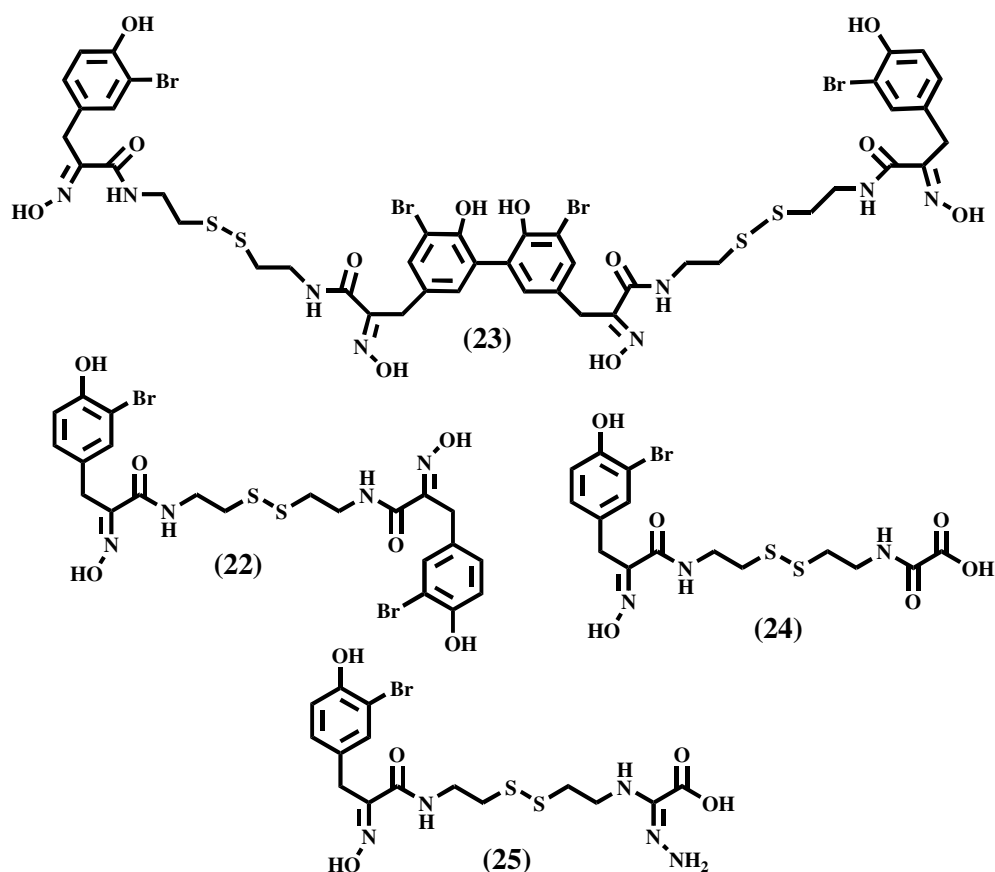
³⁸ Armand, J.; Ady-Vago, N.; Faivre, S.; Chieze, S.; Baudin, E.; Ribrag, V.; Lecot, F.; Iglesias, L.; LYpez-Lázaro, L.; Guzmán, C.; Jimeno, J.; Ducreux, M.; Le Chevalier, T.; Raymond, E. *Proceedings of the 2001 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. Abstr #477. In 2001.

³⁹ Arabshahi, L.; Schmitz, F. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3584-3586.

⁴⁰ Quiñoà, E.; Crews, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3229-3232.

⁴¹ Rodriguez, A.; Akee, R.; Scheuer, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4989-4992.

Le psammapline sono state recentemente testate come inibitori del DNA metiltransferasi (DNMT) e dell'istone deacetilasi (HDAC)⁴² e sono risultate inibitori di entrambi gli enzimi testati, il che è un risultato significativo alla luce della potenziale relazione tra DNMT e HDAC come modificatori epigenetici dell'attività dei geni soppressori di tumori. Inoltre, la psammaplina F (**24**) è un inibitore selettivo dell'HDAC, mentre la psammaplina G (**25**) è un inibitore selettivo del DNMT. La psammaplina A (**22**) è in grado di inibire la topoisomerasi II⁴³ e l'amminopeptidasi N con soppressione dell'angiogenesi *in vitro*.⁴⁴



⁴² Pina, I. C.; Gautschi, J. T.; Wang, G.-Y.-S.; Sanders, M. L.; Schmitz, F. J.; France, D.; Cornell-Kennon, S.; Sambucetti, L. C.; Remiszewski, S. W.; Perez, L. B.; Bair, K. W.; Crews, P. J. *Org. Chem.* **2003**, *68*, 3866-3873.

⁴³ Kim, D.; Lee, S.; Jung, J.; Lee, C.; Choi, S., *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4085-4090.

⁴⁴ Shim, J.; Lee, H.; Shin, J.; Kwon, H., *Cancer Lett.* **2004**, *203*, 163-169.

Tuttavia, l'instabilità fisiologica della classe delle psammopline ne ha precluso il diretto sviluppo clinico.

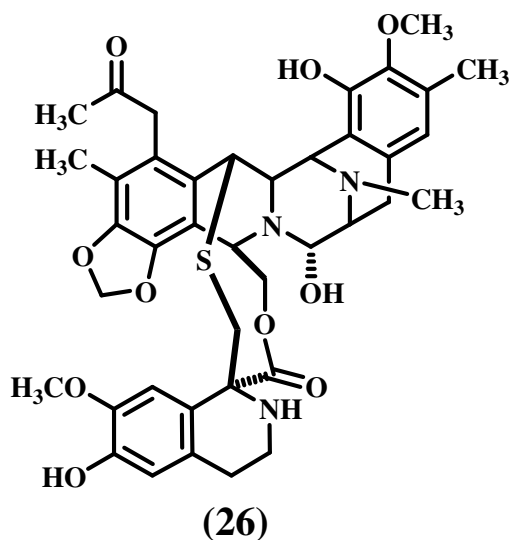
1.1.4 Ecteinascidina-743

Recenti analisi condotte su organismi marini per la ricerca di attività anticancro avevano evidenziato potenti attività citotossiche negli estratti acquosi del tunicato dei Caraibi *Ecteinascidia turbinata*. Le strutture molecolari degli alcaloidi contenuti negli estratti e successivamente isolati e caratterizzati, sono state indicate come quelle di complessi tetraidroisochinoloni^{45, 46}. L'Ecteinascidina-743 (**26**) è risultato il maggiore metabolita e, sebbene sia meno potente *in vivo* del suo analogo *N*-demetilato (JET-729), la sua citotossicità (IC₅₀= 0.5 ng/ml vs cellule leucemiche L1210), la sua stabilità e l'abbondanza relativamente alta in natura l'hanno resa la più idonea per lo sviluppo clinico. Tuttavia, lo studio del meccanismo d'azione e le valutazioni precliniche *in vivo* sono stati impediti dalla scarsa quantità di materiale. Le raccolte in larga scala, l'acquacoltura e gli sforzi sintetici⁴⁷ hanno portato allo sviluppo di una semisintesi dell'ET-743 a partire dalla cianosafracina B, composto ottenuto in notevole quantità dalla fermentazione del batterio marino *Pseudomonas fluorescens*. La struttura dell'ecteinascidina (**26**) è in accordo con un'origine microbica naturale, ed, infatti, esistono due brevetti per batteri simbiotici del tunicato *E. turbinata*.

⁴⁵Rinehart, K.; Holt, T.; Fregeau, N.; Stroh, J.; Keifer, P.; Sun, F.; Martin, D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515.

⁴⁶Wright, A.; Forleo, D.; Gunawardana, G.; Gunasekera, S.; Koehn, F.; McConnell, O. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4508-4512.

⁴⁷Newman, D.; Cragg, G. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1216-1238.



1.1.5 Halicondrina B

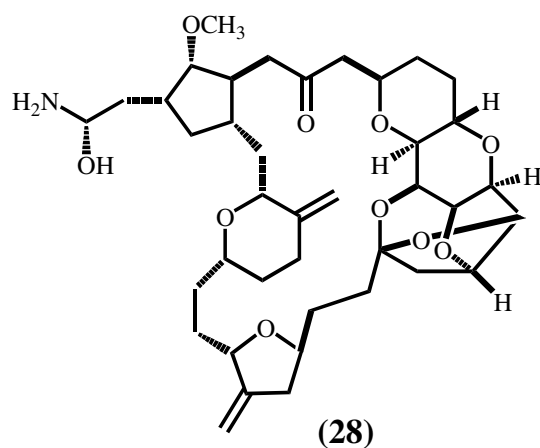
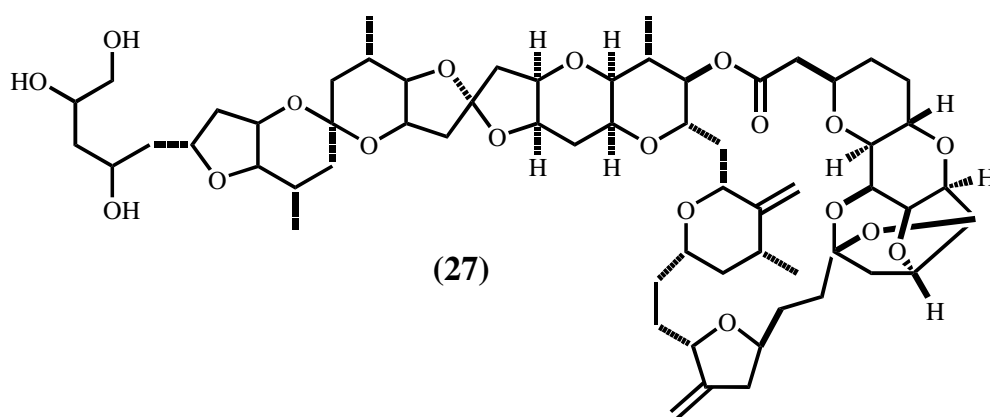
Le halicondrine sono state isolate per la prima volta dalla spugna giapponese *Halichondria okadai* da Uemura e colleghi e la loro struttura è stata determinata mediante cristallografia a raggi X.⁴⁸ Successivamente sono state isolate l'halicondrina B (27) ed alcuni analoghi naturali da una serie di spugne, incluse *Lissodendoryx sp.*, *Phakellia carteri*, and *Axinella sp.* e ciò ha suggerito che questo tipo di scheletro può essere costruito in associazione con microrganismi. Una serie di studi hanno esaminato successivamente il meccanismo di tossicità cellulare, ed è stato scoperto che le halicondrine sono potenti inibitori della tubulina, che legano in maniera non competitiva il sito di legame della Vinca e causano un caratteristico arresto del ciclo cellulare nella fase G₂-M con una concomitante distruzione del fuso mitotico^{49, 50}. A causa della loro eccellente attività biologica nell'uccidere cellule tumorali e della loro grande

⁴⁸ Uemura, D.; Takahashi, K.; Yamamoto, T.; Katayama, C.; Tanaka, J.; Okumura, Y.; Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796-4798.

⁴⁹ Bai, R.; Paull, K.; Herald, C.; Malspeis, L.; Pettit, G.; Hamel, E. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15882

⁵⁰ Dabydeen, D.; Florence, G.; Paterson, I.; Hamel, E. *Cancer Chemo. Pharmacol.* **2004**, *53*, 397-403.

complessità strutturale, le halicondrine sono diventate rapidamente bersaglio della sintesi chimica. La prima sintesi totale è stata completata nel 1990⁵¹. Il gruppo di Kishi si è concentrato sulla sintesi di analoghi dell'halicondrina strutturalmente più semplici che mantenessero o aumentassero le loro attività biologiche, e ciò ha condotto alla scoperta della molecola E7389 (**28**) ora in fase di sperimentazione clinica⁵².



⁵¹ Cooper, A.; Salomon, R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3813-3816.

⁵² Choi, H.; Demeke, D.; Kang, F.; Kishi, Y.; Nakajima, K.; Nowak, P.; Wan, Z-K.; Xie, C. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1-17; Kimura, T.; Synold, T.; Mahaffey, T. C.; Labauve, A. E.; Mack, P. C.; Lenz, H.-J.; Gandara, D. R.; Doroshov, J. H.; Gumerlock; P. H. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology. Abstr. # 2804.* In **2003**, p. 697.

1.1.6 Dolastatina 10

All'inizio del 1970 Pettit e collaboratori hanno scoperto le proprietà estremamente potenti degli estratti ottenuti dalla lepre di mare *Dolabella auricularia*. Tuttavia, a causa delle esigue quantità del principio attivo (~ 1,0 mg/100 kg di organismi raccolti), la delucidazione strutturale della dolastatina 10 (**29**) ha richiesto circa quindici anni per essere completata. Le scarse concentrazioni del composto nella lepre di mare indicano i cianobatteri come origine di questo metabolita secondario bioattivo⁵³, ed infatti ciò è stato confermato dall'isolamento della dolastatina direttamente dal cianobatterio marino *Symploca*.⁵⁴ La dolastatina 10 (**29**) è un pentapeptide con quattro residui amminoacidici fino ad ora strutturalmente unici (dolavalina, dolaisoleucina, dolaprolina e dolafenilalanina), oltre alla valina. Al tempo della sua scoperta, è risultato essere l'agente antiproliferativo noto più attivo con una ED₅₀ = 4.6 x 10⁻⁵ Qg/mL contro le cellule leucemiche PS di topo.⁵⁵

Successivamente, la dolastatina 10 (**29**) ha mostrato di essere un inibitore non competitivo dell'alcaloide della vinca che lega la tubulina (Ki 1.4 QM), e di influenzare fortemente l'assemblaggio dei microtubuli e l'idrolisi del GTP tubulina-dipendente⁵⁶. Studi successivi hanno rivelato che la dolastatina 10 (**29**) lega i siti che legano la rhizoxina e la maytansina⁵⁷ (adiacente al sito di legame dell'alcaloide della vinca), come anche il sito di scambio di GTP sulla tubulina,

⁵³ Harrigan, G. G.; Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1075-1077.

⁵⁴ Luesch, H.; Moore R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 907

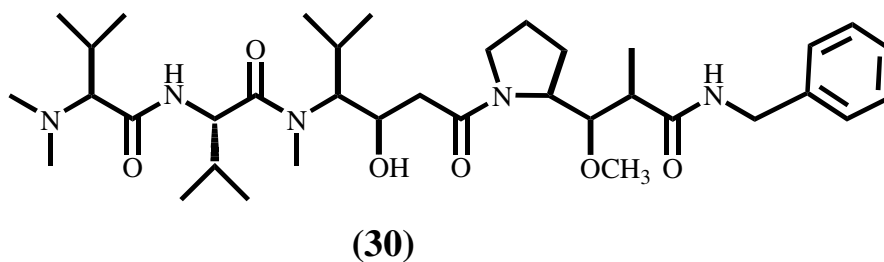
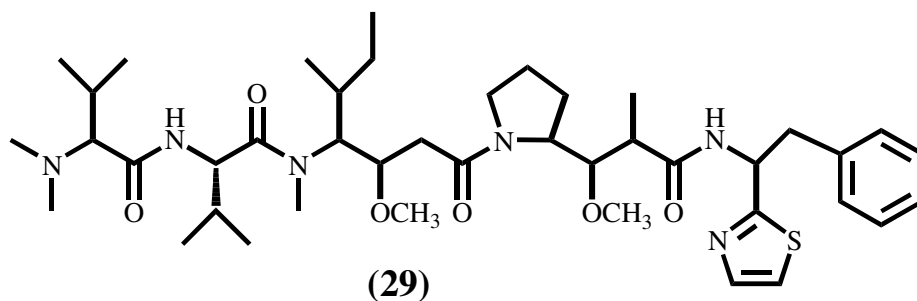
⁵⁵ George R. Pettit, Yoshiaki Kamano, Cherry L. Herald, Albert A. Tuinman, Fred E. Boettner, Haruhisa Kizu, Jean M. Schmidt, Lubomir Baczynskyj, Kenneth B. Tomer, Roger J. Bontems. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885.

⁵⁶ Bai, R.; Pettit, G.; Hamel, E. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17141-17149.

⁵⁷ Jordan, A.; Hadfield, J.; Lawerence, N.; McGown, A. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259-296.

causando l'arresto del ciclo cellulare nella metafase.⁵⁸ La dolastatina 10 (**29**) è entrata nella fase I degli studi clinici nel 1990 per opera del National Cancer Institute ed è avanzata fino agli studi di fase II. Sfortunatamente, è stata eliminata dagli studi clinici come singolo agente, a causa dello sviluppo di una moderata neuropatia periferica nel 40% dei pazienti⁵⁹ e di un'insignificante attività nei pazienti con adenocarcinoma⁶⁰ refrattario agli ormoni ed un ricorrente carcinoma ovario sensibile al platino.⁶¹

Nonostante ciò, la dolastatina 10 (**29**) rappresenta un valido punto di partenza per studi SAR e per il disegno sintetico di nuovi farmaci, che ha ultimamente portato all'analogo TZT-1027 (**30**).



⁵⁸ Bai, R.; Pettit, G.; Hamel, E. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 2637-2645.

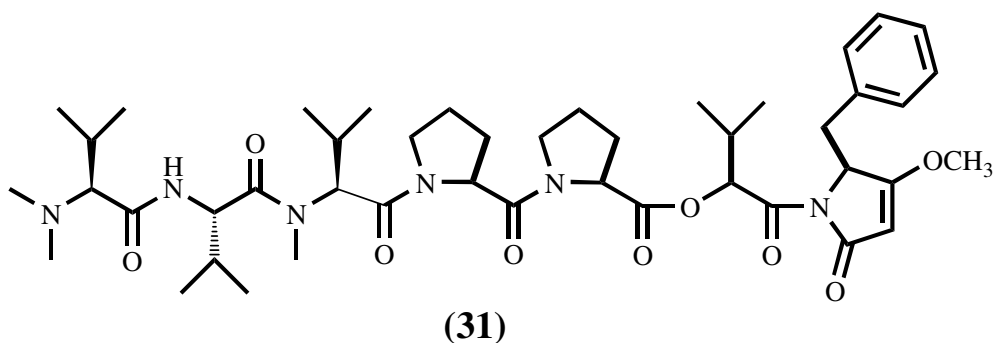
⁵⁹ Pitot, H.; McElroy, E.; Reid, J. Windebank, A. J.; Sloan, J. A.; Erlichman,; Bagniewski, P. G.; Walker, D. L.; Rubin, J.; Goldberg, R. M.; Adjei, A. A.; Matthew M. Ames, M. M. *Clin. Cancer. Res.* **1999**, *5*, 525-531.

⁶⁰ U. Vaishampayan, M. Glode, W. Du, A. Kraft, G. Hudes, J. Wright, and M. Hussain. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4205-4208.

⁶¹ Hoffman, M.; Blessing, J.; Lentz, S. *Gynecol. Oncol.* **2003**, *89*, 95-98.

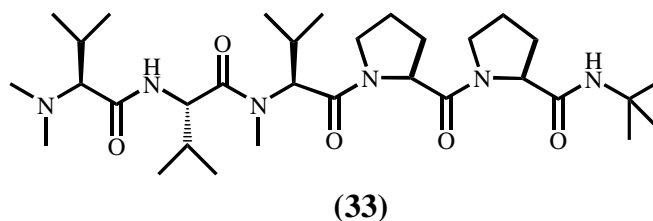
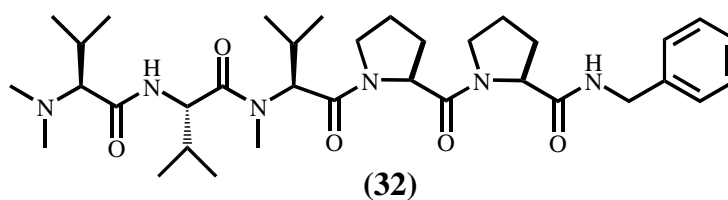
1.1.7 Dolastatina 15

La dolastatina 15 (**31**), è stata isolata in tracce dagli estratti della lepre di mare dell'oceano indiano *Dolabella auricularia* (6.2 mg da 1600 kg di organismo $4 \times 10^{-7}\%$), implicando fortemente un'origine cianobatterica per questo metabolita. Infatti, molti peptidi correlati alla dolastatina 15 (**31**), sono stati isolati da cianobatteri marini⁶². La sequenza lineare del depsipeptide è composta da sette residui amminici o idrossilici. Test condotti hanno mostrato che, al contrario della dolastatina 10 (**29**), la dolastatina 15 (**31**) si lega direttamente al dominio della vinca della tubulina⁶³. Gli ostacoli alla successiva valutazione clinica della dolastatina 15 (**31**), includono la complessità e la bassa resa dei suoi derivati sintetici, nonché la sua scarsa solubilità in acqua. Tuttavia, vari tentativi hanno portato allo sviluppo di alcuni analoghi sintetici con proprietà chimiche più accentuate, tra i quali vanno menzionati la cematodina (**32**) e la sintatodina (**33**).



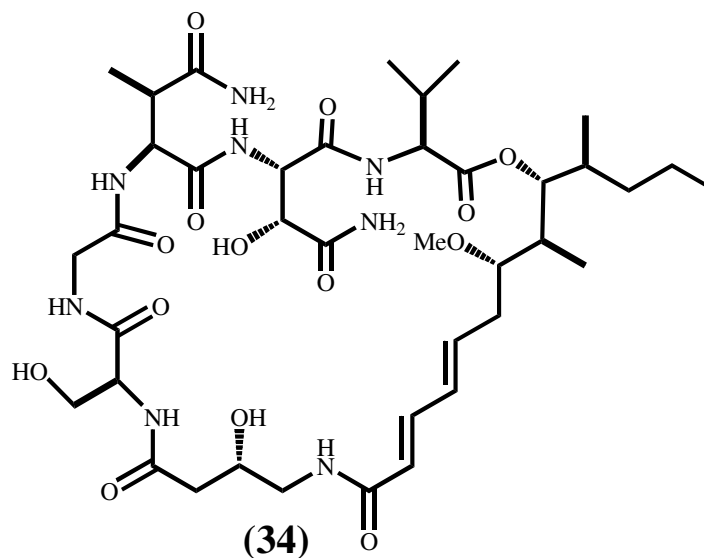
⁶²Gerwick, W.H.; Tan, L.T.; Sitachitta, N. Nitrogen-containing Metabolites from Marine Cyanobacteria. In: *Cordell G, editor. The Alkaloids. San Diego: Academic Press; 2001. p. 75-184.*

⁶³Cruz-Monserrate, Z.; Mullaney, J.; Harran, P.; Pettit, G.R.; Hamel, E. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3822-3828.



1.1.8 (+)-Discodermolide

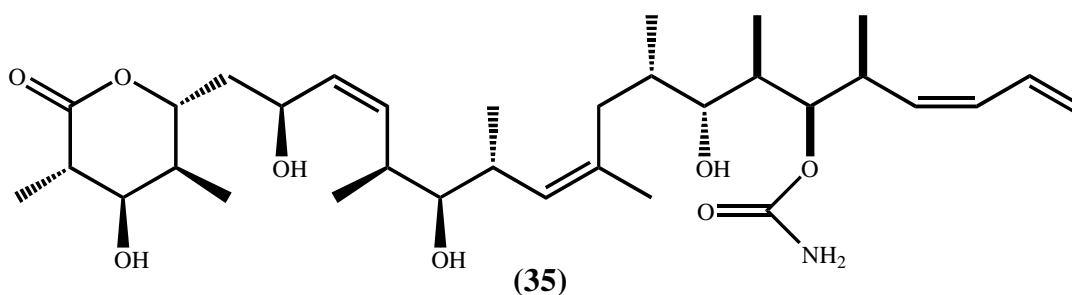
Spugne appartenenti al genere *Thoarella* sono una ricca fonte di peptidi inusuali che possiedono interessanti attività biologiche come quella antibatterica, di inibizione enzimatica, antimicotica ed anti HIV⁶⁴. La Nagahamide A (**34**), un metabolita con proprietà antibatterica isolato da Yumika et al. dalla spugna *Theonella swinhoei* è un depsipeptide a sette residui contenente tre aminoacidi inusuali ed una porzione polichetidica⁶⁵.



⁶⁴Okada, Y.; Matsunaga, S.; Van Soest, R.W.M.; Fusetani, N. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3039-3042.; Fusetani, N.; Matsunaga, S.; *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1793-1806.

⁶⁵Okada, Y.; Matsunaga, S.; Van Soest, R.W.M.; Fusetani, N. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3039-3042.

Un altro esempio di metabolita è la citotossina (+)-discodermolide (**35**) isolata dalla spugna *Discodermia dissoluta* che è risultata un potente agente immunosoppressore ed un induttore della polimerizzazione della tubulina⁶⁶. Scoperta dai ricercatori dell'Harbor Branch Oceanographic Institute, la molecola è stata ceduta in licenza alla Novartis Pharmaceutical Corporation nel 1998 per ulteriori sviluppi. Le ricerche successive sono state focalizzate sulla preparazione e la valutazione di analoghi sintetici e naturali così da ottenere sintesi più efficienti ed una migliore comprensione delle relazioni struttura-attività all'interno di questa classe strutturalmente nuova di antimitotici⁶⁷.



1.1.9 Briostatina I

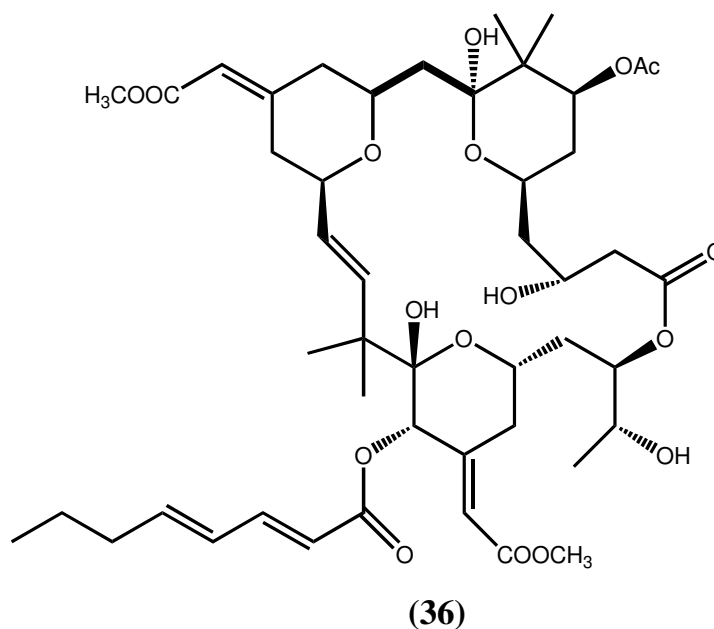
Tra i prodotti naturali bioattivi più promettenti va citata la briostatina 1 (**36**), un polichetide isolato dal briozoo *Bugula neritina* nel 1970.⁶⁸ La briostatina 1 (**36**) è attualmente in fase II degli studi clinici per il trattamento di varie

⁶⁶Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E.; Schulte, G. K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912-4915.

⁶⁷(a) Paterson I.; Florence G. J.; Gerlach K.; Scott J. P.; Sereinig N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9535-9544. (b) Curran, D. P.; Furukawa, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2233-2235.

⁶⁸Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Doubek, D. L.; Herald, D. L.; Arnold, E.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846-6848.

leucemie, linfomi, melanomi, e tumori solidi.⁶⁹ Ricerche recenti hanno ritrovato che questo macrolide citotossico è di potenziale impiego nel trattamento del cancro alle ovaie ed alla mammella ed inoltre aumenta la sopravvivenza dei linfociti nei pazienti sottoposti a trattamento radioattivo.⁷⁰



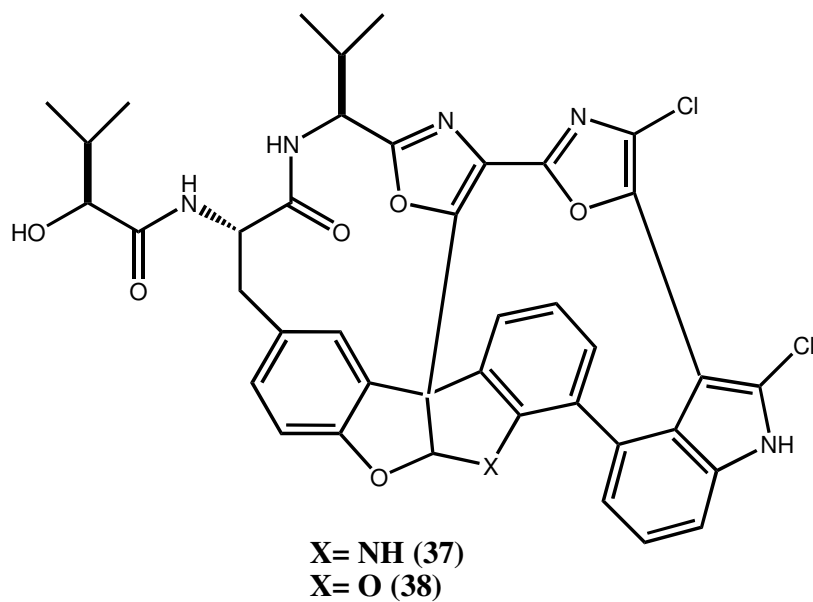
1.1.10 Diazonamide A

Anche le ascidie sono state una grande fonte di nuovi prodotti naturali bioattivi. Studi recenti condotti sul composto diazonamide A (**37**)⁷¹, isolato dall'ascidia marina *Diazona angolata*, hanno rivelato che il composto **37** causa arresto della crescita cellulare nella fase di mitosi. Sia la diazonamide A (**37**) che l'analogo ossigenato (**38**) sono potenti inibitori dell'assemblaggio dei microtubuli, in maniera equivalente alla dolastatina 10 (**29**) ed in modo più potente della dolastatina 15 (**31**).

⁶⁹ Propper, D. J.; Macaulay, V.; O'Byrne, K. J.; Braybrooke, J. P.; Wilner, S. M.; Ganesan, T. S.; Talbot, D. C.; Harris, A. L. *British J. Canc.* **1998**, *78*, 1337-1341.

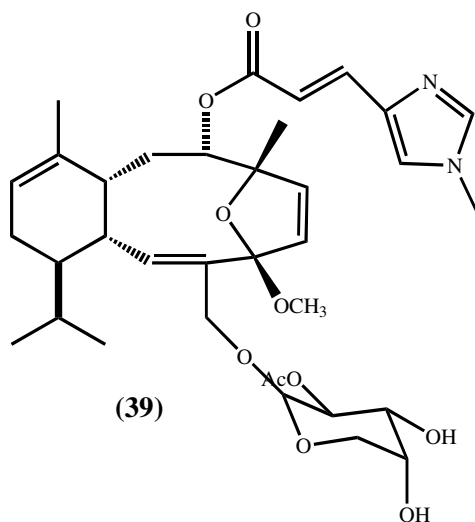
⁷⁰ Kraft, A. S. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 1790-1792.

⁷¹ Cruz-Monserrate, Z.; Vervoort, H. C.; Bai, R.; Newman, D. J.; Howell, S. B.; Los, G.; Mullaney, J. T.; Williams, M. D.; Pettit, G. R.; Fenical, W.; Hamel, E. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1273-1280.



1.1.11 Eleuterobina

Nel 1993, al largo delle coste nord-orientali dell’Australia, è stato identificato un nuovo corallo soft, l’ *Eleutherobia albicans*; il prodotto bioattivo isolato da quest’organismo, l’eleuterobina (**39**), ha dimostrato di essere una delle più potenti citotossine scoperte finora, con capacità di inibire *in vitro* cellule tumorali con una IC₅₀ nell’ordine di 10-15 nM⁷².



⁷²Lindel, T.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; Long, B. H.; Casazza, A. M.; Carboni, J.; Fairchild, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8744-8745.

2. Tecniche spettroscopiche

La determinazione della struttura di un nuovo metabolita bioattivo è il primo, necessario passo per ogni successivo studio. Fino ad alcuni decenni fa, la determinazione strutturale di una nuova sostanza organica era perseguita esclusivamente attraverso l'uso di metodiche chimiche (degradazione e interconversione di gruppi funzionali). Lo sviluppo delle tecniche spettroscopiche, che si sono inizialmente affiancate ai metodi chimici per poi sostituirli quasi completamente, ha rivoluzionato questo approccio.

Oggi è possibile determinare completamente ed in maniera non distruttiva la struttura di sostanze organiche complesse, disponendo di pochi milligrammi o addirittura di frazioni di milligrammo di campione. Il lavoro di determinazione strutturale descritto in questa tesi è quindi largamente basato su tecniche spettroscopiche, anche se in alcuni casi non è stato possibile fare a meno di tecniche degradative. Le principali tecniche spettroscopiche impiegate per la determinazione strutturale dei composti isolati sono state la spettrometria di massa (MS) e la risonanza magnetica nucleare (NMR).

2.1 Spettrometria di massa

La determinazione della formula molecolare, realizzata attraverso spettri di massa a bassa e ad alta risoluzione, è il primo ed essenziale passo nello studio di una nuova molecola organica.

La spettrometria FAB (*Fast Atom Bombardament*) e ESI (*Electro Spray Ionization*) sono le tecniche di spettrometria di massa oggi più utilizzate per le sostanze organiche a basso peso molecolare.

La spettrometria FAB è una tecnica di ionizzazione “soft” utilizzata per l'analisi di molecole polari difficilmente volatilizzabili e con pesi molecolari non superiori ai diecimila Da. La ionizzazione avviene bombardando l'analita disperso in un solvente viscoso alto bollente come glicerina, tioglicerina o alcool 3-nitrobenzilico, con atomi neutri, generalmente Xenon o Argon, ad alta energia traslazionale. La ionizzazione così ottenuta minimizza l'entità dell'eccitazione vibrazionale riducendo al minimo la distruzione delle molecole ionizzate. Il solvente polare favorisce la ionizzazione e consente la diffusione del campione sulla superficie.

Con la tecnica FAB lo ione molecolare non è solitamente visibile, mentre sono particolarmente evidenti ioni pseudomolecolari, $[M+H]^+$ oppure $[M-H]^-$ secondo la modalità di ionizzazione. La presenza e l'aggiunta di sali quali NaCl o KCl favoriscono la formazione, in modalità positiva, di ioni pseudomolecolari $[M+Na]^+$ o $[M+K]^+$. Spesso nello spettro sono anche presenti picchi di addotti della glicerina che possono arrecare disturbo; più interessanti sono i frammenti ionici, che sono spesso visibili e sono utili dal punto di vista interpretativo.

La spettrometria ESI è una tecnica usata soprattutto per lo studio di biomolecole molto polari idrosolubili, anche cariche. Il campione è introdotto come soluzione in un solvente volatile, come acqua, metanolo, acetonitrile, cloroformio o loro miscele, talvolta contenente un po' di acido organico. Questa soluzione è spinta ad alta pressione attraverso un ago capillare, che è caricato ad

un potenziale positivo di qualche migliaio di volt, e uscendo dall'ago si suddivide in tante piccole (1-2 μm) goccioline, generando uno spray. Dato l'elevato potenziale dell'ago, ogni gocciolina ha un eccesso di carica positiva. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina. La densità di carica della gocciolina quindi aumenta, finché diventa così alta che ioni positivi del soluto possono essere espulsi dalla gocciolina. Questi ioni sono poi spinti da un campo elettrico attraverso una serie di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dello spettrometro di massa, dove sono poi accelerate ed inviate all'analizzatore. Una caratteristica fondamentale dell'electrospray è che, per molecole di massa piuttosto elevata, gli ioni che sono espulsi dalle goccioline hanno carica multipla, si tratta cioè di molecole poliprotonate. Per molti composti il numero delle cariche è più o meno proporzionale alla grandezza delle molecole, perciò il rapporto m/z di molecole che escono dall'electrospray è spesso nel range 500-2000. La formazione di ioni con cariche multiple è molto importante, perché riduce il rapporto massa/carica degli ioni, permettendo l'analisi di molecole molto pesanti come intere proteine.

2.2 Risonanza magnetica nucleare

Tra le tecniche usate per la determinazione strutturale dei metaboliti isolati, quella di gran lunga più importante è stata la risonanza magnetica nucleare (NMR). In particolare, oltre ai comuni esperimenti ^1H - e ^{13}C -NMR si è fatto un ampio uso di esperimenti NMR bidimensionali, che nella maggior parte dei casi sono stati sufficienti per la completa determinazione strutturale del composto in esame.

Gli esperimenti NMR bidimensionali presentano due importanti vantaggi rispetto ai corrispondenti esperimenti monodimensionali, e questi vantaggi diventano sempre più evidenti al crescere della complessità della molecola. In primo luogo si ha una drastica riduzione del tempo di acquisizione perché da un singolo spettro si possono ricavare informazioni ottenibili solo da un grande numero di spettri monodimensionali. Inoltre, la presenza di due dimensioni rende molto più improbabile la possibilità di sovrapposizione di segnali, il che permette di discernere e attribuire anche nuclei che risuonano in zone molto affollate dello spettro. Infine alcuni esperimenti NMR bidimensionali mettono in evidenza fenomeni non accessibili mediante esperimenti monodimensionali: è il caso degli esperimenti ROESY, e di tutti gli esperimenti bidimensionali a multiplo quanto. Qui di seguito sono sommariamente descritti i principali esperimenti NMR bidimensionali usati.

La sequenza COSY⁷³ (COrrelation SpettroscopY) è stata una delle prime sequenze di impulsi 2D ad essere definita ed è probabilmente, nelle sue varie versioni, ancora oggi, l'esperimento 2D NMR più usato. Il COSY è un esperimento di correlazione di chemical shift omonucleare attraverso l'accoppiamento scalare spin-spin. La sua sequenza è costituita da due impulsi di $\pi/2$ separati da un tempo t_1 variabile con incrementi costanti; il secondo impulso trasferisce parte della coerenza creatasi col primo impulso tra nuclei accoppiati scalarmente. Si avranno dunque picchi di correlazione in corrispondenza di tali

⁷³ Bax A.; "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids", Delft University Press, Dordrecht, **1982**.

nuclei e questi picchi consentono di stabilire una rete di connessioni fra i protoni di una molecola, fornendo preziose informazioni strutturali.

Il TOCSY⁷⁴ (TOtal Correlation SpectroscopY), come il COSY, è anch'esso un esperimento NMR bidimensionale di correlazione omonucleare, in cui però sono presenti cross peak non solo in corrispondenza di nuclei direttamente accoppiati, ma anche tra qualunque coppia di protoni appartenenti allo stesso sistema di spin. La sequenza TOCSY permette, infatti, il trasferimento della polarizzazione di un protone a qualunque altro protone che è ad esso collegato attraverso una serie di accoppiamenti scalari spin-spin. Nella pratica, tuttavia, non si può andare oltre i cinque-sei accoppiamenti; inoltre un accoppiamento piccolo (dell'ordine di grandezza di 2 Hz) può bloccare la serie di trasferimenti di polarizzazione. Il parametro che regola questi trasferimenti è il mixing time, Δ , il cui incremento generalmente fa aumentare il numero di correlazioni osservabili, a prezzo di una diminuzione della sensibilità dell'esperimento. L'esperimento TOCSY è utile soprattutto, quando nel composto sotto esame sono individuabili una serie di piccoli sistemi di spin isolati tra loro, come accade nel caso degli oligopeptidi o degli oligosaccaridi.

Il ROESY⁷⁵ (Rotating-frame Overhauser SpectroscopY) è una correlazione di chemical shift omonucleare che mette in evidenza un fenomeno, il ROE (Rotating-frame Overhauser Effect), che è simile al NOE, ma presenta alcune importanti differenze. L'effetto ROE è, come il NOE, dovuto all'accoppiamento dipolare (attraverso lo spazio) tra nuclei, e dipende quindi dalla distanza tra i nuclei; è quindi molto utile per studi stereochimici e

⁷⁴ Davis D.G., Bax A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, p. 2820.

⁷⁵ Davis D.G., Bax A.; *J. Mag. Res.*, **1985**, *37*, p. 207.

conformazionali. Tuttavia, mentre il NOE al crescere delle dimensioni della molecola (o più esattamente al diminuire del suo tempo di correlazione τ_c) cambia di segno, passando da positivo a negativo, il ROE è sempre positivo. L'esperimento ROESY è quindi particolarmente utile per molecole di medie dimensioni, intorno al peso molecolare 1000, che si trovano nella zona di confine tra NOE positivo e negativo, e presentano quindi un NOE vicino a zero. Un altro importante aspetto dell'esperimento ROESY è che esso ha una sequenza molto simile a quella del TOCSY, ed, infatti, spesso negli spettri ROESY sono presenti picchi di correlazione spuri dovuti a correlazioni di tipo TOCSY. Fortunatamente questi artefatti sono facilmente riconoscibili, poiché presentano fase opposta a quella dei reali picchi ROESY. Per una corretta interpretazione dello spettro, è quindi molto importante che l'esperimento ROESY sia acquisito in modo phase-sensitive.

L' HSQC⁷⁶ (Heteronuclear Single Quantum Coherence) è un esperimento di correlazione eteronucleare di chemical shift ^1H - ^{13}C tramite la costante di accoppiamento diretta $^1J_{\text{CH}}$ ed è caratterizzato da una sensibilità notevolmente superiore rispetto a quella dell'HETCOSY. Questo esperimento è usato frequentemente per le molecole organiche, in particolare per le proteine. In questo esperimento, il segnale acquisito è quello protonico (reverse detection), anziché quello relativo al ^{13}C come nell'esperimento HETCOSY. La maggiore sensibilità NMR del protone rispetto a quella del ^{13}C rende l'HSQC un esperimento più sensibile e quindi adatto anche a campioni disponibili in quantità limitata. L'inconveniente di questo esperimento è che, data la bassa abbondanza isotopica

⁷⁶ Davis D.G., Bax A.; *J. Mag. Res.*, **1986**, 67, p. 565.

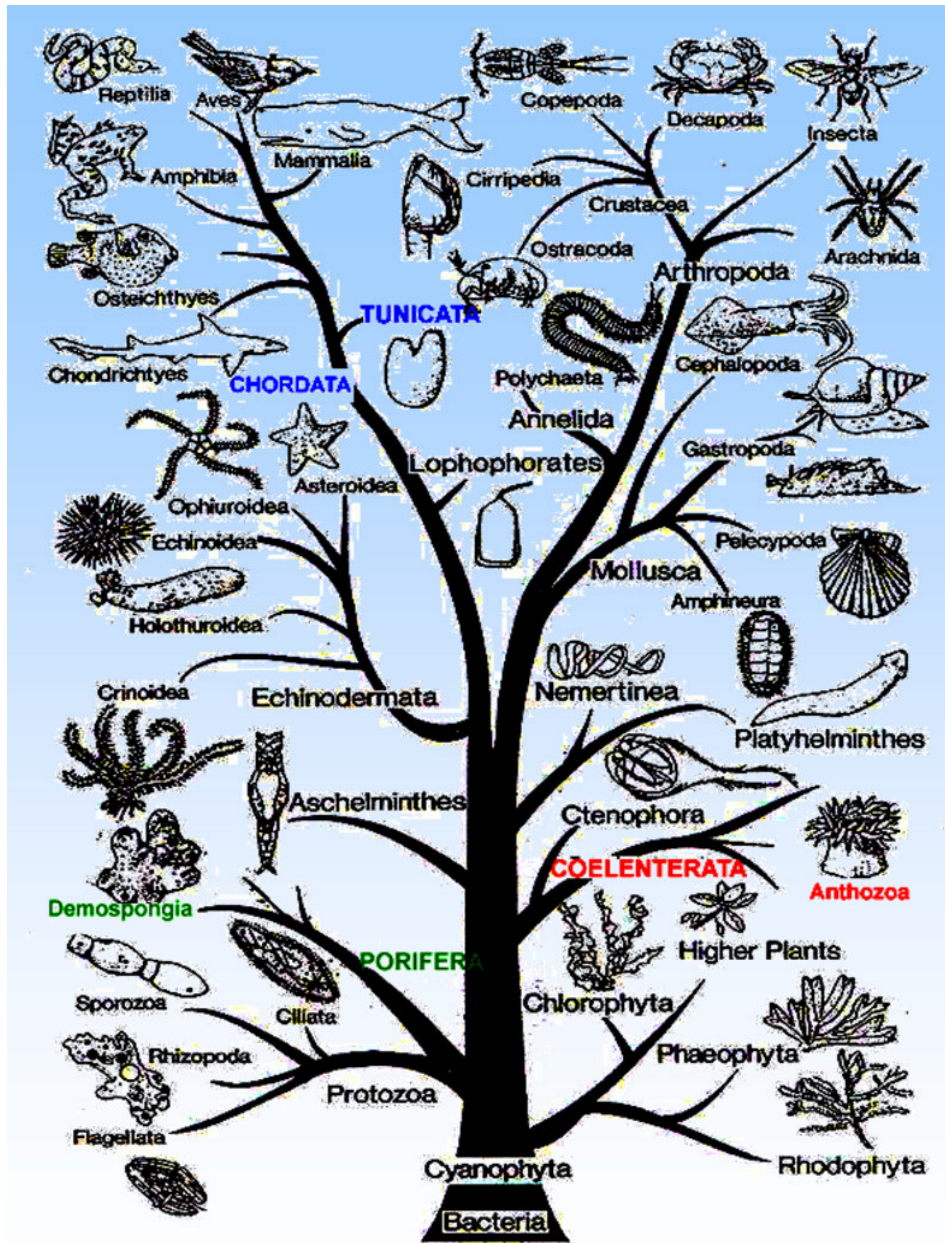
del ^{13}C (1.1%), solo una piccola percentuale di protoni è legata ad atomi di carbonio ^{13}C , e fornisce quindi informazioni utili, mentre il segnale relativo ai protoni legati al ^{12}C deve essere eliminato. Tuttavia, poiché quest'ultimo rappresenta la gran parte del segnale totale, la sua completa eliminazione è piuttosto difficile, e anche un'eliminazione incompleta può lasciare un segnale residuo sufficiente a nascondere tutti i picchi di correlazione. Negli spettrometri più recenti questo problema è stato risolto utilizzando impulsi di gradiente di campo magnetico, che defocalizzano il segnale non desiderato in maniera da eliminarlo.

L'HMBC⁷⁷ (Heteronuclear Multiple Bond Corelation) è una correlazione eteronucleare long-range che fornisce le stesse informazioni del COLOC, ma l'acquisizione è in reverse detection; questo aspetto comporta tutti i vantaggi di sensibilità che ne derivano, ma anche con il problema della soppressione del segnale dei protoni legati al ^{12}C . Tale problema è anzi acuito dalla minore intensità dei cross-peaks, dovuta a due fattori. In primo luogo, la sequenza HMBC, che sfrutta costanti di accoppiamento piccole (3-10 Hz), è intrinsecamente meno efficiente dell'HSQC. Inoltre, mentre le $^1J_{\text{CH}}$ sono tutte simili tra loro, le $^{2,3}J_{\text{CH}}$ possono essere molto diverse, ed è quindi impossibile eseguire un esperimento ottimizzato per tutti i loro possibili valori. Anche in questo caso, la possibilità di utilizzare impulsi di gradiente di campo magnetico ha trasformato questo esperimento in un esperimento di routine.

⁷⁷ Bax A., Summers M.F.; *J. Am. Chem.Soc.*, **1986**, *108*, p.2093.

3. Tunicati.

I Cordati (*Chordata*, Bateson 1885) costituiscono un *phylum* di animali comprendente organismi di diversa forma e complessità.



Albero filogenetico

Il *phylum Chordata* è suddiviso in tre *subphyla*:

- Urocordata (o Tunicata)
- Cefalocordata
- Vertebrati

Tra gli invertebrati, i Tunicata sono il gruppo più rappresentativo costituito da piccoli organismi marini, sessili e filtratori, dotati di larve planctoniche che, fissandosi al substrato, raggiungono lo stadio adulto, sviluppando una forma a sacco rivestito da uno strato protettivo detto *tunica*. Questo ha consistenza gelatinosa o coriacea ed è costituito da una sostanza di natura fibrosa secreta dall'epiderma, la tunicina, un polisaccaride avente la stessa composizione chimica della cellulosa. La tunica ha consistenza e spessore molto diverso nelle varie classi ed ordini. Al di sotto della tunica troviamo il corpo le cui cellule sono organizzate, a differenza dei poriferi, in organi e tessuti differenziati; infatti, si distinguono un sistema nervoso, digerente, respiratorio e cardiocircolatorio, anche se piuttosto primitivi.

Da un punto di vista evolutivo, i tunicati sono gli invertebrati più avanzati e si dividono in tre classi:

- ❖ Ascidiacei
- ❖ Larvacei
- ❖ Taliacei

Soltanto le specie appartenenti alla classe degli Ascidiacei presentano accanto alla fase pelagica anche quella bentonica. Ciò si riflette in una maggiore facilità di raccolta e fa sì che gli ascidiacei siano di gran lunga i tunicati più studiati. Sono diffusi da pochi metri sotto il livello del mare fino a 200-300 metri di profondità, ma è soprattutto nei primi 100 m che si rinviene il maggior numero di specie ed individui. Essendo tipici organismi filtranti, sono prevalentemente presenti in ambienti ricchi di materiale in sospensione.

Gli organismi adulti possono presentarsi isolati, ciascuno avvolto da una propria tunica ed in tal caso sono definiti *Ascidiacei semplici*, oppure possono, in seguito a processi di gemmazione, collegarsi tra loro per mezzo di stoloni e formare degli aggregati detti *Ascidiacei aggregati*. In entrambi i casi si parla di *Monoascidie*; si definiscono invece *Sinascidie* gli organismi che, essendo avvolti da una tunica comune, non sono esteriormente individuabili e formano delle colonie. Mentre gli adulti sono sessili (immobili), le larve assomigliano a girini e nuotano in lungo e in largo nel loro ambiente marino. Le larve subiscono una metamorfosi quando trovano un luogo adatto per l'insediamento. Durante la metamorfosi la coda, insieme al notocordo e al tubo neurale, è riassorbita. Questo spiega perché i tunicati sono chiamati *urocordati* (dal greco *uro* = coda). Gli organismi raccolgono e concentrano nel loro flusso sanguigno quantità di vanadio, sebbene la ragione di questo atteggiamento non sia ben compresa.

3.1 Fisiologia dei cordati

Il sistema nervoso dei cordati inizia a prendere forma sul dorso della corda nell'embrione; dapprima si forma, sopra la coda, la piastra neurale, da cui poi si sviluppa il tubo neurale. Nei vertebrati, all'estremità opposta del tubo neurale si forma il cervello; nei cefalocordati tale estremità ha solo dimensioni e diametro maggiori. In ogni caso, i nervi periferici si dipartono dal tubo neurale. Nei vertebrati, il tubo neurale è protetto dalle vertebre, e il cervello è protetto dal cranio. I segmenti della muscolatura sono disposti consecutivamente e simmetricamente ai lati della corda.

Nell'embrione, il tratto anteriore del tubo digerente (detto anche faringe branchiale) è in comunicazione con l'esterno attraverso alcune fessure, che nei pesci rimangono anche nello stadio adulto come branchie. Negli altri cordati esse sono sostituite, durante lo sviluppo, dai polmoni. Sulla faccia ventrale della faringe branchiale c'è un solco detto doccia branchiale. Esso appare rivestito di muco atto a trattenere gli organismi microscopici che servono da nutrimento. Nei vertebrati, la doccia branchiale si separa invece dal tubo digerente per trasformarsi nella tiroide.

Tutti i cordati, allo stadio embrionale, esibiscono una identica distribuzione degli organi (sistema nervoso, coda, aorta dorsale, tubo digerente e il vaso sanguigno principale, ovvero il cuore nei vertebrati). Durante lo sviluppo dell'embrione, la morfologia si diversifica nelle diverse specie.

3.2 Nutrizione e scambi gassosi

Le ascidie che vivono solitarie hanno un'estremità del corpo attaccata al substrato; sulla tunica di molti ascidiacei, specialmente quelli semplici, è possibile scorgere chiaramente due sifoni: uno inalante, deputato all'ingresso dell'acqua e dei nutrienti, ed uno esalante atto ad espellere materiali di rifiuto (Fig. 1). Una corrente d'acqua, prodotta dalle ciglia della faringe, trasporta acqua e plancton attraverso il sifone boccale e all'interno di un cestello branchiale, che occupa buona parte del corpo. L'acqua arriva nell'atrio attraverso le numerose piccole fessure faringee e da qui è scaricata attraverso il sifone atriale.

Altra particolare caratteristica dei tunicati è che riescono a restare in una determinata zona anche in caso di alto inquinamento.

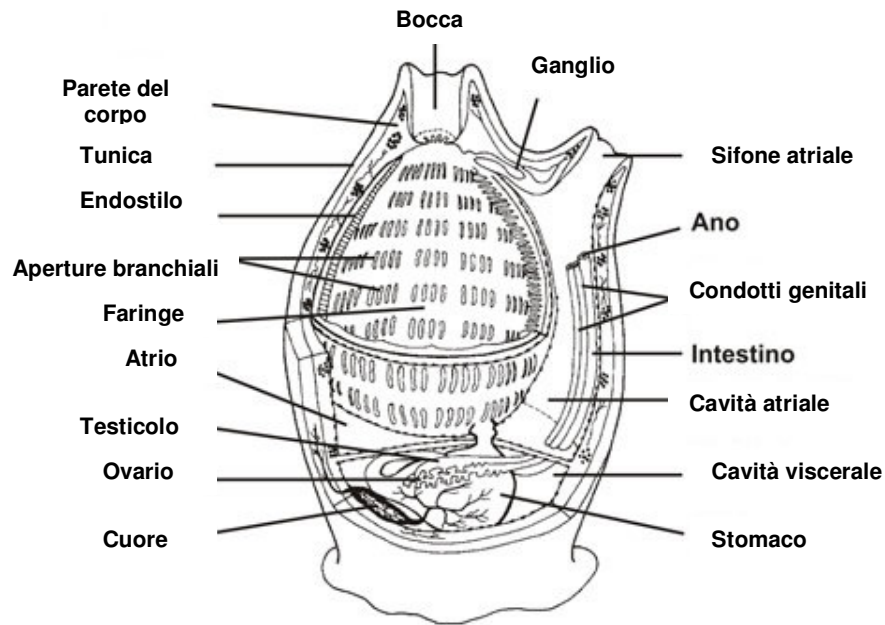


Fig. 1. Anatomia delle ascidie.

3.3 Riproduzione e sviluppo

La maggior parte delle ascidie si riproduce sessualmente per gemmazione. Tutte le specie sono ermafrodite e possiedono un singolo ovaio addominale ed un solo testicolo; l'ovidotto e lo spermidotto si aprono nell'atrio. La fecondazione può essere esterna, con sviluppo planctonico soprattutto nelle specie solitarie. In alternativa, la fecondazione può avvenire all'interno dell'atrio e le uova possono essere incubate in tale sede per l'intera durata dello sviluppo embrionale; le uova fecondate si sviluppano rapidamente in una piccola larva mobile. Una vescicola cerebrale, situata all'estremità del cordone, non deve essere considerata un cervello, ma piuttosto una struttura contenente una statocisti ed una macchia oculare sensibile alla luce. Sin dall'inizio, la larva viene attirata dalla luce e nuota in direzione della superficie. Dopo uno o due giorni di vita pelagica, la sua reazione nei confronti della luce e della gravità si inverte ed essa si porta sul fondo, dove si fissa ad un substrato adatto, per mezzo di secrezioni prodotte dai propri dischi adesivi; successivamente, essa si trasforma nello stadio adulto sessile. Durante la metamorfosi, la coda viene riassorbita, come pure vengono riassorbite la notocorda e la maggior parte del cordone nervoso. Parte della vescicola cerebrale si trasforma in un ganglio localizzato tra due sifoni.

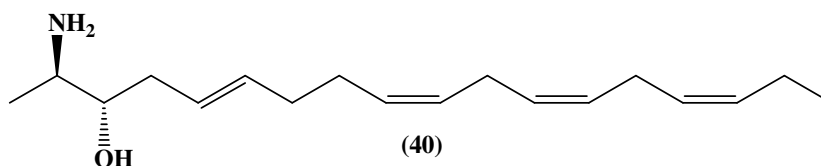
4. Clavaminoli da *Clavelina phlegraea*

L'esteso studio condotto su alcuni esemplari dell'ascidiaceo *Clavelina phlegraea* ha portato all'isolamento di dodici nuovi amminoalcanoli che sono stati completamente caratterizzati. Saggi atti a valutare l'attività biologica dei nuovi metaboliti hanno indicato che alcuni di questi composti sono in grado di modulare la proliferazione di alcune linee cellulari tumorali^{78, 79}.

4.1 Amminoalcoli

I derivati dei 2-ammino-alcanoli sono comunemente presenti nella struttura delle sfingosine anfipatiche, elemento centrale degli sfingolipidi; la lunghezza della loro catena carboniosa varia da C₁₂ a C₃₀, ed esistono anche varianti polinsature.

Le ascidie del genere *Pseudodistoma* e *Clavelina* si sono dimostrate una fonte straordinariamente ricca di 2-ammino-3-idrossiidrocarburi; esempi sono le crucigasterine 225, 275 e 277 (**40**)⁸⁰ e gli obscuraminoli A-F⁸¹ (**41**), 2-ammino-3-alcanoli insaturi e polinsaturi isolati, come i loro derivati diacetilati, rispettivamente dalle ascidie del Mediterraneo *Pseudodistoma crucigaster* e *Pseudodistoma obscurum*.

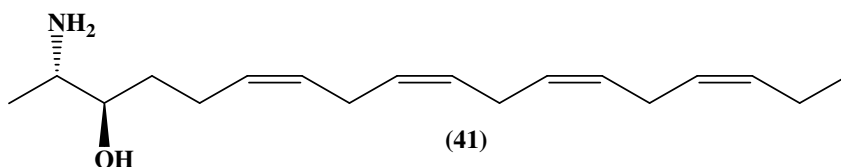


⁷⁸ Aiello, A.; Fattorusso, E.; Giordano, A.; Menna, M.; Navarrete, C.; Munoz, E.; *Biorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, *15*, 2920.

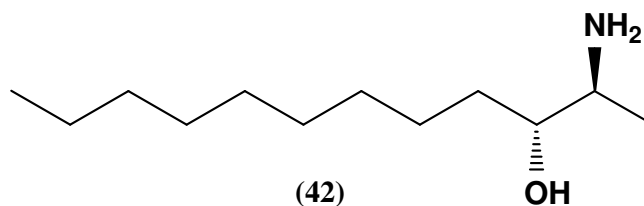
⁷⁹ Aiello, A.; Fattorusso, E.; Giordano, A.; Menna, M.; Navarrete, C.; Munoz, E.; *Biorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, submitted.

⁸⁰ Jares-Erijman, E. A.; Bapat, C. P.; Lithgow-Bertelloni, A.; Rinehart, K. L.; Sakai, R.; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5732

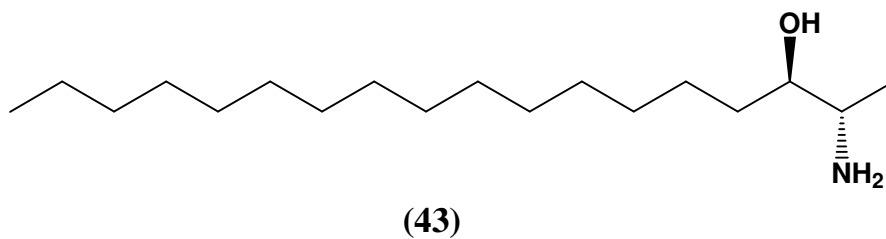
⁸¹ Garrido, L.; Zubia, E.; Ortega, M. J.; Naranjo, S.; Salva, J. *Tetrahedron*. **2001**, *57*, 4579.



Un altro esempio è il (2*S*,3*R*)-2-amminododecan-3-olo (42), un agente antifungineo isolato dall'ascidia *Clavelina oblonga*⁸².



I 2-ammino-3-alcanoli sono stati descritti anche come costituenti antimicrobici delle spugne del Pacifico *Xestospongia sp*^{83,84}, e delle spugne marine tropicali *Haliclona sp*⁸⁵. Infine, dalla *Spisula polynyma* è stato isolato il (2*S*,3*R*)-2-amminotetradecan-3-olo, denominato spisulosina⁸⁶ (43), che è risultato un potente inibitore della proliferazione cellulare.



L'importante attività biologica osservata ha indotto uno studio farmacologico più approfondito volto a chiarire il meccanismo d'azione. La

⁸²Kossuga, M. H.; MacMillan J. B.; Rogers, E. W.; Molinski, T. F.; Nascimento, G. G. F.; Rocha, R. M.; Berlinck, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1879.

⁸³Jiménez, C.; Crews, P.; *Journal of Natural Products.* **1990**, *53*, 978.

⁸⁴Gulavita, N. K.; Scheuer, P. J.; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 366.

⁸⁵Clark, R. J.; Garson, M. J.; Hooper, J. N. A.; *Journal of Natural Products.* **2001**, *64*, 1568.

⁸⁶Cuadros, R.; Montejo de Garcini, E.; Wandosell, F.; Faircloth, G.; Fernández-Sousa, J.M.; Avila, J.; *Cancer Letters* **2000**, *152*, 23.

spisulosina esplica la sua azione prevenendo la formazione delle fibre di actina in culture cellulari⁸⁶ e per le sue proprietà citotossiche è attualmente in fase I di sperimentazione clinica su tumori solidi allo stadio avanzato. Le importanti bioattività riscontrate nei 2-ammino-3-alcanoli finora isolati da differenti specie di organismi marini, sono alla base dell'interesse chimico e farmacologico verso questa classe di composti.

4.2 *Clavelina phlegraea*

Un campione di *Clavelina phlegraea* (Fig. 2) è stato raccolto lungo le coste dell'area flegrea della regione Campania; questo ascidiaceo, che si può trovare fino a 50 m di profondità, presenta una tunica trasparente che rende visibile una faringe piuttosto ampia dotata di 8-12 paia di fenditure faringee sostenute da uno scheletro di chitina attaccato a gavitelli e cime. Sul fondo della faringe corre una doccia ciliata, l'endostilo, cui segue un breve intestino che forma un'ansa ad U e che sbocca con un'apertura anale anch'essa dorsale.



Fig. 2. *Clavelina phlegraea*

Il cuore pulsante si trova dal lato ventrale, mentre dal lato opposto ritroviamo il sistema nervoso che presenta una forma tubulare che nella regione anteriore si dilata in una vescicola cerebrale; questa continua con una coda presente solo nella larva natante e il cui battito provoca un flusso d'acqua che procura l'approvvigionamento del materiale nutritivo.

Mancano gli organi di senso, ma i recettori sono numerosi: quelli per la luce sono dislocati lungo il tubulo neurale. Sin dall'inizio, la larva è attirata dalla luce e nuota in direzione della superficie. Dopo uno o due giorni di vita pelagica, la sua reazione nei confronti della luce e della gravità si inverte ed essa si porta sul fondo, dove si fissa ad un substrato adatto, per mezzo di secrezioni prodotte dai propri dischi adesivi. Durante la metamorfosi, in corrispondenza del piede che deriva dalle due papille adesive, si sviluppano gli abbozzi della gonade maschile e di quella femminile. Gli individui singoli sono riuniti in fitte colonie (ascidiacei aggregati) collegate solo alla base attraverso stoloni.

4.3 Nuovi clavaminoli isolati da *Clavelina phlegraea*

L'esemplare di *Clavelina phlegraea* raccolto lungo le coste partenopee è stato conservato congelato fino all'utilizzo. La procedura di isolamento è schematizzata in Figura 3.

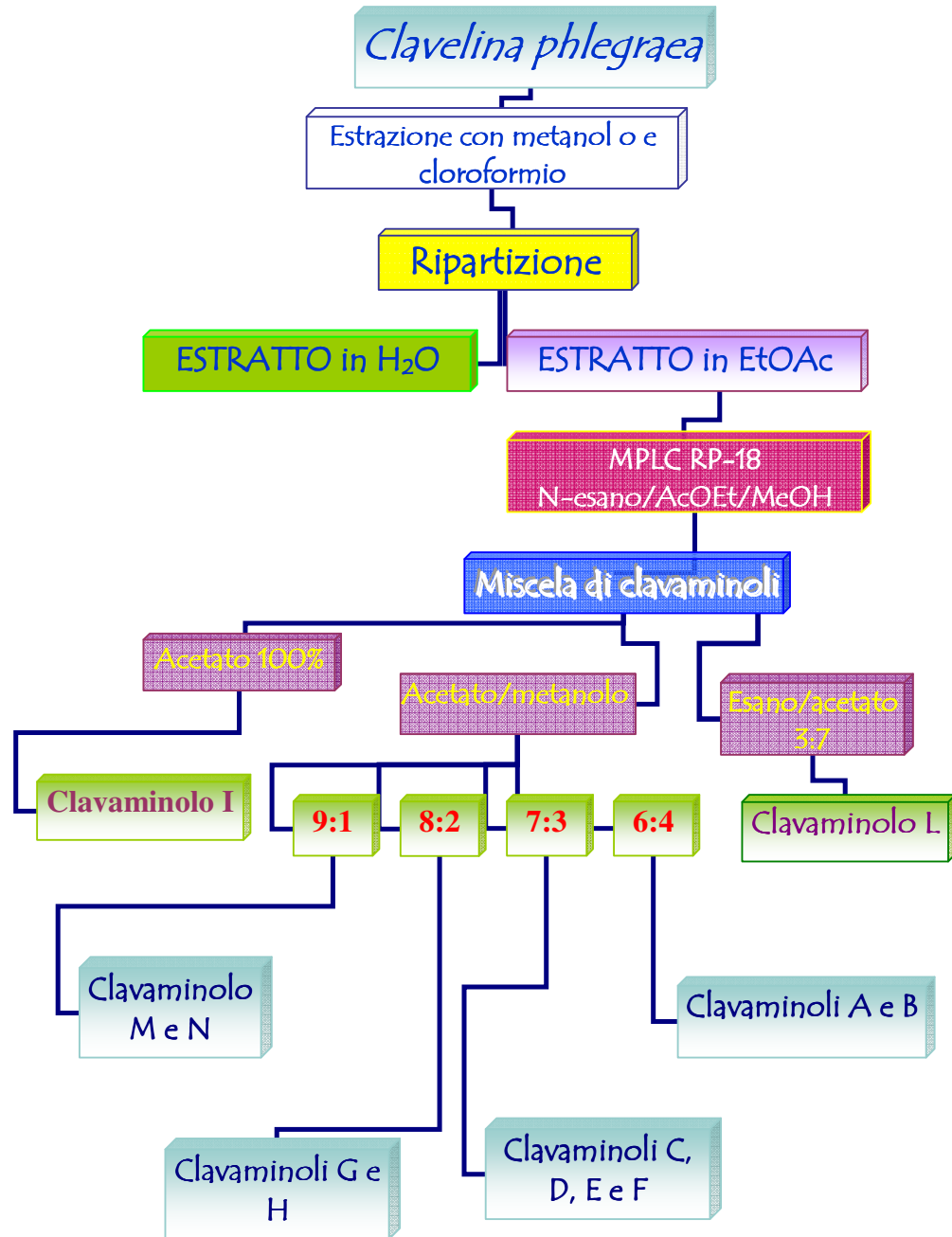


fig. 3: procedura di estrazione ed isolamento dei clavaminoli A-N

L'ascidia è stata omogeneizzata ed estratta a temperatura ambiente con metanolo e, successivamente, con cloroformio. Gli estratti sono stati concentrati sottovuoto e poi riuniti; in seguito, è stata effettuata una ripartizione della sospensione acquosa ottenuta tra acqua ed acetato di etile e tra acqua e butanolo, ottenendo così tre frazioni a differente grado di polarità.

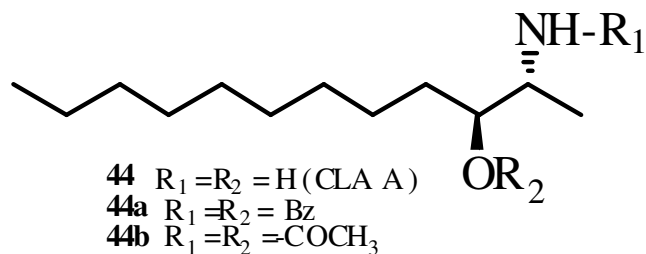
La frazione solubile in acetato di etile è stata cromatografata su colonna flash a fase normale (MPLC) utilizzando un gradiente di eluizione N-esano/AcOEt/MeOH. Le frazioni ottenute da questa prima separazione sono state monitorate spettroscopicamente (NMR) e ciò ha consentito di identificare, in alcune di esse, complesse miscele di ammino-alcooli.

Le frazioni contenenti le miscele sono state poi ulteriormente purificate con successivi passaggi in HPLC fino all'ottenimento del metabolita puro; in particolare la frazione eluita con Esano/Acetato 3:7 ha fornito il clavaminolo L, la frazione eluita con Acetato di etile 100% il clavaminolo I, la frazione eluita con Acetato/Metanolo 9:1 i clavaminoli M ed N, la frazione eluita con Acetato/Metanolo 8:2 i clavaminoli G ed H, la frazione eluita con Acetato/Metanolo 7:3 i clavaminoli C, D, E ed F e la frazione eluita con Acetato/Metanolo 6:4 i clavaminoli A e B.

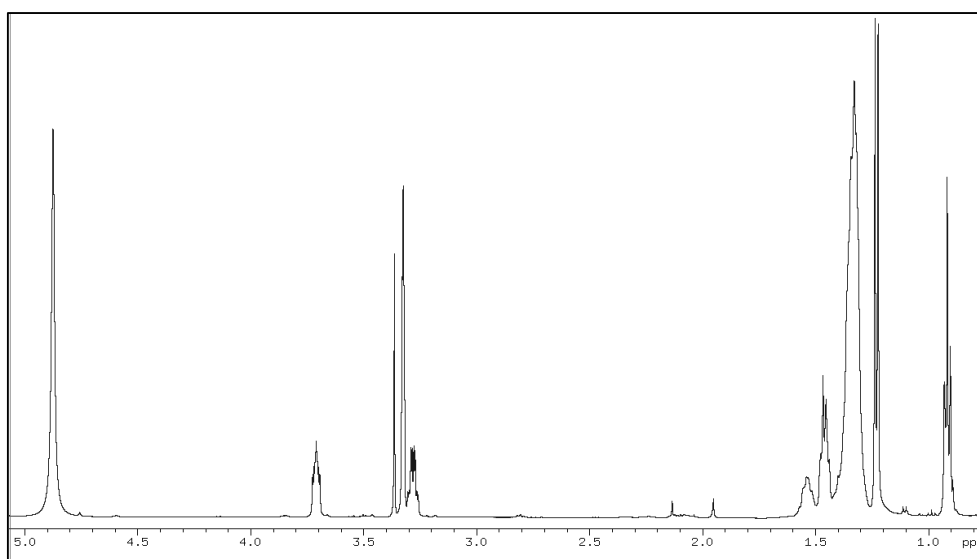
4.3.1 Clavaminolo A

Il clavaminolo A (**44**) appare come un olio giallo otticamente attivo. Lo spettro di massa ESI di **44** ha indicato il picco dello ione pseudomolecolare a m/z

=202 ($M + H^+$). Le misurazioni HRFABMS sullo ione $[M + H]^+$ hanno indicato per **44** la formula molecolare $C_{12}H_{28}NO$ (valore calcolato m/z 202.2178).



Lo spettro 1H NMR di **44** presenta due valori di risonanza a δ 3.29 e 3.70 attribuibili a protoni metinici legati ai carboni supportanti eteroatomi; tale ipotesi è stata avvalorata dalla presenza nello spettro ^{13}C NMR di due segnali a δ 52.37 e 71.38.



1H -NMR del clavaminolo A (44)

I rimanenti segnali dello spettro protonico includono un largo segnale a δ 1.3 – 1.5 dovuto a una serie di protoni metilenici, un doppietto a δ 1.21 e un tripetto a

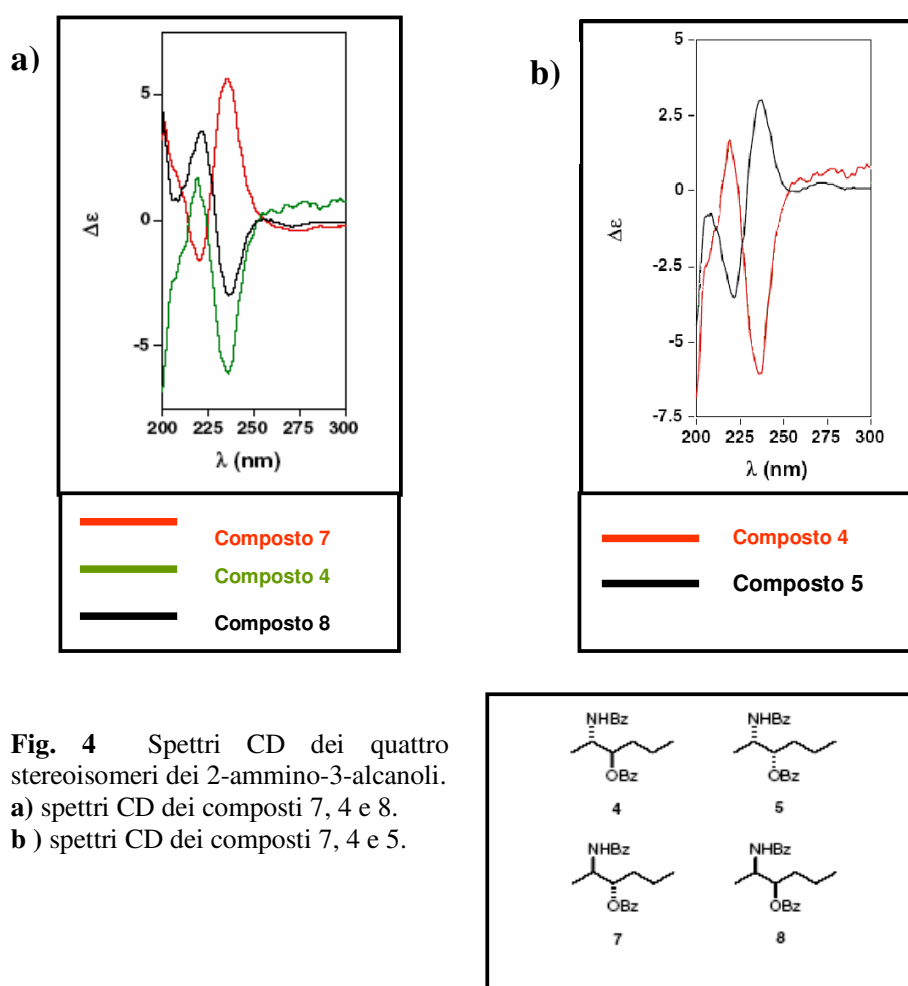
δ 0.90 attribuibili a gruppi metilici, come confermato dalle risonanze presenti a δ 11.87 e 14.04 nello spettro ^{13}C NMR.

La struttura planare del composto **44** è stata facilmente definita come quella di un 2-amminododecan-3-olo, mediante l'interpretazione dei dati 2D NMR (COSY, HSQC, esperimenti HMBC). Infatti, è stato facilmente identificato il sistema di spin C-1/C-12, partendo dai protoni del metile a δ 1.21 (3H-1) accoppiati al protone risonante a δ 3.27 (H-2), il quale risulta accoppiato al protone (multipletto) a δ 3.70 (H-3). I protoni metilenici a δ 1.45 (2H-4) sono risultati correlati con il protone ossimetinico e con i protoni del sistema AB a δ 1.53 e 1.36, assegnati ai protoni legati al C-5 metilenico; ambedue i protoni del sistema AB sono accoppiati ai protoni risonanti a δ 1.30-1.37.

I dati ottenuti per il composto **44** si sono rivelati sovrapponibili a quelli riportati per il 2-ammino-3-alcanolo (**42**) precedentemente isolato da un campione di *C. oblonga*⁸², ad eccezione del valore del potere ottico rotatorio specifico, che, risultando di segno opposto, ha suggerito che il composto **44** potesse essere l'enantiomero dell'amminoalcol precedentemente isolato.

Tuttavia, poiché esiste una grande controversia circa la configurazione relativa ed assoluta di questi 2-ammino-3-alcanoli a lunga catena, la stereochimica del clavaminolo A (**44**) è stata assegnata in modo inequivocabile usando il metodo del dicroismo circolare (CD), recentemente proposto da Kossuga *et al.*⁸², il quale consente assegnazioni attendibili della configurazione relativa ed assoluta dei 2-ammino-3-alcanoli ed è applicabile per l'analisi in microscala. Questo metodo mostra delle grandi differenze nello spettro CD di diastereoisomeri degli N,O-

dibenzoil-2-ammino-3-alcanoli⁸⁷. Gli accoppiamenti eccitonici tra i gruppi benzoilici negli *eritro* e *treo* amminoalcoli dibenzoilati aciclici vicinali danno spettri CD bisegnati opposti in segno e che differiscono per l'ampiezza della banda e per la struttura fine⁸⁷ (Fig. 4).



⁸⁷ Gillian M. N.; Molinski T. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4011.

Il trattamento di **44** con cloruro di benzoile in piridina, seguito da purificazione in HPLC, ha permesso di ottenere il composto N,O-dibenzoilato (**44a**) (Fig. 5).

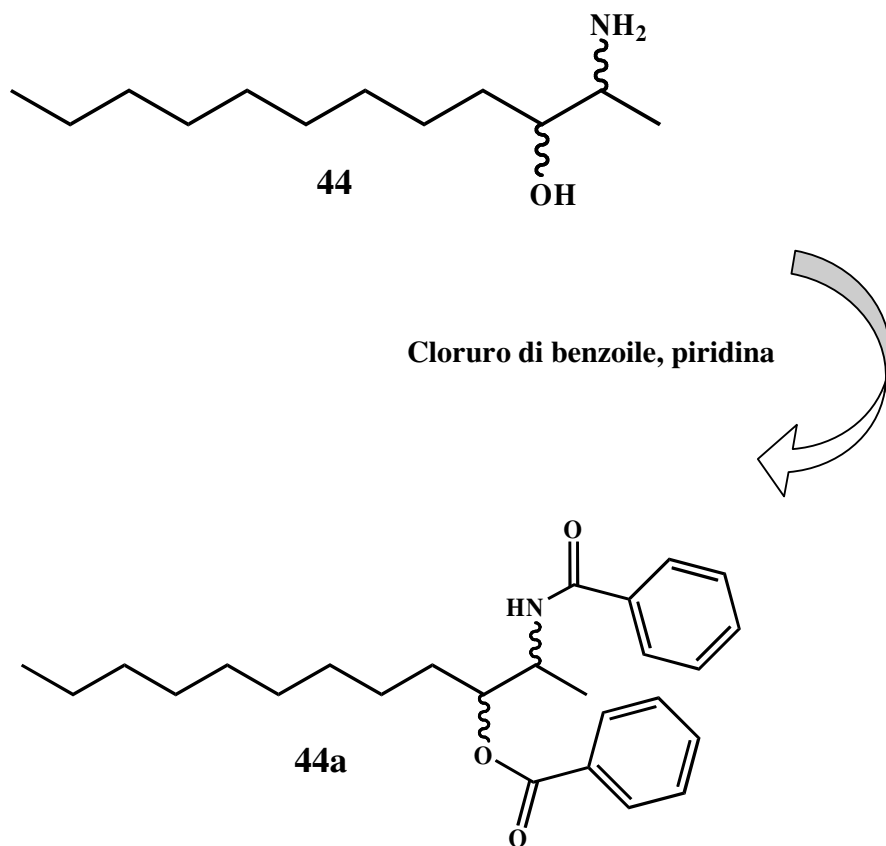


Fig. 5 Preparazione del derivato dibenzoilato **44a**

Il confronto dello spettro CD del composto **44a** con quelli riportati in letteratura per i quattro stereoisomeri del 2-ammino-3-alcololo, ha rivelato

un'eccellente sovrapposizione dello spettro CD di **44a** con quello del diastereoisomero *eritro* ($2R, 3S$)⁸⁷, la cui curva CD è riportata in rosso nella figura 6b.

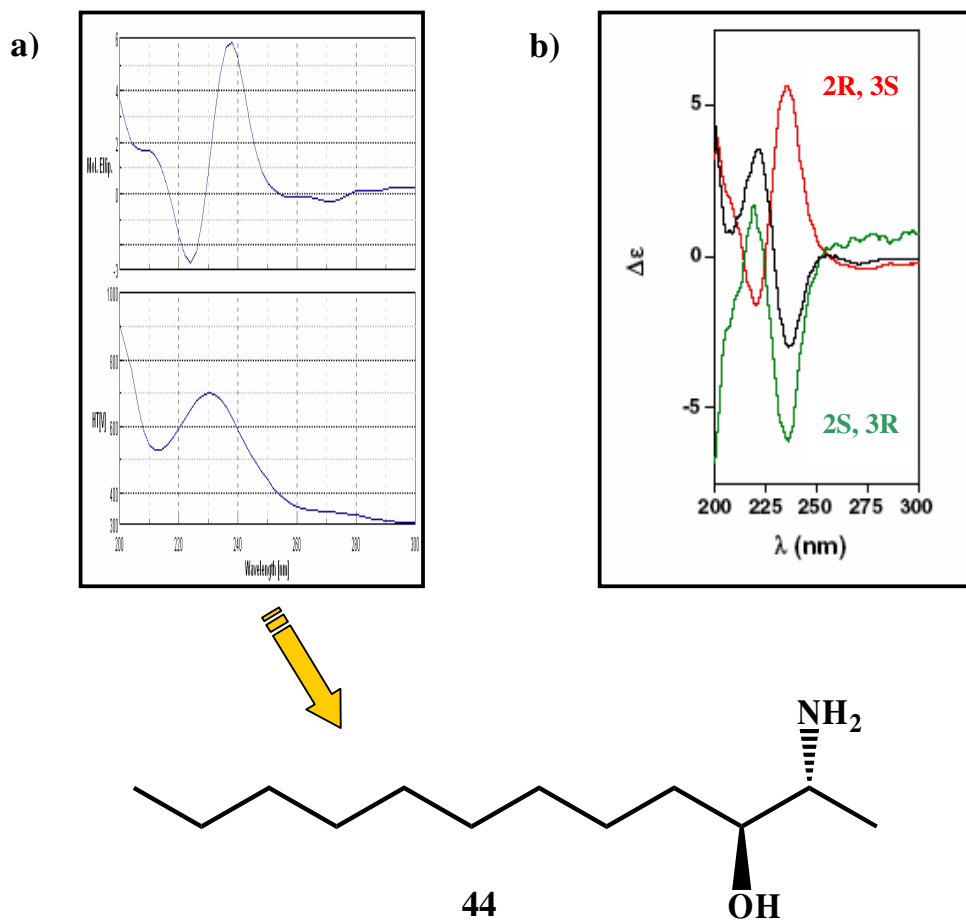


Fig. 6 Confronto dello spettro CD del composto 1 con gli spettri CD di riferimento degli stereoisomeri eritro e treo.

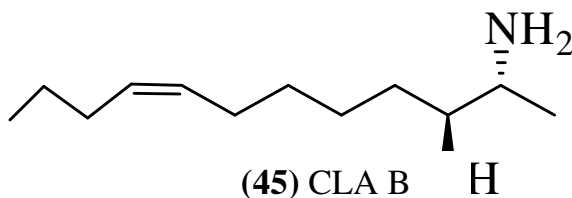
a) spettro CD del composto 44a.

b) spettri CD dei composti 7, 4 e 8⁸⁷.

Inoltre, lo spettro CD del composto **44a** è risultato essere l'immagine speculare di quello del (2S,3R)-2-amminododecan-3-olo (**43**), isolato dalla *C. oblonga*⁸² e, di conseguenza, si è potuto determinare inequivocabilmente che la stereostruttura assoluta del clavaminolo A (**44**) risulta essere quella del (2R,3S)-2-amminododecan-3-olo (Fig. 6).

4.3.2 Clavaminolo B

La formula molecolare C₁₂H₂₆NO ricavata attraverso misurazioni HRFABMS per il clavaminolo B (**45**) ha indicato una relazione tra questo metabolita ed il clavaminolo A (**44**), dal quale differisce per la presenza di una ulteriore in saturazione confermata dagli spettri ¹H e ¹³C NMR; questi spettri presentano, infatti, segnali relativi a due carboni sp² metinici [δ_C 129,65 (2C); δ_H 5,38 (m, 2H)] ed a due metileni allilici [δ_C 26,94 e 29,17; δ_H 2,03 (m, 2H) e 2,08 (m, 2H)].



Chemical shifts e patterns di accoppiamento dei restanti segnali del clavaminolo B (**45**) sono stati assegnati mediante l'ausilio degli esperimenti COSY, HSQC e HMBC e sono risultati molto simili a quelli registrati per il composto **44**.

Il clavaminolo B (**45**) è risultato quindi essere un derivato monoinsaturo del clavaminolo A (**44**).

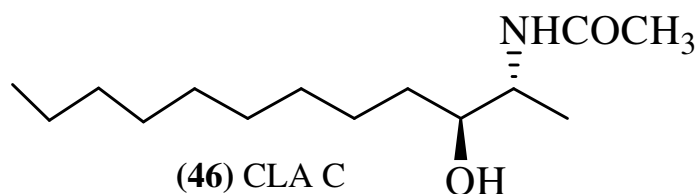
La posizione del doppio legame disostituito in Δ^8 è stata ricavata dall'analisi delle correlazioni presenti negli spettri COSY ed HMBC. Il segnale dei due protoni metilenici allilici a δ 2,03 (2H-10) è risultato correlato al segnale a δ 1,38 attribuito ai due protoni in posizione 11 ed al segnale dei protoni del metile terminale CH_3 -12 a δ 0,90. Inoltre, nello spettro HMBC, è stato osservato un picco di correlazione tra il carbonio metilenico che risuona a δ 14,01 (C-12) ed i protoni allilici a δ 2,03 (2H-10). La configurazione Z del doppio legame è stata dedotta dal valore delle risonanze a campi alti dei segnali dei carboni allilici (δ 26,94, C-7; δ 29,17, C-10)⁸⁸.

La limitata quantità di clavaminolo B (**45**) a disposizione e la richiesta di materiale necessaria per effettuare saggi biologici ha impedito di applicare il metodo del dicroismo circolare per stabilire la configurazione assoluta. Tuttavia, il composto **45** ha mostrato un valore di rotazione ottica negativo in segno e con valore assoluto, analogo a quello del clavaminolo A (**44**). Questo ha suggerito anche per il clavaminolo B (**45**) la stereochimica 2*R*-3*S*, tenendo conto della stretta relazione strutturale tra i due composti.

⁸⁸ Dorman, D. E., Jautelat, M., Roberts, J. D. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2757; Ivanciuc, O., Rabine, J.- P., Cabrol-Bass, D., Panaye, A., Doucet, P. J., *Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 587. Charan, R. D., Garson, M. J., Breton, I. M., Willis, A. C., Hooper, J. N. A., *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 9111.

4.3.3 Clavaminolo C

Per il clavaminolo C (**46**) è stata ricavata la formula molecolare $C_{14}H_{30}NO_2$ dallo spettro di massa ad alta risoluzione (HRFABMS). Il confronto del suo spettro NMR ($CDCl_3$) con quello del clavaminolo A (**44**) registrato con lo stesso solvente (vedi parte sperimentale), ha consentito di identificare la struttura planare di questo composto come quella dell'*N*-acetil-clavaminolo A.



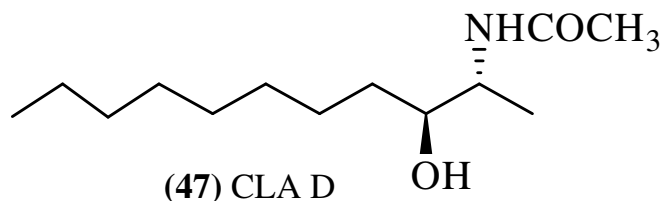
Infatti, oltre alla presenza negli spettri NMR di risonanze attribuibili ad un gruppo acetilico [δ_H 1.99 (s, 3H); δ_C 23.48 (COMe) 170.26 (COMe)], è stato osservato un significativo shift a campi bassi del segnale relativo al protone metinico legato al carbonio supportante l'azoto (δ 4.02, H-2). Lo spettro 1H -NMR ha anche evidenziato un segnale scambiabile a δ 5.80 (NH) accoppiato col protone risuonante a δ 4.02. Una correlazione long range tra questo protone ammidico ed il carbonile risonante a δ 170.26, osservata nello spettro HMBC del clavaminolo C (**46**), ha confermato definitivamente la presenza del gruppo *N*-acetile. La struttura proposta per il composto **46** è risultata in accordo con l'assegnazione completa dei dati ottenuta dall'analisi 2D-NMR, che ha permesso di mettere in relazione tutti i valori di risonanza 1H e ^{13}C .

Per determinare la stereochimica assoluta del clavaminolo C (**46**), un'aliquota di quest'ultimo è stata acetilata per trattamento con anidride acetica e

piridina a temperatura ambiente. Attraverso purificazione tramite HPLC della miscela di reazione, è stato ottenuto un derivato diacetilato che è risultato identico al prodotto ottenuto per trattamento del clavaminolo A (**44b**) nelle stesse condizioni. Infatti, il confronto dei dati spettroscopici e soprattutto delle proprietà ottiche dei prodotti ottenuti dalle due reazioni ha mostrato una perfetta sovrapposizione delle due serie di dati. Questi risultati hanno permesso di assegnare anche al clavaminolo C (**46**) la configurazione 2*R*,3*S*.

4.3.4 Clavaminolo D

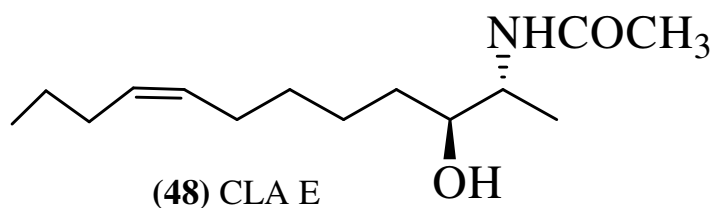
Il clavaminolo **D** (**47**) ha formula molecolare di C₁₃H₂₇NO₂, come indicato da analisi HRFABMS.



Il confronto del suo spettro NMR con quello del clavaminolo C (**46**), ha consentito di identificare facilmente la struttura planare di questo composto come quella di un altro *N*-acetil derivato del clavaminolo A (**44**), che differisce dal composto **46** per un'unità metilenica in meno. Questa struttura, inclusa la stereochimica delle parti funzionalizzate della molecola, è stata confermata dal confronto dei dati NMR e del valore del potere ottico rotatorio del composto **47** con quelli del clavaminolo C (**46**).

4.3.5 Clavaminolo E

Per il clavaminolo E (**48**) la formula molecolare è risultata $C_{14}H_{28}NO$, anch'essa stabilita mediante HRFABMS. Il suo spettro NMR protonico ha mostrato una stretta analogia con quello del clavaminolo C (**46**); le principali differenze erano dovute alla presenza di segnali di protoni e carboni dovuti ad un doppio legame disostituito (δ_H 5,37, m, 2H; δ_C 130,1, 2C).

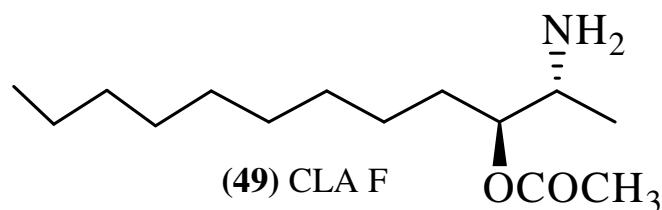


Come precedentemente descritto per il clavaminolo B (**45**), la posizione Δ^8 del doppio legame è stata stabilita attraverso l'analisi delle correlazioni presenti negli spettri 2D NMR.

La configurazione *Z* del doppio legame è stata indicata dai valori di risonanza ^{13}C NMR a δ 27,32 e 29,64 dei carboni C7 e C10. La configurazione assoluta (*2R*, *3S*) del clavaminolo E è stata dedotta attraverso il confronto del potere ottico rotatorio specifico, sia in valore assoluto che in segno, con quello del composto C (**46**). Il clavaminolo E (**48**) è stato identificato come l'*N*-acetamide del clavaminolo B (**45**).

4.3.6 Clavaminolo F

Le misurazioni HRFABMS hanno indicato che anche il clavaminolo F (**49**) possedeva la formula molecolare $C_{14}H_{30}NO_2$ del clavaminolo C (**46**); pertanto, i due composti dovevano essere isomeri.

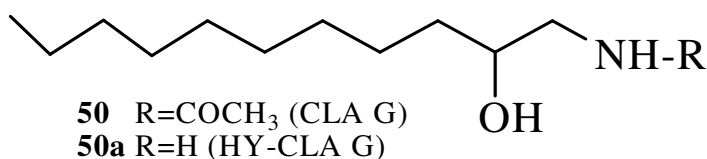


L'analisi dei dati spettroscopici ha indicato chiaramente che le differenze strutturali tra i due composti erano nella parte funzionalizzata della molecola. Infatti, lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del clavaminolo F (**49**) ha mostrato un multipletto risonante a δ 5.22 (H-3), che, nello spettro COSY, è correlato con un segnale metilenico a δ 1.41 e con un segnale a δ 3.54 (H-2), a sua volta accoppiato con il metile risonante come doppietto a δ 1.40. Tutti i segnali dello spettro $^1\text{H-NMR}$ sono stati correlati attraverso l'esperimento HSQC alle relative risonanze del $^{13}\text{C-NMR}$ corrispondenti ai valori di δ 73.40 (C-3), δ 33.86 (C-4), δ 50.74 (C-2) e δ 12.86 (C-1). La presenza di un gruppo acetile è stata indicata da un segnale metilico singoletto a δ 2.20 e dalla risonanza del $^{13}\text{C-NMR}$ a δ 171.82.

Questi dati sono stati coerenti con la presenza, nel clavaminolo F (**49**), di una funzione 2-ammino-3-acetossi al posto della funzione 2-acetammido-3-idrossi presente nel clavaminolo C (**46**). Questa struttura è stata confermata dalle correlazioni presenti nello spettro HMBC, così come dall'acetilazione del clavaminolo F (**49**), che ha prodotto un diacetil derivato con le stesse proprietà spettroscopiche del clavaminolo A diacetilato (**44b**). La determinazione del valore di rotazione ottica del prodotto di acetilazione ottenuto dal clavaminolo F e il confronto con quello del clavaminolo A diacetilato ha permesso di assegnare anche al clavaminolo F (**49**) la stereochimica 2*R*,3*S*.

4.3.7 Clavaminolo G

Il clavaminolo G (**50**) è stato ottenuto come un solido bianco amorfo, otticamente inattivo. Lo spettro di massa ESI registrato in modalità positiva ha indicato lo ione pseudomolecolare a rapporto m/z 230 $[M + H]^+$, il che ha suggerito per il composto **50** la formula molecolare $C_{13}H_{27}NO_2$.



Lo spettro protonico registrato in $CDCl_3$ ha evidenziato un valore di risonanza a δ 3.71 relativo ad un protone metinico legato ad un carbonio supportante un atomo di ossigeno, come confermato dalla correlazione, nello spettro HSQC, con il valore di risonanza del ^{13}C NMR a δ 71.78. I rimanenti segnali dello spettro protonico includono un largo segnale (δ 1.27-1.5) dovuto ad un certo numero di segnali metilenici sovrapposti oltre al segnale di un metile tripletto risuonante a δ 0.89 (δ_C 14.4) (vedi parte sperimentale).

Sulla base dei dati ottenuti dall'analisi 2D NMR (esperimenti COSY, HSQC, HMBC), la struttura planare del composto **50** è risultata quella di una *N*-(2-idrossiundecil) acetammide. Infatti, è stato facilmente identificato un singolo sistema di spin 1H - 1H dal C-1 al C-11, a partire protoni del sistema AB risonanti a δ 3.10 and 3.50 (H-1), che nello spettro COSY risultavano accoppiati al multipletto a δ 3.71 (H-2). Il protone metilenico a δ 1.45 (2H-3, m) ha mostrato un picco di correlazione con il protone ossimetinico in posizione 2 e con il sistema

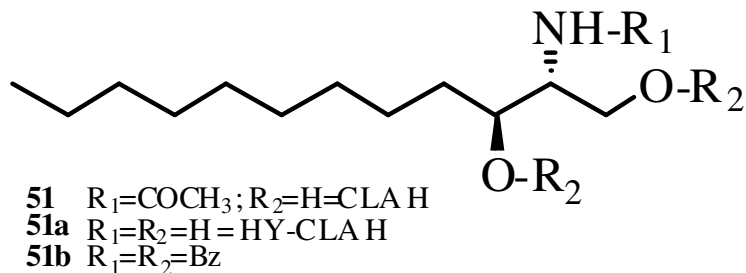
AB risonante a δ 1.43 e 1.31 assegnato ai protoni metilenici sul C-4; entrambi i protoni metilenici erano inoltre accoppiati al gruppo di segnali metilenici sovrapposti risonante a δ 1.27-1.30, a sua volta correlato al metile tripetto a δ 0.89.

Lo spettro protonico ha inoltre rivelato il segnale di un protone scambiabile risonante a δ 5.88 (NH) accoppiato, nello spettro COSY, al sistema AB risonante a δ 3.10 e 3.50 (C-1). Lo spettro HMBC ha mostrato, tra le altre, due significative correlazioni long range, una tra i protoni del sistema AB in C-1 ed il carbonile risonante a δ 170.76 [δ_{H} 2.01 (s, 3H); δ_{C} : 23.52 (COMe)] e l'altra tra questo carbonile ed il segnale scambiabile δ 5.88, confermando così la presenza di un gruppo *N*-acetile legato al C-1. La struttura proposta per il clavaminolo G, totalmente in accordo con i dati relativi ai valori ^1H e ^{13}C ricavati dagli spettri omo ed etero nucleari, è risultata quindi quella di una *N*-(2-idrossiundecil)-acetammide.

La presenza di un centro stereogenico sul carbonio C-3 ed il valore nullo del poter ottico rotatorio specifico hanno indicato che il composto **50** isolato non si trova in una forma enantiomericamente pura, bensì in miscela racemica.

4.3.8 Clavaminolo H

Il clavaminolo H (**51**) appare come una polvere bianca. Il suo spettro di massa ESI (ioni positivi) ha mostrato il picco dello ione pseudomolecolare a m/z =260 [M + H]⁺. Le misurazioni HRFABMS sullo ione [M + H]⁺ hanno indicato per il composto la formula molecolare C₁₄H₃₀NO₃ (valore calcolato m/z = 260.2226).



La struttura planare del clavaminolo H (**51**) è stata facilmente definita mediante l'interpretazione dei dati 2D NMR (COSY, HSQC, esperimenti HMBC). Lo spettro 1H NMR ($CDCl_3$) del composto **51** presenta quattro segnali, a δ 4.02 (dt), 3.85 (m), 3.80 (m) e 3.77(m), attribuibili ad altrettanti protoni legati a carboni supportanti eteroatomi. L'analisi dello spettro HSQC ha messo in evidenza che i segnali a δ 4.02 e 3.77 correlano con lo stesso carbonio metilenico risuonante a δ 62.71 e che quindi costituiscono un sistema AB relativo ad una funzione alcolica primaria adiacente ad un centro stereogenico. Le correlazioni osservate per gli altri due segnali sopra menzionati, quelli a δ 3.85 e 3.80, con carboni metinici risuonanti a δ 53.93 e 74.65, rispettivamente, hanno fatto supporre la presenza di un'altra funzione alcolica, in questo caso secondaria, e di un carbonio metinico legato ad azoto. I rimanenti segnali dello spettro protonico includono un largo segnale a δ 1.28 – 1.30 dovuto a una serie di protoni metilenici sovrapposti, un segnale tripletto integrante per tre protoni a δ 0.88, che correla nello spettro HSQC con un carbonio metilico a δ 14.44, ed un segnale scambiabile in D_2O a δ 6.40. Quest'insieme di dati NMR ha suggerito per il clavaminolo H (**51**) una struttura simile alla sfingosina. Seguendo le correlazioni nello spettro COSY a partire dal sistema AB a δ 4.02 e δ 3.77, è stato individuato un unico sistema di spin, dal C-1 fino al C-12. In particolare, per quanto riguarda la parte

funzionalizzata della molecola, i protoni metilenici a δ 4.02 e δ 3.77 sono risultati accoppiati con il protone metinico δ 3.85, a sua volta correlato con il protone metinico risuonante a δ 3.80. Quest'ultimo segnale ha mostrato una correlazione con un segnale a δ 1.56. Inoltre, il protone metinico a δ 3.85 (C-2) è risultato anche accoppiato, nello spettro COSY, con il segnale scambiabile a δ 6.40 (NH). Nello spettro HMBC si è osservata una correlazione tra un carbonile risuonante a δ 171,08 [δ_{H} : 2,05 (s, 3H); δ_{C} : 23,69 (COMe)] ed il protone scambiabile a δ 6.40. Questo dato, insieme con il valore di chemical shift del C-2 (δ 3.85) relativamente alto per un protone metinico legato ad un gruppo amminico, ha indicato la presenza di un gruppo *N*-acetile legato al C-2. La struttura planare del clavaminolo H (**51**) è stata quindi dedotta come N-(1,3-diidrossidodecan-2-il) acetamide .

Per quanto riguarda l'analisi configurazionale del clavaminolo H (**51**), come è stato fatto precedentemente per il clavaminolo A (**44**), la determinazione della stereochimica assoluta dei carboni 2 e 3 è stata realizzata utilizzando il metodo del dicroismo circolare recentemente proposto da Kossuga et al⁸². Tale metodo richiede che gli aminoalcoli siano completamente derivatizzati con un reagente che possieda un anello aromatico cromoforo, tale da consentire un trasferimento di elettroni nelle bande energetiche sufficientemente forte da indurre l'effetto Cotton. Per tale motivo, il composto **51** è stato sottoposto ad idrolisi acida; il composto naturale è stato trattato con una soluzione 1N di HCl in H₂O ad una temperatura di 80 °C per una notte. Successivamente, è stato allontanato il solvente mediante evaporazione sotto azoto ed il residuo è stato purificato mediante HPLC. In questo modo si è ottenuto circa 1 mg di 2-aminododecano-

1,3-diolo puro (**51a**). Un'aliquota di questo composto è stata trattata con cloruro di benzoile in piridina a 40°C, per una notte; in tale modo il composto **51** è stato convertito nel suo *N,O,O'*-tribenzoil derivato (**51b**).

Per l'analisi configurazionale, è stato registrato lo spettro CD del derivato **51b** ed è stato confrontato con quelli degli stereoisomeri (*2S, 3R*)-eritro e (*2S, 3S*)-treo del composto modello 2-aminoesano-1,3-diolo riportati in letteratura⁸⁷ (Fig. 7).

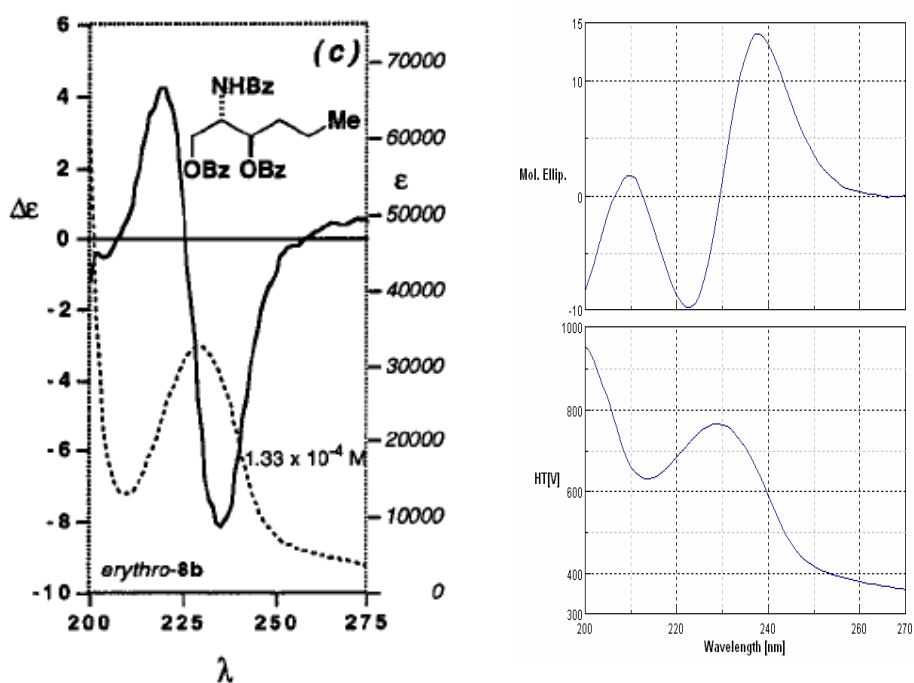
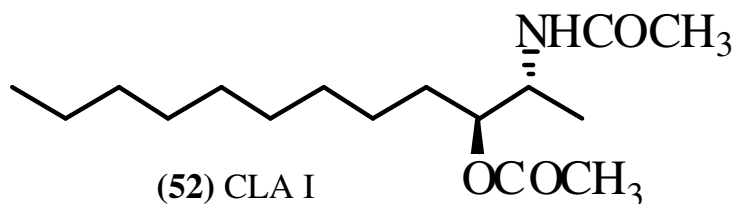


Fig. 7: Confronto dello spettro CD riportato in letteratura per il composto (*2S,3R*)-2-aminoesano-1,3-diolo con lo spettro CD del composto **51b**.

È stato osservato che la curva dello spettro CD del composto **51b** è l'immagine speculare di quella ottenuta per lo stereoisomero (*2S,3R*)-2-aminoesano-1,3-diolo e di conseguenza, è stata determinata per i carboni 2 e 3 del clavaminolo H (**51**) la stereochimica assoluta *R* ed *S*, rispettivamente. La stereostruttura del clavaminolo H (**51**) è risultata quindi quella della *N*-[(*2R,3S*)-1,3-diidrossidodecan-2-il] acetamide.

4.3.9 Clavaminolo I

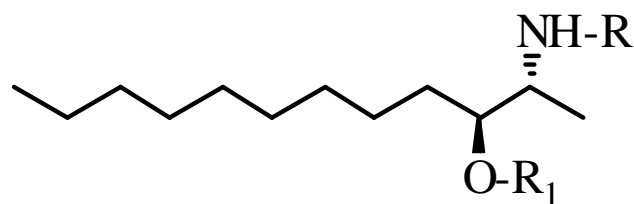
Il clavaminolo I (**52**) possiede la formula molecolare $C_{16}H_{32}NO_3$, come risultato dalle analisi HRFABMS. I valori di risonanza NMR presenti nello spettro protonico e ^{13}C , nonché il valore del potere ottico rotatorio specifico, sono risultati praticamente identici a quelli del composto semisintetico **44b**, descritto precedentemente ed ottenuto dall'acetilazione completa del clavaminolo A (**44**).



Questa struttura, inclusa la stereochimica delle parti funzionalizzate della molecola, è stata proprio confermata dal confronto dei dati NMR e del valore del potere ottico rotatorio specifico con quelli del composto **44b** ed è risultata quella di un acetato di (2*R*, 3*S*)-2-acetamidododecan-3-ile.

4.3.10 Clavaminolo L

Le analisi HRFABMS hanno indicato per il clavaminolo L (**53**) uno ione molecolare a $m/z = 272.2231$ $[M + H]^+$, suggerendo la formula molecolare $C_{15}H_{30}NO_3$.



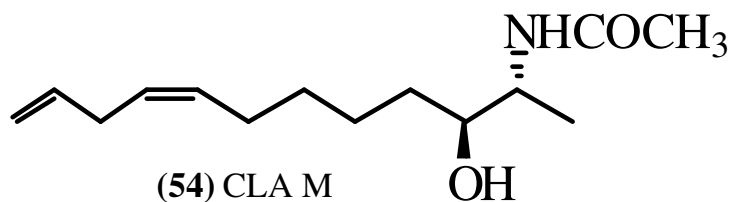
53 R=CHO;R₁= COCH₃ CLA L
53a=44 R=R₁=H

Lo spettro protonico del composto **53** presenta segnali di protoni metinici a δ 4.27 (dt) e 4.84 (m), indicativi di due protoni legati a carboni supportanti eteroatomi, come indicato nello spettro HSQC dove questi segnali sono risultati correlati ai valori di risonanza dello spettro ¹³C-NMR, rispettivamente a δ 46.19 (C-2) e 76.43 (C-3). Lo spettro NMR ha indicato anche la presenza di un protone scambiabile a δ 5.87 (NH) accoppiato, nello spettro COSY, ai protoni risonanti a δ 4.27 e δ 8.11(s). Un intenso picco di correlazione è stato osservato, inoltre, nello spettro HSQC tra il carbonio a δ 160.46 ed il protone singoletto a δ 8.11, a sua volta accoppiato con una correlazione long-range nello spettro HMBC con il carbonio a δ 46.19 (C2); ciò ha indicato la presenza di un gruppo *N*-formile legato al C-2. La presenza di un gruppo acetile è stata indicata dal segnale di un protone metilico risonante a δ 2.10 (s) e dal tipico valore di risonanza ¹³C NMR a δ 171.50; inoltre, un picco di correlazione tra questo carbonile ed il protone risonante a δ 4.83, osservata nello spettro HMBC, ha definitivamente confermato la presenza del gruppo *O*-acetile. Le analisi dei dati spettroscopici hanno indicato chiaramente che le differenze strutturali tra il clavaminolo I (**52**) ed L (**53**) risiedono nella parte funzionalizzata della molecola. Al fine di stabilire la stereochimica del clavaminolo L (**53**), il composto è stato idrolizzato mediante metanolisi acida con una soluzione 1 N HCl in H₂O a 80°C per una notte, e

successivamente la miscela di reazione è stata portata a secco fornendo 1,7 mg del 2-aminododecan-3-olo (**53a**) puro; questo composto è risultato perfettamente identico al clavaminolo A (**44**), come evidenziato dal confronto dei dati di NMR e del potere ottico rotatorio specifico, suggerendo per il clavaminolo L (**53**) la stereochimica di tipo (2*R*, 3*S*). La struttura del composto **53** è quindi risultata quella dell'acetato di (2*R*, 3*S*)-2-formammidododecan-3-ile.

4.3.11 Clavaminolo M

La formula molecolare C₁₄H₂₆NO₂ ottenuta per il clavaminolo M (**54**) ha evidenziato la presenza di due gradi di insaturazione.



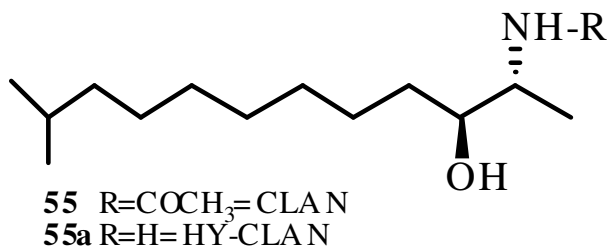
In effetti, lo spettro protonico presenta i segnali di due protoni risonanti a δ 4.03 e 3.65, caratteristici segnali a campi bassi di una porzione amino alcolica, di un metile doppietto a δ 1.09 di quattro protoni metilenici, nonché di un diagnostico pattern di segnali relativo alla presenza di due doppi legami interrotti da un carbonio metilenico, facilmente riconosciuto dai dati di risonanza NMR. La presenza delle risonanze di un sistema vinilico ABX è stata infatti indicata dai segnali di tre protoni risonanti a δ 4.98 (dd), 5.04 (dd) e 5.82 (tdd), mentre il valore di risonanza di due protoni a δ 5.42 ha suggerito la presenza di un secondo doppio legame; ciò è stato confermato dall'analisi dello spettro HSQC che ha

mostrato valori di risonanza tipici di carboni alchenici a δ 130.49 (C8), 126.77 (C9), 137.05 (C11) e 114.51 (C12). Nello spettro COSY entrambi i segnali a δ 5.42 e 5.82 sono risultati accoppiati al segnale metilenico a δ 2.79 il quale, nello spettro HMBC, ha presentato correlazione con i carboni di tutti i protoni alchenici, indicando quindi la presenza di due doppi legami non coniugati in Δ^8 e Δ^{11} . La configurazione *Z* del doppio legami interno tra C8-C9 è stata dedotta dai valori di risonanza a campi alti dei segnali dei carboni allilici (δ 27.11, C-7; δ 31.23, C-10)⁸⁸. Sulla base delle correlazioni evidenziate dagli spettri COSY ed HMBC, il segnale dei due protoni allilici metilenici risonanti a δ 2.06 (2H-6) è risultato accoppiato al segnale a δ 1.40, a sua volta correlato al sistema AB risonante a δ 1.37 e 1.51 (H5, $C_\delta=25.48$) ed ai carboni metinici legati ad atomi di ossigeno ed azoto (risonanti rispettivamente a δ 74.32 e 49.40). Inoltre, il protone metinico a δ 4.03 (C-2) è correlato al segnale di un protone scambiabile a δ 5.73 (NH), a sua volta accoppiato nello spettro HMBC al carbonile a δ 169.77 [δ_H 1.99 (s, 3H); δ_C : 23.45 (COMe)], indicando la presenza di un gruppo *N*-acetile legato al C-2.

La scarsa quantità di clavaminolo M (**54**) disponibile, nonché le quantità richieste per i saggi di attività biologica, non hanno consentito di applicare sul composto **54** il metodo del dicroismo circolare per determinare la stereochimica dei carboni C-2 e C-3. Tuttavia, il clavaminolo M (**54**) ha mostrato un valore negativo del potere ottico rotatorio specifico simile a quello del clavaminolo E (**48**). Questo ha suggerito la stessa stereochimica (2*R*, 3*S*) del composto **48**, anche sulla base delle analogie strutturali tra i due composti. Per tale motivo il composto **54** è stato identificato come una *N*-((2*R*, 3*S*, *Z*)-3-idrossidodeca-8,11-dien-2-il)acetammide.

4.3.12 Clavaminolo N

Il clavaminolo N (**55**) ha formula molecolare C₁₅H₃₁NO₂, come stabilito da analisi HRFABMS. Gli spettri ¹H e ¹³C NMR del metabolita **55** ed il valore del potere ottico rotatorio specifico sono risultati coincidenti con quelli del clavaminolo C (**46**) precedentemente descritto, se non per la presenza di un metile doppietto in **55** (δ_H 0.88; δ_C : 22.87; H-12-13) al posto del metile tripletto in (**46**).



Ciò ha indicato che il clavaminolo N (**55**) si differenzia dal clavaminolo C (**46**) per la presenza, in posizione terminale della catena alchilica, di un residuo isopropilico. Questa struttura, inclusa la stereochimica delle parti funzionalizzate della molecola, è stata confermata dal confronto dei dati NMR e del valore del potere ottico rotatorio specifico con quelli del composto **46** ed è risultata quella di un acetato di (2*R*, 3*S*)-2-acetammidododecan-3-ile.

Tabella 2. ¹H NMR per i clavaminoli A-F (44-49)

POS.	44 ^a δ_H (mult. J) ^a	45 ^a δ_H (mult. J) ^a	46 ^b δ_H (mult. J) ^b	47 ^b δ_H (mult. J) ^b	48 ^b δ_H (mult. J) ^b	49 ^b δ_H (mult. J) ^b
1	1.21 (d, 6.9)	1.21 (d, 6.9)	1.10 (d, 6.9)	1.09 (d, 6.9)	1.09(d, 6.9)	1.40(d, 6.6)
2	3.27 (dq, 2.94; 6.9)	3.25 (dq, 2.8; 6.9)	4.02 (m)	4.01 (m)	4.01 (m)	3.54 (m)
3	3.70 (m)	3.68 (m)	3.64 (m)	3.64 (m)	3.64 (m)	5.22 (m)
4	1.45 (m)	1.45 (m)	1.40 (m)	1.40 (m)	1.41 (m)	1.41 (m)
5	1.53 (m) 1.36 (m)	1.53 (m) 1.34 (m)	1.48 (m) 1.30 (m)	1.48 (m) 1.30 (m)	1.50 (m) 1.33 (m)	1.65 (m) 1.51 (m)
6	1.30-1.37 (m)	1.41 (m)	1.28-1.31(m)	1.28- 1.31(m)	1.40 (m)	1.27-1.31 (m)
7	1.30-1.37 (m)	2.08 (m)	1.28-1.31(m)	1.28- 1.31(m)	2.03 (m)	1.27-1.31 (m)
8	1.30-1.37 (m)	5.38 (m)	1.28-1.31(m)	1.28- 1.31(m)	5.37 (m)	1.27-1.31 (m)
9	1.30-1.37 (m)	5.38 (m)	1.28-1.31(m)	1.27 (m)	5.37 (m)	1.27-1.31 (m)
10	1.29 (m)	2.03 (m)	1.26(m)	1.29 (m)	2.01 (m)	1.26 (m)
11	1.30 (m)	1.38(m)	1.29(m)	0.88 (t, 6.9)	1.36 (m)	1.29 (m)
12	0.90 (t, 7.0)	0.90 (t, 7.0)	0.88 (t, 7.0)	-	0.91 (t, 7.0)	0.88 (t, 7.0)
COMe	-	-	1.99 (s)	1.99 (s)	1.99 (s)	2.20 (s)
NH	-	-	5.80 (brd, 7.1)	5.76 (brd, 7.0)	5.76(brd, 7.0)	-

Tabella 3. ¹³C NMR per i clavaminoli A-F (44-49)

POS.	44 ^a	45 ^a	46 ^b	47 ^b	48 ^b	49 ^b
1	11.87	11.95	14.10	14.26	14.25	12.86
2	52.36	52.32	49.55	49.75	49.77	50.74
3	71.38	71.45	74.31	74.51	74.51	73.40
4	33.74	33.68	33.63	33.63	33.82	33.86
5	26.55	26.74	26.10	26.21	26.08	30.81
6	30.3	30.3	30.3	30.0	30.29	29.65
7	30.3	26.94	30.3	30.0	27.32	29.65
8	30.3	129.65	30.3	30.0	130.10	29.65
9	30.3	129.65	30.3	32.1	130.10	29.65
10	32.65	29.17	31.95	22.91	29.64	32.10
11	23.32	22.74	22.80	14.41	23.06	22.94
12	14.04	14.01	14.11	-	14.3	14.42
-COMe	-	-	23.48	23.72	23.66	22.02
-CO-	-	-	170.26	170.17	170.26	171.82

^aDati registrati in CD₃OD. ^bDati registrati in CDCl₃.

Tabella 4. ¹H NMR per i clavaminoli G-N (50-55)

POS.	50 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>	51 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>	52 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>	53 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>	54 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>	55 ^a <i>δ_H (mult. J)</i>
1	3.10 (2.61, 6.80) 3.50(ddd,2.61, 6.80)	4.02(dd,3.57, 11.04) 3.77 (m)	1.10 (d, 7.15)	1.14 (d, 7.17)	1.09(d, 7.12)	1.08(d, 6.83)
2	3.71 (m)	3.85(m)	4.16 (m)	4.27(m)	4.03 (dq, 7.48)	4.02 (dq, 2.76, 7.45)
3	1.45 (m)	3.80 (m)	4.83 (m)	4.84 (m)	3.65 (m)	3.65 (m)
4	1.43 (m) 1.31	1.56 (m)	1.55 (m) 1.50 (m)	1.43 (m)	1.41 (m)	1.41 (m)
5	1.27-1.30(m)	1.52 (m) 1.35 (m)	1.27(m)	1.58 (m) 1.49 (m)	1.51 (m) 1.37 (m)	1.49 (m) 1.32 (m)
6	1.27-1.30(m)	1.28-1.30(m)	1.25-1.28(m)	1.26-1.29(m)	1.40 (m)	1.28(m)
7	1.27-1.30(m)	1.28-1.30(m)	1.25-1.28(m)	1.26-1.29(m)	2.06, J=7.10	1.28(m)
8	1.27-1.30(m)	1.28-1.30(m)	1.25-1.28(m)	1.26-1.29(m)	5.42 (m)	1.28(m)
9	1.26(m)	1.28-1.30(m)	1.25-1.28(m)	1.26-1.29 (m)	5.42 (m)	1.27(m)
10	1.29(m)	1.26 (m)	1.26 (m)	1.26 (m)	2.79, J=7.10	1.18 (m)
11	0.89 (t, 6.85)	1.29 (m)	1.30 (m)	1.28 (m)	5.82 (ddq,17.12,10.35)	1.53 (m)
12	-	0.88 (t, 6.88)	0.88 (t, 6.80)	0.88 (t, 6.7)	5.04 (dq, 3.59,1.81,17.12) 4.98 (dq, 3.59,1.81,10.35)	0.88 (d, 6.70)
13	-	-	-	-	-	0.88 (d, 6.70)
NH	5.88(brs)	6.40(brd, 7.5)	5.78(brd, 7.7)	5.88(brd, 6.9)	5.74(m)	5.77(brd, 7.06)
-NHCOCH₃	2.01(s)	2.05(s)	1.95(s)	-	1.99(s)	1.97(s)
-NHCOC₃H₇	-	-	-	-	-	-
-OCOC₃H₇	-	-	2.10(s)	2.10(s)	-	-
-OCOC₃H₇	-	-	-	-	-	-
-NHCOH	-	-	-	8.11(s)	-	-
-NHCOH	-	-	-	-	-	-
-OH	-	-	-	-	2.16 (s)	2.15

^aDati registrati in CDCl₃.

Tabella 5. ^{13}C NMR per i clavaminoli G-N (50-55)

POS.	50 ^a	51 ^a	52 ^a	53 ^a	54 ^a	55 ^a
1	46.08	62.71	14.8	14.77	13.95	14.38
2	71.7	53.93	47.7	46.19	49.40	49.66
3	35.41	74.65	77.2	76.43	74.32	74.50
4	25.72	34.77	31.51	32.58	33.47	33.82
5	29.7	26.25	25.8	31.02	25.48	26.18
6	29.7	29.7	29.6	29.3	29.36	29.86
7	29.7	29.7	29.6	29.3	27.11	29.86
8	29.7	29.7	29.6	29.3	130.49	29.86
9	32.08	29.7	29.6	29.2	126.77	27.57
10	22.95	32.16	32.05	31.87	31.23	39.20
11	14.4	22.94	22.93	22.70	137.05	28.14
12	-	14.44	14.1	14.1	114.51	22.87
13	-	-	-	-	-	22.87
NH	-	-	-	-	-	-
-NHCOCH₃	23.52	23.69	23.74	-	23.45	23.70
-NHCOCH₃	170.76	171.08	168.9	-	169.77	170.15
-OCOCH₃	-	-	21.4	20.86	-	-
-OCOCH₃	-	-	171.34	171.50	-	-
-NHCOH	-	-	-	-	-	-
-NHCOH	-	-	-	160.46	-	-
-OH	-	-	-	-	-	-

^aDati registrati in CDCl₃.

4.4 Attività biologica dei clavaminoli A-N

In collaborazione con l'università di Cordova, in Spagna, è stata valutata l'attività dei clavaminoli A-N (**44-55**) sulla vitalità delle linee cellulari AGS (carcinoma gastrico), A549 (cancro del polmone) e T47D (cancro alla mammella).

4.4.1 Saggio dell'uptake della calceina

L'attività dei clavaminoli A-N (**44-55**) su diverse linee cellulari tumorali è stata valutata effettuando il saggio sensibile della calceina-AM. La calceina-AM è un colorante fluorescente, altamente liposolubile, che penetra rapidamente le membrane citoplasmatiche; la successiva idrolisi dei legami esterei da parte delle esterasi endogene, determina il rilascio del derivato idrofilo ancora fluorescente, ma non più in grado di riattraversare la membrana citoplasmatica.

Le linee cellulari AGS, A549 e T47D sono state coltivate con mezzo completo, in piastre da 96 pozzetti (10^4 cellule) e incubate con concentrazioni crescenti del clavaminolo testato per 24 ore. Successivamente è stata aggiunta calceina-AM ad una concentrazione di $1\mu\text{M}$ e le cellule sono state incubate per 60 minuti. L'uptake della calceina è stato poi interrotto trasferendo le piastre su ghiaccio e lavando per due volte le cellule con HBSS a 4°C . L'analisi della fluorescenza è stata effettuata utilizzando un fluorimetro Tecan Pro, con un valore di lunghezza d'onda di eccitazione pari a 485nm ed una di emissione a 535nm .

I test condotti sui clavaminoli hanno evidenziato per il clavaminolo A una moderata citotossicità con una IC_{50} di circa $5\ \mu\text{g/mL}$. Una simile attività antitumorale, sebbene meno potente e selettiva, è stata descritta anche per altre

due linee cellulari testate: A549 (cancro del polmone) e T47D (cancro alla mammella)⁸⁵ (Fig.8).

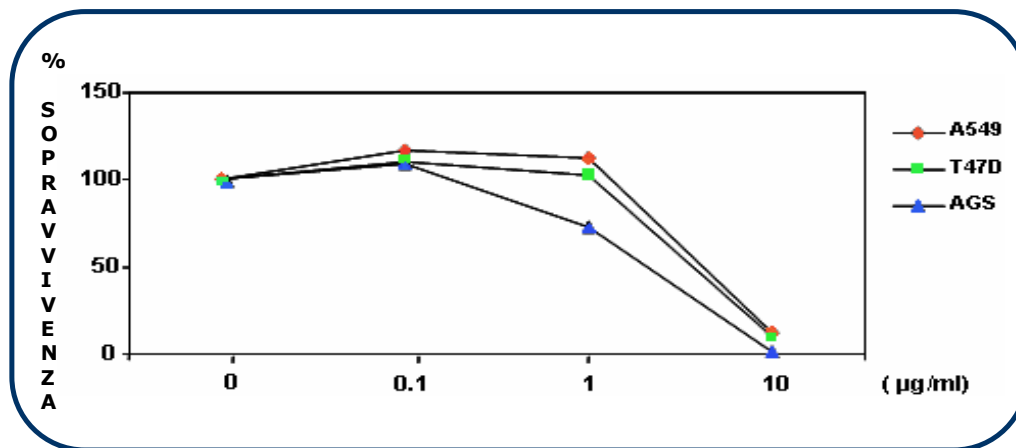


Fig. 8. Effetti del Clavaminolo A (**1**) sulla vitalità delle linee cellulari: A549 (carcinoma polmonare), T47D (carcinoma mammario) e AGS (carcinoma gastrico).

A tale proposito va messo in evidenza che la spisulosina⁸⁴, un analogo del clavaminolo A (**44**) possiede rispetto a quest'ultimo, oltre ad una catena alchilica più lunga, la configurazione (2*S*,3*R*), opposta a quella del metabolita **44** e ciò potrebbe spiegare la sua attività notevolmente più alta⁸⁴ rispetto a quella del clavaminolo A (**44**).

4.4.2 *Determinazione del ciclo cellulare e della frammentazione del DNA*

Il test della calcina-AM è un potente metodo per lo screening di composti citotossici; tuttavia, esso non fornisce alcuna indicazione su quale dei due principali pathways biologici responsabili della morte cellulare, necrosi ed apoptosi, siano coinvolti. Per questo motivo, è stato indagato l'effetto del clavaminolo A sull'apoptosi cellulare in cellule leucemiche della linea Jurkat.

Tale studio ha chiarito che il nuovo metabolita, incubato nella linea cellulare tumorale per 18h ed in concentrazioni di 10µg/mL, induce apoptosi mediante la formazione di DNA ipodiploide⁸⁹. Come è mostrato nella figura 9, il clavaminolo A ha indotto un incremento del 44,6% di cellule ipodiploidi. La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata con l'ausilio della tecnica TUNEL. La linea cellulare Jurkat, trattata con clavaminolo, è stata fissata con paraformaldeide in PBS al 4%, per 24 ore a 4°C, successivamente lavata per due volte con PBS e permeabilizzata con citrato di sodio 0,1% e Triton X-100 per 2 minuti. Le cellule sono state poi lavate per tre volte in PBS e risospese in un volume finale di 50µl di tampone TUNEL, incubate per un'ora a 37°C, lavate per due volte con PBS ed analizzate mediante citometria di flusso.

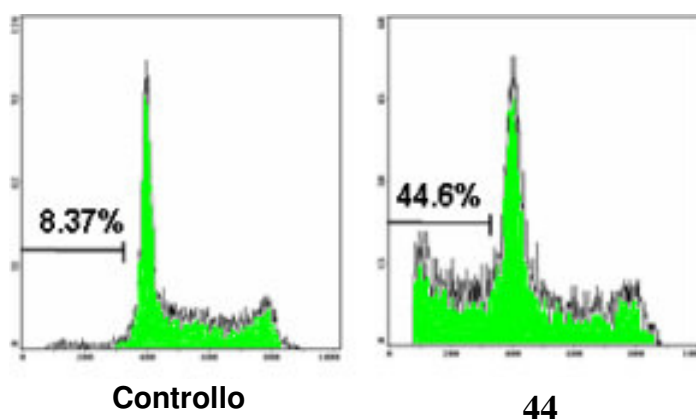


Fig. 9 Incremento di Dna ipodiploide in cellule JURKAT trattate con Clavaminolo A (44).

Sempre con l'ausilio della tecnica TUNEL, si è riusciti a chiarire in che fase del ciclo cellulare avviene la frammentazione del DNA provocata dal composto. A tal scopo, le cellule colorate col metodo TUNEL come descritto

⁸⁹ Castedo, M.; Pereffini, J. L.; Roumier, T.; Kroemer, G. *Cell death Differ.* **2002**, *9*, 1287.; Ferri, K. F.; Kroemer, G. *Nat. Cell. Biol.* **2000**, *4*, E63.

sopra, sono state ritratte con PI (20mg/mL) e trattate con 50 U/mL di RNasi in PBS per un'ora, a temperatura ambiente prima dell'analisi citofluorimetrica utilizzando un analizzatore EPIC XL. In questa tecnica, il fissaggio in paraformaldeide previene la perdita di DNA a basso peso molecolare dalle cellule trattate, rendendo possibile l'individuazione delle frammentazioni di DNA e la fase del ciclo cellulare in cui queste si verificano. I risultati, mostrati in figura 10, hanno indicato che il clavaminolo A induce frammentazione del DNA e che la maggior parte di esse si verifica nella fase G1/S del ciclo cellulare.

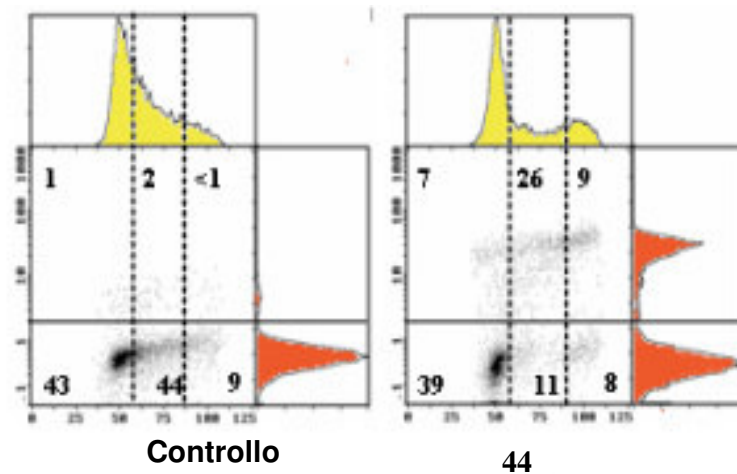


Fig. 10. Frammentazione del DNA in cellule trattate con clavaminolo A (44), rivelate mediante tecnica TUNEL.

4.4.3 Effetti dei clavaminoli B-N sulla vitalità cellulare

Tutti i clavaminoli sono stati testati nelle stesse condizioni del clavaminolo A ed inoltre, al fine di poter evidenziare l'influenza delle sostituzioni della catena alchilica sull'attività citotossica, sono stati testati anche i derivati **50a** (HY-CLA G), **51a** (HY-CLA H) e **55a** (HY-CLA N), composti semisintetici ottenuti dall'idrolisi dei corrispondenti metaboliti naturali. Dall'analisi dei dati ottenuti sono stati estrapolati i grafici rappresentati in figura 11 e 12. I risultati ottenuti consentono di avanzare alcune ipotesi sulla relazione struttura-attività.

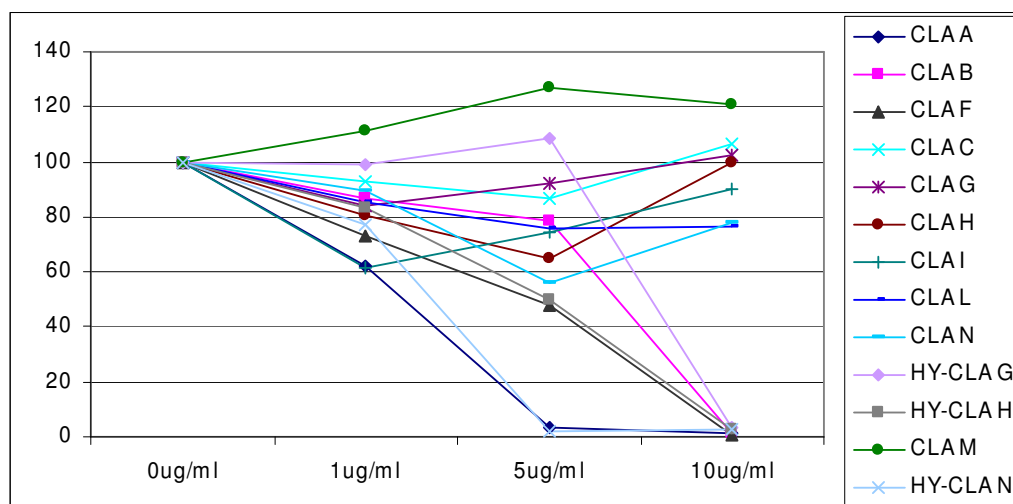


Fig. 11. Effetti dei clavaminoli sulla vitalità della linea cellulare AGS (carcinoma gastrico).

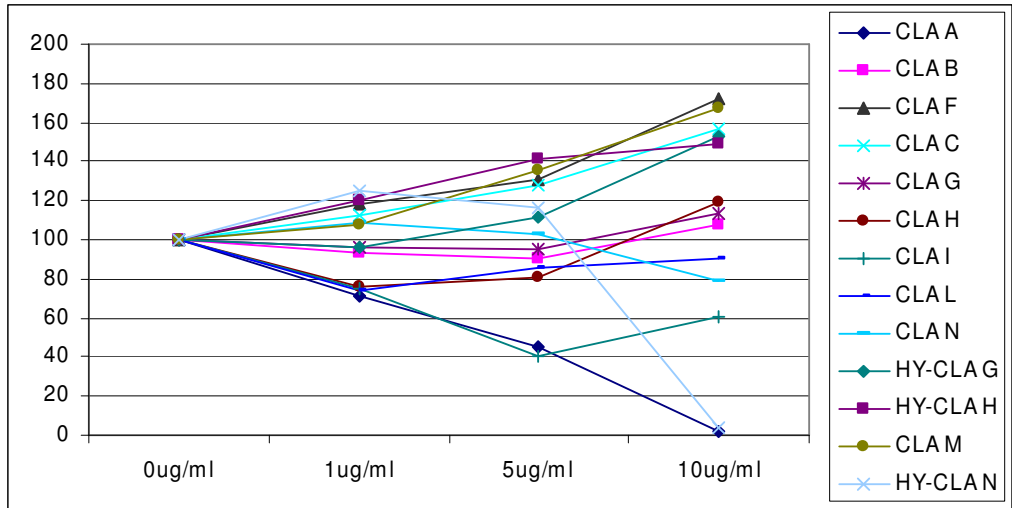


Fig. 12. Effetti dei clavaminoli sulla vitalità della linea cellulare A549 (carcinoma polmonare).

I dati di attività più significativi sono quelli riferiti alla linea cellulare AGS; in particolare, il clavaminolo B (**45**) è risultato meno attivo del composto **44**, il che ha indicato che la presenza di un'insaturazione causa una diminuzione dell'attività citotossica. I clavaminoli C (**46**) e F (**48**), testati nelle stesse condizioni del clavaminolo A (**44**) sono risultati quasi inattivi alla stessa concentrazione (5 µg/mL); tuttavia, come è evidente dal grafico in figura 11, il clavaminolo F (**48**) dimostra un effetto citotossico a 10 µg/mL, valore di concentrazione al quale il clavaminolo C (**46**) è ancora inattivo. Tali risultati fanno pensare ad una definita relazione struttura-attività per i gruppi ammino ed ossidrilici, con un rapporto più stringente verso il gruppo amminico.

Se i risultati ottenuti per i clavaminoli A-F⁸⁵ (**44-48**) hanno evidenziato che la presenza dei gruppi OH e NH₂ liberi è essenziale per l'attività ed hanno

evidenziato l'influenza della stereochimica e della presenza di insaturazioni che diminuiscono l'attività citotossica, i dati relativi ai clavaminoli G-N⁸⁶ (**50-55**) hanno suggerito che tale attività non è modulata dalla lunghezza o dalla ramificazione della catena alchilica. Inoltre il composto HY-CLA G (**50a**), che contiene entrambi i gruppi ammino ed ossidrilici liberi, è risultato completamente inattivo alle concentrazioni testate, mentre il composto HY-CLA H (**51a**) ha mostrato una seppur minima attività. Questi dati sembrano relazionare l'attività citotossica alla presenza del gruppo amminico ed ossidrilici liberi entrambi su carboni secondari.

5. Polyzorritine isolate dalla *Polyandrocarpa zorritensis*

L'estesa analisi chimica effettuata di recente su un campione del tunicato *Polyandrocarpa zorritensis* ha consentito di isolare e caratterizzare tre nuovi metaboliti a nucleo indolico e fenolico. Attualmente, grazie ad una collaborazione con l'Università di Cordova, sono in corso alcuni saggi biologici atti a valutare l'eventuale attività biologica dei nuovi composti.

5.1 Metaboliti indolici e fenolici da ascidie

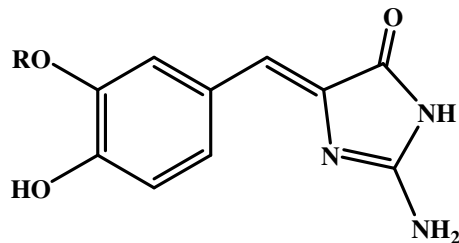
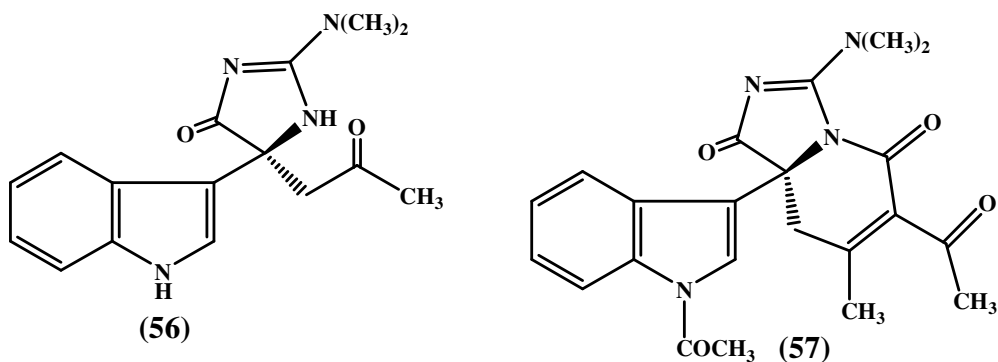
Le spugne marine si sono rivelate una buona fonte di alcaloidi con struttura 2-aminoimidazolonica⁹⁰, mentre le ascidie, notoriamente prolifiche nella produzione di metaboliti ricchi di azoto⁹¹, hanno contribuito in minima parte ad arricchire questa classe di molecole. Possiamo ricordare gli alcaloidi con struttura *N,N*-dimetilamminoimidazolonica (**56**) e (**57**) isolati dal tunicato *Dendrodoa grossularia*⁹², raccolto lungo le coste francesi. Inoltre, da un ascidiaceo appartenente al genere *Polyandrocarpa*, proveniente dalle isole Fiji, sono state isolate le polyandrocarpamine A e B (**58** e **59**), alcaloidi che presentano, al posto del nucleo indolico condensato con la parte aminoimidazolonica, un anello fenolico sostituito⁹³.

⁹⁰ ^aTsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H., Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501; ^bCafieri, F., Fattorusso, E., Mangoni, A., Tagliatela-Scafati, O., *Tetr. Lett.*, **1996**, *37*, 3587; ^cCafieri, F., Carnuccio, R., Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O., Vallefucio, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 2283.

⁹¹ Davidson, B. S. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1771-1791

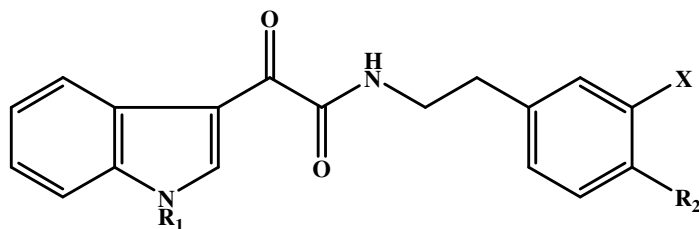
⁹² Loukaci A., Guyot M., Chiarori A., Riche C., *J. Nat. Prod.* **1988**, *61*, 519.

⁹³ Davis, R. A., Aalbersberg W., Meo S., Moreira de Rocha R., Ireland C. M., *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 3263.

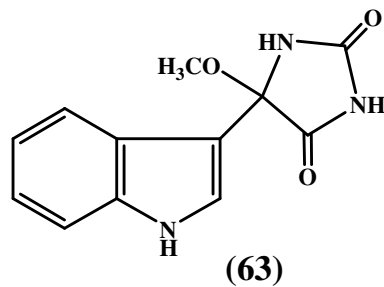


R=Me (58)
R=H (59)

Lo studio di un campione di *Polyandrocarpa* raccolto presso le isole Filippine ha portato, invece, all'isolamento delle polyandrocarpamidi A-D (**60-63**), che possiedono una porzione α -dicarbonilica a ponte tra le due porzioni cicliche della molecola⁹⁴.



	R ₁	R ₂	X
(60)	H	OH	Br
(61)	H	OH	I
(62)	H	OH	H

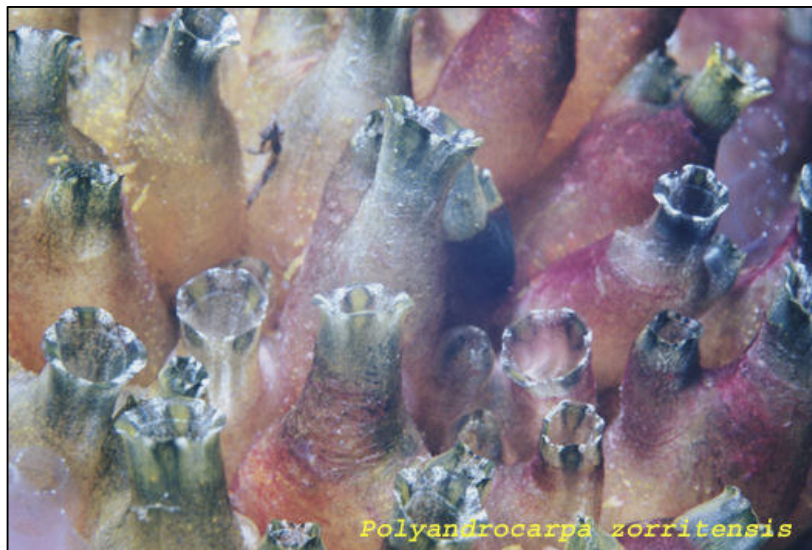


⁹⁴ Lindquist N., Fenical W., *Tetr. Lett.*, **1990**, 31, 2521.

Lo studio da me condotto su un campione di *Polyandrocarpa zorritensis*, proveniente dall'area mediterranea, ha consentito di evidenziare la presenza di metaboliti a nucleo indolico e fenolico che si presentano come una ricombinazione delle porzioni chimiche già ritrovate precedentemente.

Inoltre, l'assenza in letteratura di attività biologiche ascrivibili a questo tipo di metaboliti, rende particolarmente interessante la caratterizzazione farmacologica delle nuove molecole.

5.2 La *Polyandrocarpa zorritensis*



La *Polyandrocarpa zorritensis* (Van Name 1931) è una Styelidae coloniale della sottofamiglia Polyzoinae, che vive in acque basse; le colonie sembrano preferire acque portuali, dove si sviluppano rapidamente.

Le colonie si presentano come un gruppo di zooidi strettamente ammassati di diverse grandezze uniti da stoloni basali. La porzione basale della colonia è un groviglio di stoloni da cui si sviluppano corpi globulari arancioni (protuberanze)

che diverranno nuovi zooidi. Gli zooidi adulti sono unità cilindriche, di colore giallo-verde, con un sifone apicale orale ed un sifone atriale leggermente eccentrico. Ciascuna apertura è tetra-lobata con due bande nere per lobo. La conchiglia è sottile e coriacea ed è attaccata con vasi multipli ed ampolle sferiche terminali. Un certo numero di larghe cellule con citoplasma granulare si accumulano sulla superficie esterna dei vasi e delle ampolle.

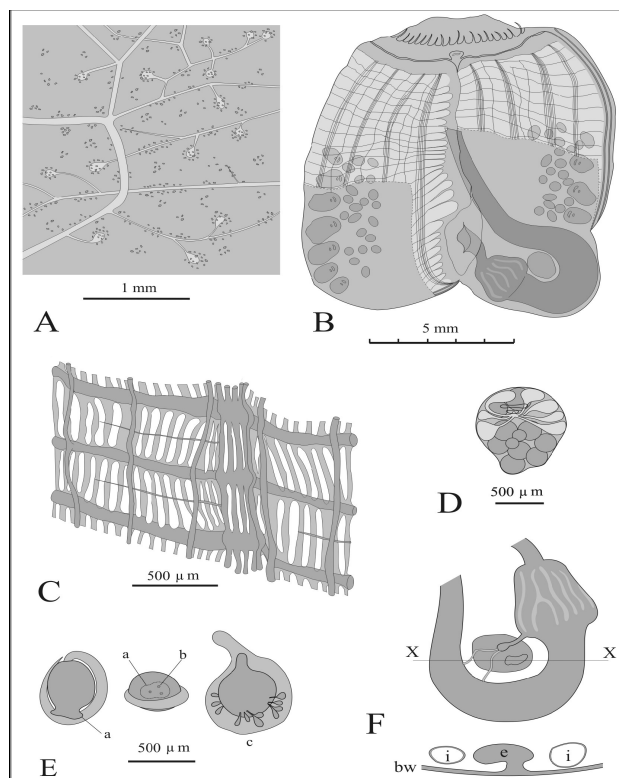


Figura 13 — *Polyandrocarpa zorritensis*. **A**, sistema vascolare della tunica. Da notare le grandi cellule adiacenti i vasi e l'ampolla **B**, sezione di uno zooide visto frontalmente. **C**, parte della porzione branchiale con vasi piegati ed incompleti. **D**, gonadi. **E**, sinistra: larva non maturata; centro: lato frontale (a), fase in cui sono inclusi tre organi aderenti (b), larva trasformata (c). **F**, ansa intestinale del caecum. In basso: sezione crociata lungo XX. bw,; corpo; e, endocarpo; i, intestino.

La struttura del sistema circolatorio è quella comune delle ascidie, con un cuore grande, esteso lungo il terzo posteriore del sacco branchiale, e una serie di vasi che dal cuore giungono fino alla base degli stoloni. Gli stoloni si ramificano e formano delle protuberanze sferiche nelle quali si diramano i vasi, ciascuno con un'ampolla terminale occupata da cellule del sangue. I nuovi zooidi si sviluppano all'interno di queste protuberanze, le connessioni vascolari con i genitori si chiudono, le ampolle attorno alle protuberanze si svuotano e prendono le forme necessarie per diventare il sistema vascolare del nuovo zooide.

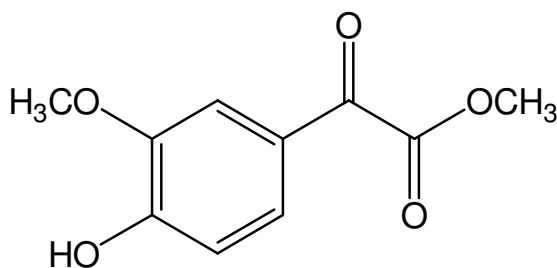
5.3 Isolamento delle polyzorritine A-C

Un campione di *Polyandrocarpa zorritensis*, raccolto presso le coste di Taranto nell'ottobre del 2006 ed immediatamente congelato, è stato estratto a temperatura ambiente metanolo e cloroformio. Gli estratti combinati sono stati riuniti e ripartiti tra acqua ed acetato di etile e tra acqua e butanolo. Il materiale solubile in acetato di etile è stato cromatografato mediante cromatografia flash su fase di silice utilizzando un gradiente di eluizione esano/EtOAc/MeOH, mentre la porzione solubile in butanolo è stata purificata con cromatografia flash su fase inversa RP-18 utilizzando un gradiente di eluizione H₂O/MeOH/CHCl₃. Le frazioni ottenute dall'MPLC e monitorate mediante analisi NMR sono state sottoposte a successive purificazioni in HPLC su fase normale ed inversa che hanno portato ai composti **64-66** puri.

In particolare, la frazione eluita con esano/acetato 1:1 è stata sottoposta ad una purificazione su HPLC su fase inversa, che ha fornito le polyzorritine A (**64**, 2 mg) e (**65**, 1.7 mg), mentre la frazione eluita con H₂O/MeOH 9:1 è stata

sottoposta a due step di purificazione, uno in HPLC preparativa che ha fornito una miscela di metaboliti polari, che è stata poi frazionata con una seconda purificazione in HPLC analitica su fase inversa, per ottenere **66** puro (0.6 mg).

La polyzorritina A (**64**) è stata isolata come un composto giallo, chimicamente stabile. L'analisi di massa ESI, in modalità ione positivo, per il composto **64** ha indicato uno ione pseudomolecolare a rapporto $m/z = 211$ $[M+H^+]$, confermato dalle misurazioni HRFABMS ($m/z = 211.19278$) che hanno suggerito per **64** la formula molecolare $C_{10}H_{10}O_5$ (valore calcolato: 211.19245), indicando sei gradi di insaturazione.



polyzorritina A (64)

Lo spettro ^{13}C NMR in $CDCl_3$ ha evidenziato segnali relativi a dieci carboni, a conferma della formula molecolare proposta, che in base ai dati ottenuti da esperimenti DEPT ed HSQC sono stati assegnati a tre carboni metinici ibridati sp^2 , due carboni metilici e quattro carboni quaternari (184.37, 164.22, 152.22, 147.01). Dai valori di chemical shift di due dei carboni quaternari (δ 184.37 e 164.22), è stata ipotizzata la presenza di due gruppi carbonilici, che renderebbero conto di due insaturazioni.

Lo spettro protonico in CDCl_3 ha mostrato segnali relativi a: i) due metili risonanti come singoletti a δ 3.98 e δ 3.96, ii) quattro protoni nella regione a campi bassi risonanti a δ 6.99, 7.59, 7.61 e 6.24. Il valore di chemical shift dei segnali metilici ha suggerito che essi fossero relativi a gruppi $-\text{CH}_3$ legati ad un atomo di ossigeno. Una conferma di ciò è venuta dall'analisi dei dati ottenuti dallo spettro HSQC, che ha permesso di attribuire tutti i segnali protonici ai relativi carboni; infatti, tali segnali apparivano correlati con i due segnali di carboni metilici, deschermati, a δ 52.58 e 56.08 ed attribuibili a carboni metossilici.

Inoltre, i protoni risonanti a δ 6.99 (1H, d, $J=8.25$), 7.59 (1H, bd, $J=1.86$) e 7.61 (1H, dd, $J=1.86, 8.25$) sono stati correlati ai carboni risonanti a δ 114.32, 110.65 e 126.83, rispettivamente. Tali segnali, in base al pattern ed ai valori delle costanti di accoppiamento, sono stati assegnati ai protoni di un anello benzenico 1,2,4-trisostituito; la presenza dell'anello benzenico giustifica le rimanenti quattro insaturazioni calcolate per la molecola.

L'assenza di una correlazione nello spettro HSQC in corrispondenza del segnale a δ 6.24, ha suggerito che questo potesse essere relativo ad un protone scambiabile. Ciò è stato verificato registrando uno secondo spettro protonico in CDCl_3 con aggiunta di D_2O . La scomparsa del suddetto segnale ha confermato la natura scambiabile del protone relativo a questo segnale. La presenza di un caratteristico carbonio quaternario nello spettro ^{13}C NMR risonante a 152.22 ppm suggeriva che il gruppo OH apparteneva ad un residuo fenolico.

Esperimenti di risonanza magnetica nucleare (HMBC, COSY, ROESY), che hanno mostrato una serie di correlazioni significative, hanno consentito di individuare la natura delle tre sostituzioni e le loro posizioni relative sull'anello.

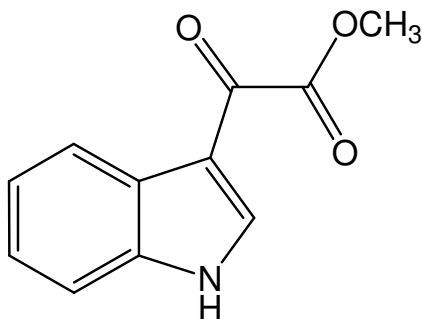
Le correlazioni del segnale scambiabile a δ 6.24 con il carbonio a δ 114.32 e con il carbonio quaternario a δ 147.01 e la correlazione di quest'ultimo carbonio con il segnale del metossile a δ 3.98, a sua volta correlato al carbonio a δ 110.65, hanno indicato la presenza di un gruppo metossile ed un gruppo ossidrilico posizionati sull'anello benzenico in posizione orto tra loro. Lo spettro COSY ha mostrato una correlazione tra il protone risonante a δ 7.59 ed il segnale del metossile a δ 3.98 ed una forte correlazione tra i protoni a δ 6.99 e δ 7.61, mentre il protone a δ 7.61 ed il protone a δ 7.59 sono risultati entrambi accoppiati, nello spettro HMBC, al carbonio quaternario risonante a δ 125.33 ed al carbonio carbonilico a δ 184.37. Questi dati hanno quindi confermato la presenza del metossile sul C5 e dell'OH sul C6, oltre alla presenza di un carbonile sul C3. La conferma del gruppo metossile sul C5 è stata inoltre confermata da una chiara correlazione nello spettro ROESY tra il segnale a δ 3.98 ed il protone a δ 7.59 (H4); tale spettro ROESY ha mostrato anche un chiaro accoppiamento tra i due protoni a δ 7.61 e 6.99 in orto tra loro. Il metile risonante a δ 3.96 (δ_C : 52.58) è risultato direttamente correlato al carbonio carbonilico risonante a δ 164.22 nello spettro HMBC, suggerendo la presenza di una funzione esterea e quindi di un sostituito dicarbolinico C1-C2 posizionato sul C3 della porzione fenolica.

Sulla base dei risultati ottenuti, la struttura della polyzorritina **A (64)** è risultata essere quella dell'acetato di 2-(4-idrossi-3-metossifenil)-2-osso metile.

Per la polyzorritina **B (65)** lo spettro di massa ESI ha indicato uno ione pseudomolecolare a rapporto $m/z = 204$ $[M + H]^+$, e l'analisi HRFABMS ha

indicato la formula molecolare $C_{11}H_9NO_3$, che ha suggerito per questo composto la presenza di otto insaturazioni.

Lo spettro ^{13}C NMR in CD_3OD ha evidenziato segnali relativi ad undici carboni, a conferma della formula molecolare proposta, che in base ai dati ottenuti da esperimenti DEPT ed HSQC sono stati assegnati a cinque carboni metinici ibridati sp^2 (δ 122.69, 124.86, 123.77, 112.92, 139.12), un carbonio metilico (δ 52.92) e cinque carboni quaternari (δ 180.57, 164.77, 138.00, 127.00, 114.20).



polyzorritina B (**65**)

L'analisi dello spettro protonico registrato in $CDCl_3$ del composto **65**, (vedi parte sperimentale) ha mostrato, in analogia con il metabolita **64**, la presenza del segnale di un metile singoletto a δ 3.96, che ha suggerito anche in **65** la presenza di un metossile di natura esterea. Anche nello spettro di **65** erano presenti segnali protonici nella regione a campi bassi (δ 8.80, 8.51, 8.46, 7.45, 7.35), chiaramente relativi, però, ad un sistema aromatico diversamente sostituito o addirittura diverso rispetto ad **64**.

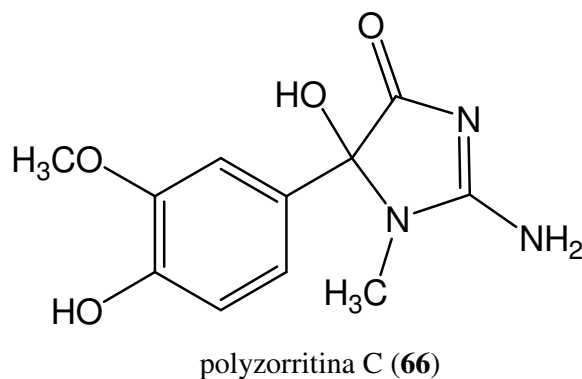
Il confronto dei dati dello spettro protonico registrato in CD_3OD (vedi tabella 6) con quelli riportati in letteratura per alcuni composti isolati da altre specie di

Polyandrocarpa, ha suggerito in **65** la presenza di un anello indolico. Infatti, i segnali della regione a campi bassi ed i valori di ^{13}C sono risultati coincidenti con quelli di un indolo monosostituito⁹⁴ e per tale motivo gli esperimenti descritti sono stati effettuati in CD_3OD al fine di confrontare i valori di risonanza; la presenza di un anello indolico ha, inoltre, chiarito sei delle otto in saturazioni.

Nello spettro protonico registrato in CD_3OD sono presenti segnali di un metile singoletto a δ 3.95 (3H, s), di protoni risuonanti a δ 8.43 (1H, s), 8.26 (1H, dd), 7.50 (1H, dd), e di un multipletto derivante dalla parziale sovrapposizione di due segnali integranti ciascuno per un protone a δ 7.28 e 7.29, come poi risultato dalle correlazioni nello spettro HSQC (δ 122.96 e 124.06 rispettivamente). Ancora una volta, i dati ottenuti da un esperimento HMBC sono stati diagnostici. La presenza nello spettro HMBC di una correlazione tra il protone singoletto risuonante a δ 8.43 (H-8) con un carbonio quaternario a δ 114.20 e con il carbonio carbonilico a δ 180.57 ha confermato la presenza di un sostituito sull'anello indolico in posizione C3 ed ha permesso di definire che si trattava di un gruppo carbonilico. Questo dato, insieme all'accoppiamento osservato fra il metossile a δ 3.95 e l'altro carbonio carbonilico a δ 164.22, hanno permesso di identificare il gruppo presente in posizione 3 come lo stesso sostituito dicarbonilico C1-C2 presente nel composto **64**.

La polyzorritina C (**66**) si presenta come un composto che varia colore a seconda del suo stato: un solido di color rosa intenso, che cambia colore a giallo in soluzione. Lo spettro ESI registrato in modalità positiva ha mostrato uno ione pseudomolecolare a $m/z = 252$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ e le analisi HRFABMS hanno indicato la

formula molecolare $C_{11}H_{13}N_3O_4$. Anche l'identificazione di questo metabolita è stata facilitata dal confronto dei dati NMR dello spettro protonico con quelli riportati per il composto **64** registrato in CD_3OD .



Lo spettro protonico di **66** registrato in CD_3OD ha mostrato, infatti, in analogia con il metabolita **64**, la presenza di due metili singoletti a δ 3.87 e 2.81 e di tre segnali integranti ciascuno per un protone risonanti a campi bassi (δ 7.05, 6.79, 6.72) che hanno suggerito la presenza di un sistema aromatico diversamente sostituito o differente da quello in **64**. Il valore di chemical shift dei segnali metilici ha suggerito che essi fossero relativi a gruppi $-CH_3$ legati a due differenti eteroatomi, e l'analisi dello spettro HSQC, che ha permesso di attribuire tutti i segnali protonici ai relativi carboni, ha consentito di correlare i segnali a δ 3.87 e 2.81 con i segnali di due carboni metilici deschermati a δ 56.11 e 26.08, ed attribuibili rispettivamente ad un carbonio metossilico e ad un carbonio legato ad un atomo di azoto.

Lo spettro ^{13}C ha mostrato valori di risonanza per undici carboni, ed i picchi di correlazione evidenziati dall'esperimento HSQC hanno indicato che sei degli undici carboni non erano legati direttamente a protoni; in particolare, è risultato

particolarmente significativo il valore di risonanza di uno di questi carboni quaternari, risonante a δ 91.70, caratteristico di un carbonio emiacetalico.

Le correlazioni presenti nello spettro HMBC hanno consentito, anche in questo caso, di definire la struttura del nuovo metabolita e di razionalizzare le informazioni ottenute dagli esperimenti omo ed eteronucleari. I picchi di correlazione del protone metinico a δ 7.06 con i carboni quaternari a δ 129.0, 147.99 e 148.95 e la correlazione di quest'ultimo carbonio con il metile risonante a δ 3.87 hanno suggerito anche in **66** la presenza di un metossile e di un altro sostituente posizionati sui carboni 1,2 dell'anello benzenico. Le correlazioni dei protoni a δ 7.06 e 6.72 con il carbonio emiacetalico a δ 91.70, hanno indicato la presenza di un terzo sostituente dell'anello benzenico sul C3.

Tali risultati, insieme al pattern dei segnali ed ai valori delle costanti di accoppiamento, hanno confermato la presenza in **66** dello stesso anello benzenico 1,2,4-trisostituito presente in **64**.

Lo spettro HMBC presenta, inoltre, una correlazione del carbonio metilico risonante a δ 2.81 e legato presumibilmente ad un atomo di azoto, con il carbonio quaternario risonante a δ 170.44 ed una correlazione con il carbonio emiacetalico a δ 91.70. Ciò ha suggerito che tale carbonio quaternario, insieme all'azoto metilato ed al carbonio quaternario a δ 170.44, fossero parte di un secondo ciclo legato direttamente al benzene in posizione C3. Il confronto della struttura di **66** con quella ipotizzata per il composto **64** ha suggerito che tale ciclo potrebbe essere stato originato dalla ciclizzazione della polyzorritina A con un residuo guanidinico, che ha prodotto una porzione 2-ammino-1-metil-imidazolonica. Tale ciclo è frequentemente ritrovato negli alcaloidi di origine marina, e la struttura

finale della polyzorritina C è stata ipotizzata proprio dal confronto con i dati riportati in letteratura per tale anello⁹³. In accordo con i dati di massa, il rimanente carbonio quaternario è attribuibile ad un carbonio legato ad un gruppo amminico ed adiacente al carbonio emiacetalico. La scarsa quantità di metabolita a disposizione ha influenzato l'acquisizione dell'esperimento ¹³C, pertanto la presenza del carbonio carbonilico deve essere confermata da ulteriori esperimenti, ma tuttavia, la struttura proposta per **66** è validamente supportata da dati NMR e di massa e si candida come la più probabile, vista anche la probabile origine biogenetica.

Tabella 6.: ¹H NMR per le polyzorritine A-C (64-66)

POS.	1 δ_H (mult. J) ^a	2 δ_H (mult. J) ^b	3 δ_H (mult. J) ^b
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
3a	-	-	-
4	7.59 (bd, J=1.86)	8.26 (dd, J=1.55; 6.84)	-
5	-	7.29 (m)	-
6	-	7.28 (m)	-
7	6.99 (d, J=8.25)	7.50 (dd, J=1.55; 6.84)	7.05 (d, J=2.02)
7a	-	-	-
8	7.61 (d, J=1.86, 8.25)	8.43 (s)	-
9	-	-	-
10	-	-	6.79 (d, J=8.27)
11	-	-	6.72 (dd, J=2.02,8.27)
-OCH₃¹	3.96 (s)	3.95 (s)	3.87 (s)
-OCH₃²	3.98 (s)	-	-
-OH	6.24 (s)	-	n.d.
-NCH₃	-	-	2.81 (s)
NH₂	-	-	n.d.

Tabella 7: ¹³C NMR per le polyzorritine A-C (64-66)

POS.	1 ^a	2 ^b	3 ^b
1	164.22	164.77	-
2	184.37	180.57	170.44
3	125.33	114.20	-
3a	-	138.00	-
4	110.65	122.69	n.d.
5	147.01	124.86	91.70
6	152.22	123.77	129.01
7	114.32	112.92	110.73
7a	-	127.00	-
8	126.83	139.12	148.95
9	-	-	147.99
10	-	-	115.92
11	-	-	119.12
-OMe¹	52.58	52.92	56.11
-OMe²	56.08	-	-
-NMe	-	-	26.08

^aDati registrati in CDCl₃, ^bDati registrati in CD₃OD.

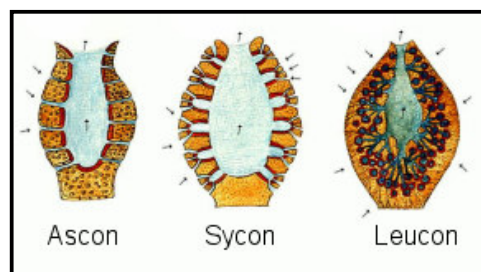
6. Poriferi

I Poriferi, comunemente noti come spugne, sono organismi molto primitivi; presentano cellule non organizzate in tessuti differenziati e, quindi, nell'organismo non è presente né un sistema nervoso né uno cardiovascolare né organi deputati a specifiche funzioni. Considerando la struttura e la forma del corpo le spugne possono presentare tre tipi di morfologia:

• **Ascon o Asconide:** La parete corporea è costituita da tre strati e la caratteristica principale è di avere i coanociti sulla superficie interna dello spongocele;

• **Sycon o Syconide:** E' un tipo di struttura più evoluto. La parete è più spessa e i coanociti sono situati in camerette, derivate da digitazioni orizzontali a fondo cieco dello spongocele. Le conseguenze sono una riduzione del volume della cavità interna e un aumento della superficie flagellata che consentono di filtrare l'acqua più efficacemente.

• **Leucon o Leuconide:** E' il più evoluto di tutti. Possiede una struttura complessa con un sistema di filtrazione dell'acqua molto efficace che ha permesso ad alcune specie di raggiungere dimensioni anche notevoli. I coanociti sono situati all'interno del corpo in tante camere intercomunicanti fra loro.



Il corpo delle spugne è sostenuto da una impalcatura scheletrica formata da piccole strutture denominate “spicole”, che possono essere calcaree o silicee, oppure da una rete di fibre di materiale proteico, la “spongina”.

In base alla composizione delle spicole scheletriche le spugne vengono suddivise in quattro classi:

Calcisponge: hanno esclusivamente spicole calcaree, possono presentare tutti e tre i tipi di organizzazione: Ascon, Sycon e Leucon. Sono di piccole dimensioni generalmente vivono in acque vicino alle coste.

Sclerosponge: questa classe è formata da un ristretto gruppo di spugne, per lo più tropicali che vivono in grotte o in ambienti oscuri. Il loro scheletro è formato da fibre di spongina e da spicole silicee inserite su un basamento calcareo.

Hyalosponge: sono chiamate anche spugne vitree. Vivono a grandi profondità. Presentano struttura Leucon. Hanno lo scheletro composto esclusivamente da spicole silicee.

Demosponge: possono avere lo scheletro siliceo o corneo o formato da una combinazione di spicole silicee e fibre di spongina. Sono le più diffuse, la loro struttura è di tipo Leucon.

Le spugne sono specie sessili cioè vivono attaccate a substrati quali rocce, scafi di imbarcazioni, pali e oggetti sommersi. La forma e il colore cambia da specie a specie; possono essere globose, ramificate, incrostanti o arboreescenti, di colore biancastro, giallo più o meno intenso, ma non mancano specie dalle colorazioni intense violacee o brune.

La superficie dell'animale è tappezzata da microscopici fori inalanti, non visibili ad occhio nudo, detti "porociti", attraverso i quali passano le sostanze nutritive e l'acqua che viene poi espulsa tramite una grande e visibile apertura, detta "osculo".

Alla classe delle Demosponge appartiene il genere *Axinella*. Le specie di questo genere prediligono generalmente luoghi ombrosi ed acque non superficiali.

7. Damipecolina e damituricina da *Axinella damicornis*

Lo studio chimico condotto su un campione della spugna *Axinella damicornis* raccolto nella baia di Calvi (Corsica) ha permesso l'isolamento, accanto ad una serie di composti azotati noti, di due nuovi alcaloidi bromopirrolici, la damipecolina (**67**) e la damituricina (**68**), dei quali è stata effettuata la caratterizzazione chimica e farmacologica. I risultati ottenuti da questo lavoro di ricerca sono stati oggetto di un brevetto internazionale.

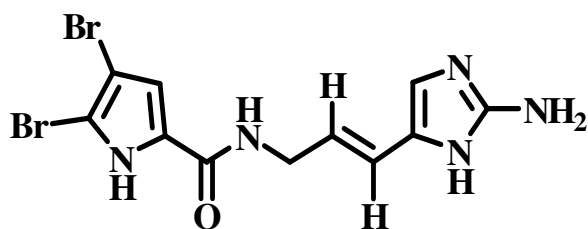
7.1 Alcaloidi bromopirrolici da Poriferi

Gli alcaloidi sono basi organiche azotate ritrovate principalmente nelle piante superiori, ma in misura minore anche in microrganismi ed animali. Gli alcaloidi sono spesso classificati in base alla natura della struttura che contiene l'azoto, ad esempio pirrolidinici, piperidinici, chinolinici, isochinolinici, indolici, pirrolici etc. sebbene la complessità strutturale di alcune molecole inevitabilmente aumenti il numero delle possibili divisioni.

Le spugne marine sono una ricca fonte di alcaloidi pirrolici. Questi composti naturali continuano a suscitare l'interesse sia dei chimici che dei farmacologi sia per le loro peculiarità strutturali che per l'attività biologica.

A tutt'oggi in letteratura sono stati riportati i dati relativi all'isolamento e alla caratterizzazione strutturale di circa trenta nuovi alcaloidi pirrolici e pirrolimidazolici e, per alcuni di essi, è riportato anche un approccio sintetico.

Gli alcaloidi bromopirrolici costituiscono una famiglia di alcaloidi esclusivamente marini e rappresentano un'affascinante esempio della grande varietà di metaboliti secondari elaborati dalle spugne marine. Il primo membro di questo gruppo ad essere stato isolato è l'oroidina (**69**), inizialmente dalla spugna *Agelas oroides* nel 1971 e, poi, da molte altre spugne^{95, 96}.



(**69**)

L'oroidina è considerata il metabolita chiave di questa famiglia di alcaloidi dato che molti alcaloidi bromopirrolici che posseggono una struttura pirroloimidazolica possono essere considerati come derivati dello scheletro C₁₁N dell'oroidina.

Questi alcaloidi possono variare per:

- ossidazione, riduzione o idratazione dell'unità 2-ammino-4(5)vinylimidazolo
- dimerizzazione
- ciclizzazione.

⁹⁵ Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Fattorusso, E. *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.*; **1971**, 1129-30.

⁹⁶ Garcia, E.E.; Benjamin, L.E.; Fryer, R.I. *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.*, **1973**, 78-9.

La parte pirrol-2-carbossamidica può essere non- , mono- , o dibromurata esclusivamente nelle posizioni 2- e 3-. La bromurazione del pirrolo in posizione 4- o della parte imidazolica non è mai stata osservata. Attualmente, piccoli cambiamenti chimici all'interno dei blocchi costituenti, come bromurazione della parte pirrol-2-carbossamidica o equilibrio tautomerico e la conseguente bivalente reattività della parte 2-amminoimidazolica, sono maggiormente responsabili della grande diversità molecolare osservata in questo gruppo di alcaloidi.

In questi ultimi trent'anni più di cento derivati, con varie strutture e interessanti attività biologiche sono stati isolati da più di venti differenti spugne di vari generi, essenzialmente, ma non esclusivamente, appartenenti alle famiglie Agelasidae, Axinellidae e Halichondridae.

E' attualmente riconosciuto che questi alcaloidi sono tassonospecifici almeno della classe delle Agelasidae e giocano il ruolo di marcatori chimici di queste spugne correlate filogeneticamente⁹⁷.

Da un punto di vista ecologico, il ruolo antipredatorio di questi alcaloidi può essere considerato la loro più grande funzione biologica.

E' stato determinato che il filone delle spugne caraibiche del genere *Agelas* è chimicamente difeso dai pesci predatori attraverso gli alcaloidi bromopirrolici⁹⁸. L'attività relativa dei composti esistenti in natura e le funzionalità chimiche necessarie e sufficienti per questa attività sono già state determinate, fornendo così la conoscenza attuale delle relazioni tra la struttura

⁹⁷ Braekman, J.C.; Daloz, Q.; Stoller, C., van Soest, R.W. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1992**, 20, 417-431.

⁹⁸ Chamas, B.; Pawlik, J.R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1997**, 208, 185-196; Wilson, D.M.; Puyama, M.; Fenical, W.; Pawlik, J.R. *J. Chem. Ecol.* **1999**, 25, 2811-2823; Asmann, M.; Licthe, E.; Pawlik, J.R.; Kock, M. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, 207, 255-262.

molecolare e l'attività antipredatoria⁹⁹. Il ruolo di questi alcaloidi nei meccanismi di difesa è supportato anche da uno studio che dimostra che questi alcaloidi hanno origine dalle cellule della spugna e non sono presenti nei microrganismi associati alle spugne¹⁰⁰.

Gli alcaloidi bromopirrolidici sono molto importanti non solo per la loro funzione ecologica nella difesa chimica e per le considerazioni chemiotassonomiche, ma anche per il numero di interessanti attività farmacologiche che hanno mostrato. Tra queste va citata l'attività citotossica della dibromofakellestatina e l'attività immunosoppressiva della palau'amina. Ciò è dovuto al notevole aumento, negli ultimi sei anni, dell'interesse dei chimici organici per la sintesi totale di questi composti.

La classificazione di questi alcaloidi può essere fatta dividendoli in quattro gruppi che rispecchiano la loro composizione chimica.

1. Monomeri lineari come l'oroidina; queste strutture contengono lo scheletro dell'oroidina senza un'ulteriore ciclizzazione.
2. Derivati policiclici dell'oroidina; queste strutture contengono una o più ciclizzazioni intramolecolari dei monomeri di oroidina. Infatti, sono stati trovati in natura sei differenti modi di ciclizzazione dell'oroidina, che è classificata considerando gli atomi di oroidina presenti nella formazione del legame.
3. Dimeri semplici o ciclizzati di oroidina.

⁹⁹ Lindel, T.; Hoffmann, H.; Hochgurtel, M.; Pawlik J.R. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1477-1496

¹⁰⁰ Richelle-Maurer, E.; De Kluijver, M.J.; Fejo, S.; Gaudencio, S.; Gaspar, H. H.; Gomez, R.; Tavares, R.; Van de Vyver, G.; Van Soest, R.W.M. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 1073-1091.

4. Altri alcaloidi bromopirrollici. Questi non possono essere inclusi nei gruppi precedentemente menzionati, fondamentalmente perché non posseggono la parte pirrol-imidazolica.

Nel 1984 la keramadina¹⁰¹, un nuovo antagonista del recettore della serotonina, è stata isolata da una specie di *Agelas*. L'hymenidina¹⁰², isolata nel 1986 dalla spugna marina *Hymeniacidon* sp. e la clathrodina¹⁰³, isolata nel 1991 dalla spugna caraibica *Agelas clathrodes* sono rispettivamente il monobromo e il non bromurato analogo dell'oroidina. La clathrodina ha mostrato un'interazione, come l'oroidina, con i recettori muscarinici (mAChR) nelle membrane del cervello di ratto, mentre l'hymenidina ha evidenziato una potente attività antiserotoninergica. In letteratura è anche riportata l'attività antimicrobica dell'oroidina.

Le tauroacidine A e B¹⁰⁴ isolate da *Hymeniacidon* sp., sono dei bromopirrol-alcaloidi contenenti un residuo di taurina attaccato all'anello amminoimidazolico; mostrano un'attività inibitoria verso i recettori delle chinasi EGF e *c-erbB-2* con una IC50 di 20 µg/ml ognuna. Un loro analogo la taurodispacamide A¹⁰⁵ è stata isolata dalla spugna del Mediterraneo *Agelas oroides* e ha mostrato una buona attività antistaminica testata sull'ileo di cavia. Le clathramidi A e B¹⁰⁶ isolate dalla spugna caraibica *Agelas clathrodes*, contengono un'insolita unità di N-metil-imidazolica; questi composti sono stati testati come

¹⁰¹ Cafieri, F.; E. Fattorusso, O. Tagliatalata-Scafati *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 122.

¹⁰² Kobayashi J, Ohizumi Y, Nakamura H, Hirata Y., *Experientia.* **1986**;42(10), 1176.

¹⁰³ Morales J. J. and Rodríguez A. D. , *J. Nat. Prod.*; **1991**; *54*,629

¹⁰⁴ Kobayashi J., Inaba K., Tsuda M., *Tetrahedron.* **1997**, *49*, 16679.

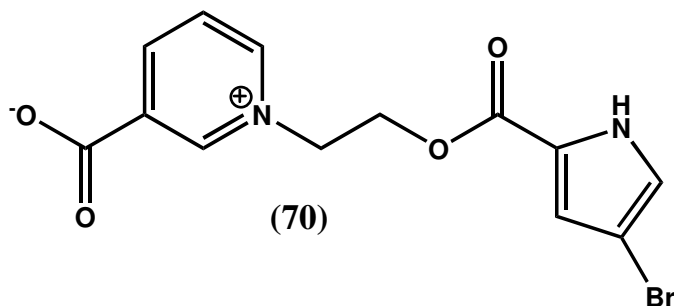
¹⁰⁵ E. Fattorusso, O. Tagliatalata-Scafati *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9917.

¹⁰⁶ F. Cafieri, E. Fattorusso, A. Mangoni, O. Tagliatalata-Scafati *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13713

antistaminici, antiserotoninergici e anticolinergici, ma, a dispetto della similitudine strutturale con altri alcaloidi attivi, non è stata osservata nessuna attività degna di nota. Tuttavia, hanno esibito una moderata attività antifungina verso il fungo *Aspergillus niger*.

Le dispacamidi A-D^{90b-c}, alcaloidi bromo-pirrolici contenenti un'unità amminoimidazolonica, sono state isolate da diverse *Agelas* caraibiche e hanno mostrato una marcata attività antistaminica selettiva. Dall'*Agelas nakamurai* sono state isolate sia le mukanadine A-C¹⁰⁷, nella quale l'unità amminoimidazolonica è sostituita da un'unità idantoinica, che le slagenine A-C¹⁰⁸ caratterizzate da un insolito anello tetraidrofuran[2,3-*d*]imidazolidin-2-one.

Infine le manzacidine A-D¹⁰⁹, isolate da *Hymeniacidon* sp. e l'angelongina (70)¹¹⁰, isolata dall'*Agelas longissima* innovano lo scheletro standard dei pirrol-alcaloidi visti finora, in quanto presentano un anello 3,4,5,6-tetraidropirimidinio e uno piridinico, rispettivamente, al posto del comunemente ritrovato nucleo imidazolico, e nel segmento centrale si ritrova un legame estereo in sostituzione di quello ammidico usualmente ritrovato. L'angelongina (70) mostra un'attività antiserotoninergica sulla striscia di stomaco di ratto.



¹⁰⁷ Uemoto H, Tsuda M, Kobayashi J, *J Nat Prod.*, **1999**,62, 1581.

¹⁰⁸ M. Tsuda, H. Remoto, J. Kobayashi *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5709.

¹⁰⁹ Kobayashi J., Kanda F., Ishibashi M., Shigemori H, *J. Org. Chem.* **1991**,56,4574.

¹¹⁰ Cafieri F.; Fattorusso E.; Mangoni A.; Tagliatela-Scafati O.; Carnuccio R., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **1995** , 5, 799.

Tutti questi dati mostrano come tali sostanze possono rappresentare, a causa delle loro molteplici ed interessanti proprietà farmacologiche, dei potenziali strumenti per lo sviluppo delle scienze farmaceutiche e per la progettazione di nuovi farmaci.

Le piccole ma sostanziali differenze strutturali esistenti tra le molecole finora isolate ma che pure danno origine ad una così grande chemiodiversità, pongono interessanti questioni circa la biogenesi di tali alcaloidi. Sono state fatte in proposito diverse ipotesi ma molti punti restano ancora da chiarire per proporre un sicuro *pathway* biogenetico per tali composti.

Pertanto, la scoperta di nuovi alcaloidi appartenenti a questa classe oltre a fornire nuove molecole guida per lo sviluppo di nuovi farmaci, può evidenziare dei “*missing links*” che potrebbero far luce sull’origine biogenetica degli alcaloidi bromopirrolici.

7.2 *Axinella damicornis*

La spugna *Axinella damicornis* è comunemente detta “spugna corna di daino” (Fig. 14). E’ la più piccola delle spugne del genere *Axinella*. Presenta un asse corto e ramificazioni appiattite a ventaglio che crescono unite. Le spicole sono a forma di stili, spesso rigonfie vicino all’estremità. Si può riconoscere dalla forma a ventaglio leggermente lobato e dalle dimensioni che di solito non superano i 10 cm. Si incontra su fondali melmosi e su rocce a 5-15 metri o sui fondali coralligeni più profondi (25 m.); esemplari sono stati rinvenuti lungo la Costiera Amalfitana (Grotta dello Smeraldo, SA) e nel Golfo di Napoli. Le colonie sono spesso ricoperte dal celenterato *Parazoanthus axinellae*.

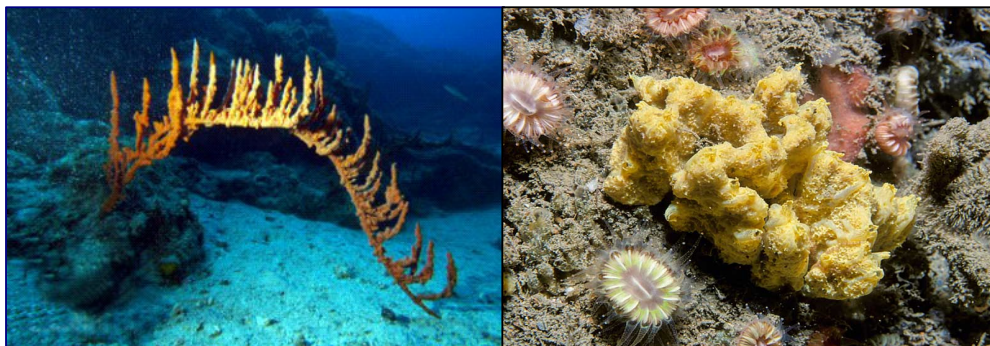


fig. 14 : *Axinella damicornis*.

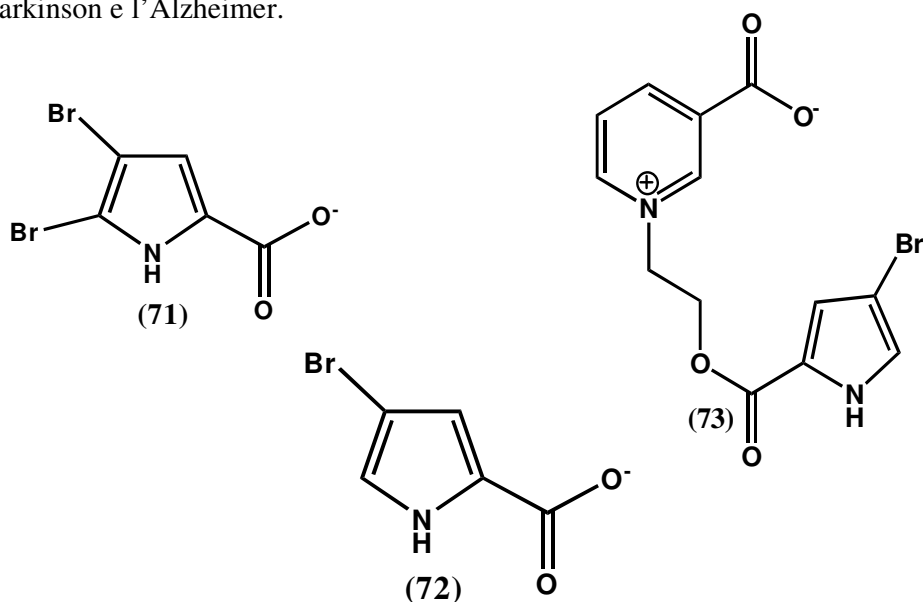
Durante il periodo di dottorato ho analizzato un esemplare di *A. damicornis* raccolta nella baia di Calvi (Corsica). Attraverso questo studio è stata evidenziata, in questo organismo, la produzione di miscele complesse di alcaloidi bromopirrolici strutturalmente diversi.

7.3 Analisi chimica del campione di *A. damicornis*

Il campione della specie *A. damicornis* (Esper, 1794) è stato raccolto nella baia di Calvi (Corsica) nel novembre del 2001. La spugna è stata omogeneizzata ed estratta con metanolo e, successivamente, con cloroformio. Gli estratti ottenuti sono stati concentrati sottovuoto. La sospensione acquosa risultante è stata ripartita tra acqua e butanolo.

La fase butanolica è stata sottoposta a MPLC su una colonna RP-18 a fase inversa ed è stata ottenuta una frazione composta principalmente da alcaloidi polari. La separazione e la purificazione di questa frazione è stata effettuata mediante ripetute HPLC a fase inversa fino all'ottenimento di prodotti puri tra cui alcaloidi precedentemente isolati da altre specie, quali l'oroidina⁹⁵⁻⁹⁶ (**69**), l'acido

4,5-dibromopirrol-2-carbossilico^{95,96} (71), l'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico¹¹¹ (72), l'angelongina¹¹⁰ (70) e la daminina¹¹² (73), che ha dimostrato di essere un potente agente neuroprotettivo, e che potrebbe rappresentare un nuovo strumento terapeutico per il trattamento delle malattie del Sistema Nervoso Centrale come il Parkinson e l'Alzheimer.



Oltre all'insieme di alcaloidi bromopirrolici noti dall'esemplare da me studiato sono stati isolati due nuovi alcaloidi bromopirrolici, la damipicolina (67) e la damituricina (68), dei quali è stata effettuata la caratterizzazione chimica e farmacologica.

Nella damipicolina (67), l'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico è direttamente condensato con un α -amminoacido ciclico non proteico, l'acido (2R,4R)-trans-4-idrossipicolico, mentre nella damituricina (68) è condensato con un residuo di (2R,4R)-*cis*-N,N'-dimetil-4-idrossiprolina (D-turicina). Le forme D ed L della betaina turicina, nella quale le funzioni carbossilato ed idrossile sono in *cis* tra

¹¹¹ Ackermann, D.; H.G. Hoppe-Seylers *Z. Physiol. Chem.* **1960**, 332, 198.

¹¹² Aiello, A.; D'Esposito, M.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Müller, W.E.G.; Perovic-Ottstadt; Tsuruta, H.; Gulder, T.A.M.; Bringmann G. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 7266.

loro, e la L-betonina, dove queste due funzioni sono in relazione *trans*, sono derivati dell'idrossiprolina comunemente ritrovati in natura.

Questi composti sono stati studiati nel sistema dell'acetilcolina esterasi e la betonina, ma non la turicina, è un inibitore competitivo dello stesso ordine di grandezza della stessa colina¹¹³. Gli acidi pipercolici (acido esaidropiperidinico-2-carbossilico) si incontrano frequentemente in natura con i loro derivati idrossilati e spesso mostrano un'attività biologica potente e interessante¹¹⁴. I derivati dell'acido pipercolico sono, inoltre, utili intermedi sintetici per la preparazione di importanti composti medicinali come peptidi¹¹⁵, immunosoppressori¹¹⁶, inibitori di enzimi^{114,117}, o antagonisti dell'NMDA.

La damipipercolina (**67**) e la damituricina (**68**) hanno mostrato effetti modulatori sull'attività del recettore della serotonina *in vitro*.

7.3.1 Damipipercolina da *A. damicornis*

La struttura planare della damipipercolina (**67**) è stata determinata mediante metodi spettroscopici. Lo spettro di massa ESI (ione positivo) della damipipercolina (**67**) ha mostrato due picchi ionici pseudomolecolari intensi a *m/z*

¹¹³ Friess, S. L.; Patchett, A. A.; Witkop, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 459

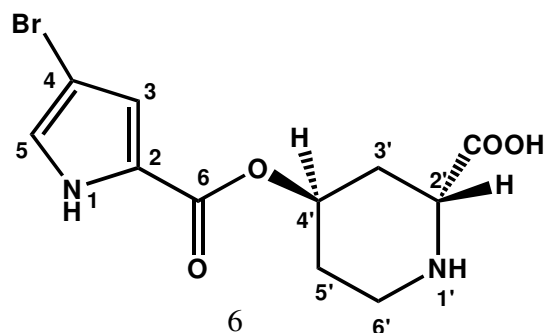
¹¹⁴ Moloney, M. G. *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, 205; Ho, B., Zabriskie, T. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 739; Romeo, J. T., Swain, L. A., Bleecker, A. B. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 1615; Vanderhaeghe, H., Janssen, G., Compennolle, F. *Tetrahedron Letters*, **1971**, *28*, 268; Clark-Lewis, J. W., Mortimer, P. I. *J. Chem. Soc.*, **1961**, 189.

¹¹⁵ Copeland, T. D., Wondrak, E. M., Toszer, J., Roberts, M. M., Oraszlan, S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1990**, *169*, 310.

¹¹⁶ Dragovich, P. S., Parker, J. E., French, J., Incacuan, M., Kalish, V. J., Kissinger, C. R., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Moomaw, E. W., Parge, H. E., Pelltier, L. A. K., Prince, T. J., Showalter, R. E., Tatlock, J. H., Tucker, K. D., Villafranca, J. E. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1872

¹¹⁷ Gillard, J., Abraham, A., Anderson, P. C., Beaulieu, P. L., Bogri, T., Bousquet, Y., Grenier, L., Guse, Y., Lavellée, P. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2226

317 e 319 [M+H]⁺ in rapporto 1:1, suggerendo un composto con un solo atomo di bromo. Lo spettro ¹³C-NMR in CD₃OD presentava 11 segnali, composti da 3 carboni metilenici, 4 carboni metinici e 4 carboni non protonati, in accordo agli esperimenti DEPT e HSQC. L'analisi combinata dei dati NMR e dello spettro di massa è risultata compatibile con la formula molecolare C₁₁H₁₃N₂O₄Br, che contiene sei gradi di insaturazione.



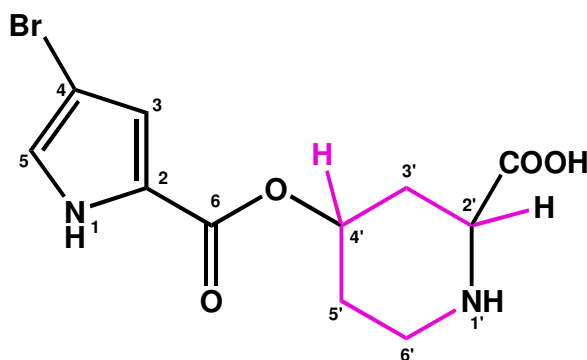
Dallo spettro ¹³C-NMR si è ricavato che quattro delle sei insaturazioni erano doppi legami, due appartenevano a gruppi carbonilici, uno come parte di un estere coniugato e l'altro di un acido libero; da ciò è stato dedotto che la molecola dovesse essere biciclica. L'analisi dello spettro ¹H-NMR (CD₃OD) di **67** ha rilevato la presenza di due segnali aromatici a δ 6.92 e δ 7.01, un segnale metilenico deschermato (δ 3.17, H_a; 3.20, H_b), due segnali metinici sp³ deschermati (δ 3.74 e 5.31), e due metileni parzialmente sovrapposti risonanti nella regione 1.9-2.4 ppm (Tabella 1).

L'interpretazione dello spettro COSY ha identificato le connessioni dei protoni nella damipipecolina e ha rivelato la presenza di due distinti sistemi di spin appartenenti a due anelli azotati.

Un successivo esperimento HSQC ha permesso di assegnare le risonanze degli atomi di carbonio protonati presenti nello spettro ¹³C-NMR. La presenza

dell'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico è stata dedotta dai valori di chemical shifts e dalla molteplicità dei segnali dei protoni aromatici che costituiscono uno dei due sistemi di spin, e dal pattern di risonanze presenti nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (δ 124.5, 97.8, 117.7, 123.0, 159.9). Questa ipotesi è stata pienamente confermata dal confronto dei dati dell'NMR di **67** con quelli riportati in letteratura per gli altri alcaloidi bromopirrolici¹¹⁸; questa porzione della molecola contiene due doppi legami CC, una funzione esterea ed un ciclo.

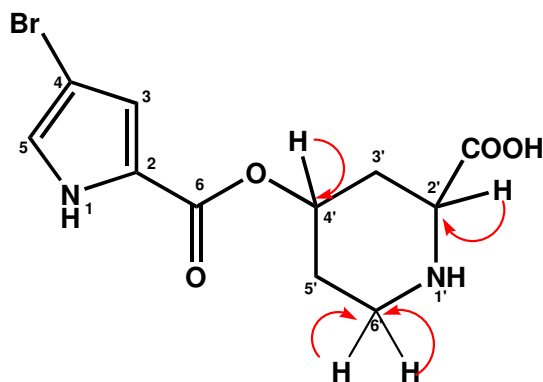
La rimanente parte della molecola, che contiene l'unità $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2$, è composta di tre gruppi metilenici, due gruppi metinici deschermati sp^3 e una funzione carbossilica. Analizzando le correlazioni COSY nello spettro registrato in CD_3OD , iniziando dai segnali metinici deschermati a δ 3.74, è stato osservato un largo sistema di spin, corrispondente al segmento H-2'/2H-6'.



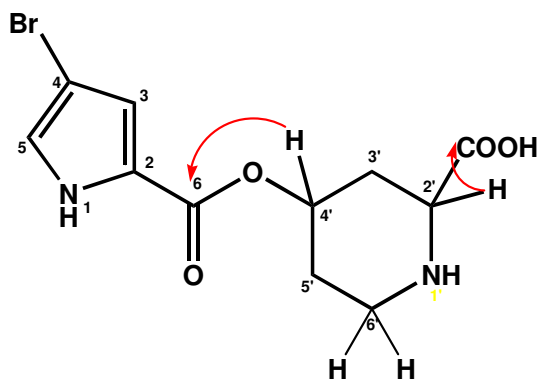
Nello spettro HSQC, il segnale protonico risonante a δ 5.31 (H-4') di questo sistema di spin risulta correlato al segnale a δ 67.8, il che indica chiaramente un protone legato ad un carbonio ossigenato. Dai valori di chemical shift dei carboni C-2' e C-6' (δ 56.4 e 40.2) è stato dedotto che entrambi i carboni sono legati ad un atomo di azoto ed il picco di correlazione presente nello spettro

¹¹⁸ Foley, L. H.; Habgood, G. J.; Gallagher, K. S. *Mag. Res. Chem.* **1988**, 26, 1037.

HMBC tra il segnale H-2' (adiacente all'azoto) e il carbonio risonante a δ 179.9 ha suggerito che la funzione carbossilica è posizionata al C-2'.



Sulla base delle combinazioni di questi dati NMR, è stato dedotto che l'unità $C_6H_{10}NO_2$ di **67** è l'acido 2-piperidin-carbossilico 4-sostituito, cioè un derivato dell'acido pipecolico. Il protone ossimetinico sul C-4' (δ 5.31) rivela una eterocorrelazione nello spettro HMBC con il carbonio C-6 (δ 159.9); ciò indica che il C-4' è connesso con la porzione dell'acido bromopirrolcarbossilico attraverso un legame estereo.

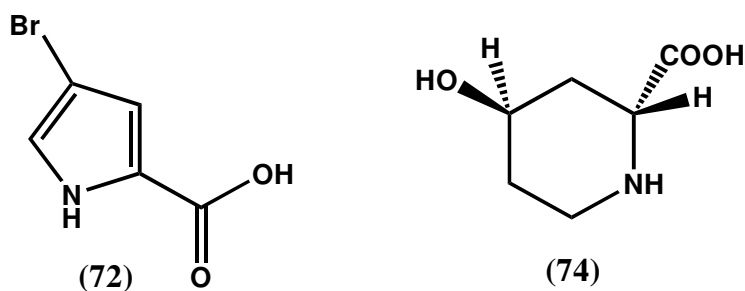


La stereochimica relativa dei due sostituenti sull'anello dell'acido pipecolico è stata definita dall'analisi delle costanti di accoppiamento $^1H-^1H$. Il protone del C-2', un protone α dell'acido pipecolico risonante a δ 3.74, appare come un doppio doppietto con un accoppiamento grande di 12 Hz e un accoppiamento debole di

3Hz con i protoni del C-3' adiacente, inoltre H-4' mostra piccoli valori di J con i protoni degli adiacenti C-3' e C-5'. Assumendo che l'anello piperidinico assume una conformazione a pseudo-sedia, una stereochimica relativa di tipo *trans* dell'acido pipecolico 4-sostituito, in cui i protoni H-2' e H-4' occupano rispettivamente una posizione assiale ed una equatoriale, giustificerebbe il quadro dei valori di accoppiamento osservato.

La stereochimica assoluta della porzione amminoacidica è stata determinata attraverso l'idrolisi acida della damepipecolina (**67**), effettuata con HCl 1N in H₂O a 80°C per una notte. Le porzioni **72** e **74** sono state facilmente identificate attraverso il confronto dei dati spettroscopici con quelli riportati in letteratura¹¹⁹; in particolare, i dati NMR dell'acido 4-idrossipipecolico erano identici a quelli riportati in letteratura per l'isomero *trans* (2*R*,4*R*), e ciò ha confermato la stereochimica relativa proposta per la damepipecolina (**67**).

Sia il segno che il valore assoluto del potere ottico rotatorio specifico sono risultati perfettamente sovrapponibili a quelli dell'acido (2*R*,4*R*)-4-idrossipipecolico riportato in letteratura, e tutto ciò ha chiaramente indicato che la stereochimica assoluta della porzione amminoacidica della damepipecolina è (2*R*,4*R*).



¹¹⁹ Agami, C.; Couty, F.; Poursoulis, M.; Vaissermann, J. *Tetrahedron* **1992**, 48, 431.

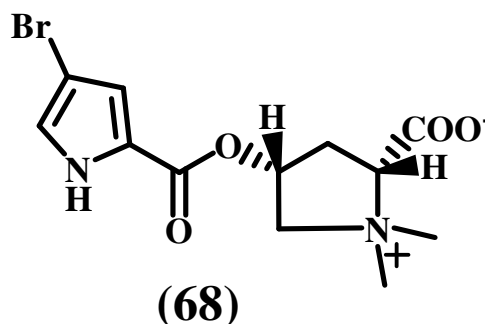
POS.	Damipecolina (67) ^a		Acido pipecolico(74) ^b	
	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)
2	123.6	-	-	-
3	124.5	7.01 (d, 1.6)	-	-
4	97.8	-	-	-
5	117.7	6.92 (d, 1.6)	-	-
6	159.9	-	-	-
2'	56.4	3.74 (dd, 12, 3.4)	54.1	3.82 (dd, 12, 3)
3'	32.9	Ha: 2.40 (bd, 14,7) Hb: 1.91 ^c	32.7	2.11 (dt, 14.3, 3.3) 1.86 ^c
4'	67.8	5.31 (bs)	62.0	4.12 (bs)
5'	28.5	Ha: 2.01 ^c Hb: 1.98 ^c	29.0	1.81 ^c
6'	40.2	Ha: 3.17 (m) Hb: 3.20 (m)	38.7	3.20 (m)
COOH	179.9	-	174.5	-

Tabella 8.: ¹H e ¹³C NMR di **67** e **74** ^aDati registrati in CD₃OD, ^bDati registrati in D₂O

Il nuovo alcaloide bromopirrolico damepipecolina (**67**) estende la variabilità strutturale dei già conosciuti alcalodi pirrolici, dato che la sua struttura manca del corto segmento lineare alifatico comunemente presente che lega la porzione dell'acido bromopirrol-2-carbossilico al comune nucleo imidazolico. Fin ad ora, questa caratteristica è stata trovata solo nelle manzacidina A-C¹⁰⁹, nell'angelongina¹¹⁰, e nel suo analogo con un solo atomo di bromo, la daminina, isolata dalla stessa spugna *A. damicornis*¹³.

7.3.2 Damituricina da *A. damicornis*

La struttura planare della damituricina (**68**) è stata determinata attraverso metodi spettroscopici. Essa risulta composta da un acido 4-bromopirrol-2-carbossilico connesso mediante legame estereo all'acido (2*R*,4*R*)-*cis*-*N,N'*-dimetil-4-idrossiprolina. Lo spettro di massa ESI (in modalità positiva) di **68** ha mostrato due picchi di ioni pseudomolecolari a rapporto m/z 331 e 333 $[M+H]^+$ nel rapporto 1:1, indicando la presenza di un solo atomo di bromo. Lo spettro ^{13}C -NMR registrato in CD_3OD ha presentato segnali di dodici carboni, che sono stati identificati attraverso gli esperimenti DEPT e HSQC come due carboni metilici, due carboni metilenici sp^3 , due carboni metinici sp^2 , due carboni metinici deschermati sp^3 e quattro carboni deprotonati.



L'analisi combinata dei dati NMR e dello spettro di massa ha suggerito per il composto la formula molecolare $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$, indicando sei elementi di insaturazione. Dai dati dello spettro ^{13}C -NMR è stato evidenziato che delle sei insaturazioni, due corrispondono a doppi legami $\text{C}=\text{C}$ e due appartengono ai due gruppi carbonilici presenti nella struttura molecolare, uno come parte di un estere coniugato e l'altro come acido carbossilico libero. Il tutto ha portato alla conclusione che la struttura molecolare della damituricina fosse una struttura tipo biciclica. Il confronto degli spettri ^{13}C -NMR e ^1H (Tab.8 e 9) dei composti **67** e

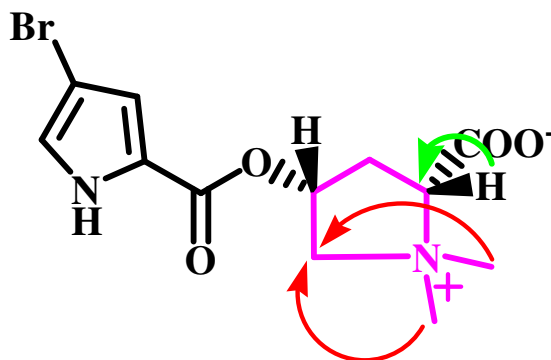
68 ha evidenziato delle similitudini strutturali tra i due composti. In particolare, i valori di chemical shifts dei carboni e dei protoni aromatici risuonanti rispettivamente a δ_c 124.3, 122.2, 97.1, 117.5 e δ_H 7.05 e 6.95 per il composto **68**, sono risultati praticamente identici a quelli di **67**, indicando, nella damituricina (**68**), la presenza della stessa porzione costituita dall'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico della damipecolina (**67**), connessa mediante legame estereo (δ_c 159.2) ad una differente unità ciclica. Ciò è stato confermato da un successivo esperimento HSQC che ha permesso di assegnare le risonanze degli atomi di carbonio protonati presenti nello spettro ^{13}C -NMR. Quindi la presenza dell'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico è stata dedotta dai valori di chemical shifts e dalla molteplicità dei segnali dei protoni aromatici che costituiscono uno dei due sistemi di spin rilevati, e dal pattern di risonanze presenti nello spettro ^{13}C -NMR. Questa ipotesi è stata poi pienamente confermata dal confronto dei dati NMR della damituricina (**68**) con quelli riportati in letteratura per gli altri alcaloidi bromopirrolici.

La restante parte della molecola è composta da due carboni metinici deschermati sp^3 , due carboni metilenici sp^3 , due carboni metilici ed un carbonio deprotonato. Oltre ai segnali relativi alla porzione pirrolica, l'analisi dello spettro protonico ha mostrato risonanze di due protoni singoletti risuonanti a δ_H 3.43 e 3.34, attribuibili, anche sulla base dei valori di chemical shifts dei carboni deschermati a cui sono rispettivamente legati (δ_c 52.3 e 46.7), ai metili presenti sull'azoto del composto ammonico quaternario.

Lo spettro ^1H -NMR ha rivelato, inoltre, due sistemi AB attribuibili ai gruppi metilenici in posizione 3 e 5 (2H_3 : δ 2.64, H_a ; 3.10, H_b - 2H_5 : δ 3.98, H_a ;

3.92, H_b) e due segnali di protoni legati a carboni metinici sp³ deschermati risuonanti a δ_H 4.19 e 5.56. L'interpretazione dello spettro COSY ha indicato che questi ultimi due segnali appartengono ad un unico largo sistema di spin, in accordo anche con i dati dello spettro della massa. Ciò ha indotto a considerare, nella struttura della molecola, l'esistenza di un anello a cinque termini contenente un azoto.

Ulteriori conferme di quanto è stato dedotto sono state fornite dallo spettro HMBC, nel quale è evidente che entrambi i protoni dei metili sull'azoto sono correlati con un lungo range al carbonio metilenico (C-5') risuonante a δ_C 72.0 ed al carbonio metinico deschermato sp³ (C-2') risuonante a δ_C 75.7. Si è così dedotto che lo stesso atomo di azoto è legato al carbonio C-5', al carbonio C-2' e ai carboni metilici. Inoltre nello spettro HMBC è presente un picco di correlazione tra il protone (H-2') risuonante a δ 4.19 ed il carbonile risuonante a δ_C 169.0, il che dimostra chiaramente come la funzione carbossilica sia connessa al carbonio C-2'.



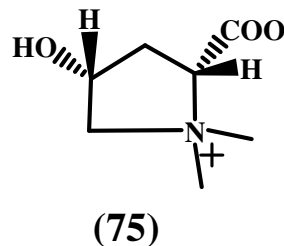
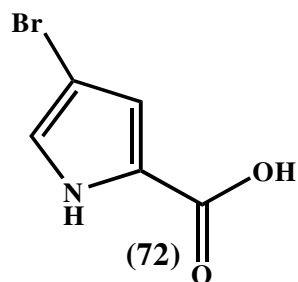
Sulla base di questi risultati ed in accordo con l'insieme delle correlazioni degli esperimenti COSY, HSQC, HMBC, è possibile affermare che la porzione aminoacidica della damituricina (**68**) è rappresentata da un'unità di acido *N,N'*-dimetil-4-idrossipirrolidin-2-carbossilico (4-idrossiprolina betaina). Un'ulteriore correlazione HMBC tra il protone ossimetinico (H-4') risuonante a δ_H 5.56 ed il

carbonile estereo risuonante a δ_C 159.2 ha suggerito che questa unità è connessa alla porzione acido bromopirrolcarbossilica attraverso un legame estereo. I valori di chemical shifts relativi allo spettro ^1H e ^{13}C -NMR sono riportati dettagliatamente nella Tabella x. La struttura cristallina dei due distereoisomeri betonicina (*trans*-*N,N'*-dimetil-4-idrossi-L-prolina, levorotatoria) e turicina (**75**) (*cis*-*N,N'*-dimetil-4-idrossi-D-prolina, destrorotatoria) è stata precedentemente determinata mediante i rispettivi idrocloridrati¹²⁰; inoltre, sono riportati in letteratura i dati NMR del diastereoisomero *trans*, isolato dall'estratto delle foglie delle specie di *Melaleuca*¹²¹. In accordo con i dati presenti in letteratura, la stereochimica relativa *cis* dell'unità di betaina presente nella molecola della damituricina, è stata assegnata sulla base dei risultati di un esperimento ROESY. Infatti, è stato osservato un intenso picco di correlazione tra il protone H-2' (δ_H 4.19) ed il protone H-4' (δ_H 5.56), il che è in accordo solo con una orientazione *cis* del gruppo carbossilico sul C-2' e della porzione acilica sul C-4'. La stereochimica assoluta della porzione amminoacidica di **68** è stata invece valutata e determinata attraverso un'idrolisi acida della damituricina, effettuata con HCl 1N in H₂O alla temperatura di 80 °C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto e successivamente purificata in HPLC, fornendo 1 mg di acido 4-bromopirrol-2-carbossilico (**72**) ed 1, 3 mg della turicina (+)-*cis*-*N,N'*-dimetil-4-idrossi-D-prolina (**75**). Sia il segno che il valore assoluto del potere ottico rotatorio specifico sono risultati perfettamente sovrapponibili a quelli riportati in

¹²⁰ Jones, G. P.; Naidu, B. P.; Paleg, L. G.; Tienik, E. R. T. *Acta Cryst.* **1988**, *C44*, 2208.

¹²¹ Jones, G. P.; Naidu, B. P.; Paleg, L. G.; Tienik, E. R. T.; Snow, M. R. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3343.

letteratura per la turicina (75)¹²². Sulla base di questi risultati, la stereochimica assoluta della porzione amminoacidica della damituricina (68) è risultata essere (2*R*,4*R*).



POS.	Damituricina (68) ^a		D-turicina (75) ^b	
	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)
2	122.2	-	-	-
3	124.3	7.05(d, 1.6)	-	-
4	97.1	-	-	-
5	117.5	6.95 (d, 1.6)	-	-
6	159.2	-	-	-
2'	75.7	4.19 (dd, 12.3, 8.5)	76.2	4.05 (dd, 12.5, 8.5)
3'	33.6	H _a : 3.10 (m) H _b : 2.64(ddd,15,12.3,4.1)	36.2	H _a :2.89 (m) H _b :2.25 (ddd,15.3, 12.1,4.0)
4'	68.9	5.56 (m)	65.8	4.63 (m)
5'	72.0	H _a : 3.98 (bd,13.5) H _b : 3.92 (dd,13.5,6.6)	74.5	H _a :3.62 (bd, 13.2) H _b :3.67 (dd, 13.2, 6.8)
6'	-	-	-	-
COOH	169.0	-	170.4	-
N-Me	Me _a :52.3	Me _a :3.43 (s)	Me _a :53.1 (s)	Me _a :3.26 (s)
	Me _b :46.7	Me _b :3.34 (s)	Me _b :47.8 (s)	Me _b :3.19 (s)

Tabella 9. ¹H e ¹³C NMR di damituricina (68) e D-turicina (75); ^aDati registrati in CD₃OD, ^bDati registrati in D₂O

¹²² (a) Kueng, A.; Trier, G. Z. Physiol. Chem. 1913, 85, 209; (b) Patchett, A. A.; Witkop, B. J. Am. Chem. Soc. 1957,79, 185.

7.4 Regolazione della trasmissione serotoninergica

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) è un indoletilammina appartenente alla classe delle ammine biogene (trasmettitori indolamminici e monoamminici). Si forma nei sistemi biologici a partire dall'amminoacido L-triptofano per ossidrilazione dell'anello indolico, seguita dalla decarbossilazione dell'amminoacido. Dopo la sintesi l'ammina libera è immagazzinata o rapidamente inattivata in genere per ossidazione catalizzata da monoaminoossidasi. Le azioni della serotonina sono mediate da una serie di recettori situati sulla membrana cellulare. I recettori serotoninergici caratterizzati finora possono essere classificati in tre differenti gruppi :

1. trasportatori (5-HT "uptake site"),
2. ligando-dipendente associato a canale ionico (5-HT₃),
3. accoppiati a proteine G (il più ampio gruppo)¹²³

Sulla base dei dati di sequenza sono state distinte sette famiglie di sottotipi del recettore per la 5-HT (5-HT₁-5-HT₇), delle quali sei includono per lo più recettori accoppiati a proteine G, mentre una include recettori associati a canali ionici¹²⁴. Fra questi sottotipi recettoriali, molti non hanno ancora una funzione fisiologica conosciuta. Il riconoscimento di queste funzioni è probabilmente subordinato allo sviluppo di farmaci dotati di selettività verso singoli sottotipi recettoriali. I neuroni serotoninergici possono essere trovati pressoché in ogni area cerebrale e sono coinvolti nel controllo di diverse

¹²³ Boess, F. G.; Martin, I. L. *Neuropharmacology* **1994**, 33,275.

¹²⁴ Zifa, E.; Fillion, G. *Pharmacol. Rev.* **1992**, 44, 401.

funzioni incluso il tono dell' umore, il sonno, il senso di fame, la regolazione della temperatura e della pressione arteriosa, la percezione del dolore ed il vomito. La serotonina, infatti, modula numerose funzioni biologiche del sistema nervoso centrale: influenza i processi legati alla memoria, all' apprendimento, al comportamento sessuale e a quello alimentare. Sembra che la serotonina sia anche coinvolta nella regolazione dell'aggressività, nella regolazione del sistema endocrino mediante il rilascio dall'adenoipofisi di adenocorticotropina (ACTH), di corticosterone, di prolattina e di gonadotropine dirette verso differenti organi.

L'alterazione dei livelli di serotonina e quindi l'alterazione della funzione serotoninergica è stata correlata ad alcune disfunzioni a carico del sistema nervoso centrale, come disordini affettivi, allucinazioni, disturbi del moto, schizofrenia ed emicrania. Il sistema serotoninergico gioca un ruolo importante e significativo anche nell'insorgenza della depressione, disturbo affettivo caratterizzato da modificazioni dell'umore e dovuto proprio alla riduzione del tono serotoninergico. Gli inibitori del re-uptake della 5-HT esplicano un'attività antidepressiva, in quanto si legano alla proteina ricaptatrice presente nella zona presinaptica, bloccando così la ricaptazione della 5-HT del 90-95% ed aumentando il tono serotoninergico. Alcune forme di fobia sembrano essere associate ad un incremento del tono serotoninergico; gli antagonisti del recettore della 5-HT sono efficaci nel trattamento di queste psicosi per ridurre il tono serotoninergico. I recettori 5-HT₁ presentano un'elevata affinità per la serotonina, contrariamente ai recettori 5-HT₂ e 5-HT₄, e sono implicati nella patogenesi di molti disturbi, divenendo oltretutto un importante bersaglio nella terapia farmacologica.¹²⁵ I

¹²⁵ Passchier, J.; van Waarde, A. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28,113.

recettori 5-HT₃ invece, sono prevalentemente usati come bersaglio degli antiemetici per prevenire nausea e vomito indotti da chemioterapici.¹²⁶

7.5 Attività biologica della damipecolina e della damituricina sui recettori serotoninergici

I nuovi alcaloidi bromopirrolici damipecolina (**67**) e damituricina (**68**) estendono la varietà strutturali degli alcaloidi noti sin ad ora, in quanto le loro strutture non presentano il corto segmento lineare alifatico comunemente ritrovato e che lega la porzione bromopirrol-2-carbossilica al nucleo imidazolico. Ad oggi, queste caratteristiche strutturali sono state ritrovate solo nelle manzacidine A-C¹⁰⁹, nell'agelongina (**70**), e nel suo analogo non bromurato, la daminina (**73**)¹¹², isolata dalla stessa spugna *A. damicornis*.

Molti alcaloidi bromopirrolici hanno mostrato di possedere importanti attività biologiche come quella antibatterica¹⁰¹, antifungina¹⁰¹, antitumorale¹²⁷, anti-istaminergica¹²⁸ ed immunosoppressiva¹²⁷; alcuni di essi hanno mostrato di possedere azione antagonista sul recettore α -adrenergico¹²⁹ e sul recettore serotoninergico¹¹⁰.

Test *in vitro* hanno evidenziato che la damipecolina (**67**) e la damituricina (**68**) hanno effetti modulatori sull'attività del recettore della serotonina. Questi studi hanno evidenziato che la damipecolina è un potente antagonista della serotonina nelle cellule neuronali; gli effetti del neurotrasmettitore sono praticamente bloccati dopo preincubazione con 0.1 $\mu\text{g/mL}$

¹²⁶ Lindley, C.; Blower, P. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **2000**, *57*, 1685.

¹²⁷ European Patent Application No. 94302770.6.

¹²⁸ Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Vallefuoco, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283.

¹²⁹ Kobayashi, J.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y. *Experientia* **1988**, *44*, 86.

e 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del composto **67**, (~88% e 70% di riduzione). L'aumento delle concentrazioni di **67** ha stranamente causato una diminuzione dell'attività antiserotoninergica. Infatti, ad una concentrazione pari a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di **67**, dell'afflusso di ioni calcio nei neuroni è stato ridotto di ~62%, mentre la preincubazione dei neuroni con concentrazioni ≥ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di damipecolina non ha indotto una diminuzione del calcio dopo aggiunta di 5-HT/ CaCl_2 .

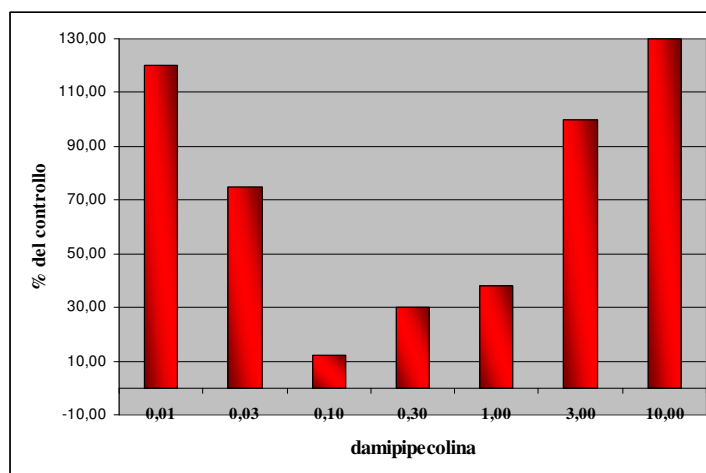


fig.15: effetto delle differenti concentrazioni di **67** sui livelli di serotonina

I test condotti sulla damituricina (**68**) hanno evidenziato che questo metabolita possiede una buona attività antiserotoninergica, seppure meno marcata rispetto a **67**. Infatti, la preincubazione dei neuroni con 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di damituricina ha indotto una riduzione (circa del 71%) dell'afflusso di ioni calcio dopo aggiunta di 5-HT/ CaCl_2 . L'aumento della concentrazione a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ha causato anche per **68** una minore riduzione dell'afflusso di ioni calcio nei neuroni, rispettivamente del 59% e del 22%(fig. 16).

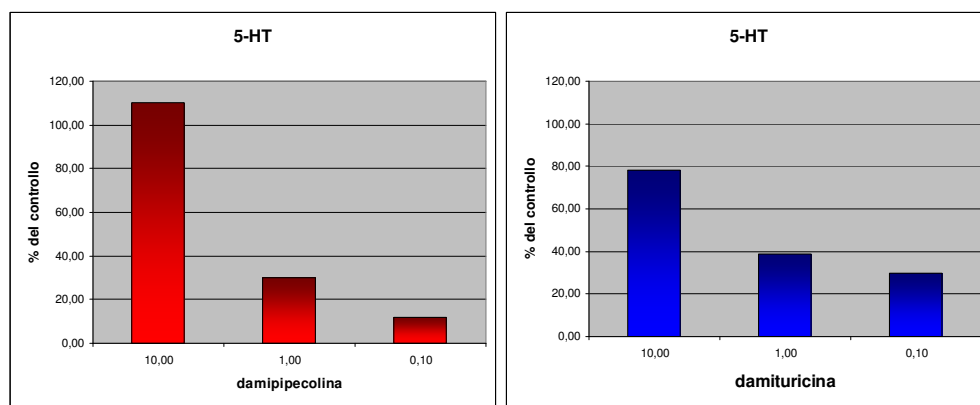


fig.16: effetto di **67** e **68** sui livelli di serotonina.

La causa della ridotta attività a concentrazioni più alte non è ancora nota; essa potrebbe dipendere dalla presenza di differenti recettori per la serotonina a livello del tessuto cerebrale di cui non sono ancora ben note le possibili e diverse modalità d'interazione con i due alcaloidi¹³⁰. E' noto che la 5-HT abbia effetti neurogenici nelle cellule PC12, anche se il percorso di trasduzione del segnale responsabile di questi effetti non è noto¹³⁰. L'aggiunta di 5-HT alle cellule PC12 stimola l'emissione dei neuriti indotta dal nerve growth factor (NGF) in maniera dose dipendente.

La damipecolina (**67**) non ha mostrato effetti significativi sull'afflusso di ioni calcio nelle cellule PC12 ed HEK, mentre la damituricina rallenta l'entrata degli ioni calcio indotta dalla serotonina nelle cellule PC12, bloccando l'effetto della serotonina per più del 50% e generando una riduzione di afflusso ioni calcio pari al 57%. Questi test farmacologici hanno indicato che l'incremento di $[Ca^{2+}]_i$ nelle cellule PC12 indotto dalla 5-HT coinvolge l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendente, generata dalla depolarizzazione della membrana, mediante l'attivazione dei recettori associati a canali cationici ($5-HT_3$)^{130,131}

¹³⁰ Homma, K.; Kitamura, Y.; Ogawa, H.; Oka, K. *J. Neurosci. Res.*, **2006**, 84, 316.

¹³¹ Takenouchi, T.; Munekata, E. *Neurosci. Lett.* 1998, 246,141.

L' effetto può essere bloccato in modalità dose-dipendente con nifedipina^{130,132} (bloccante canali del calcio tipo L voltaggio-dipendente), MDL72222¹³⁰ e metoclopramide¹³¹ (antagonista selettivo del recettore 5-HT₃), ma non con ketanserina¹³⁰ (antagonista del recettore 5-HT₂), o thapsigargina^{130 133}(un inibitore specifico dell'enzima ATP-asico del reticolo endoplasmatico). I risultati ottenuti suggeriscono che la damituricina agisce o come potente antagonista del recettore 5-HT₃ o come bloccante del canale del calcio di tipo L nelle cellule PC12.

Non sono state ottenute particolari informazioni sulla possibile interazione dei composti **67** ed **68** con i recettori del glutammato e dell'NMDA. L-glutammato e L-aspartato sono i più abbondanti neurotrasmettitori eccitatori nel sistema nervoso centrale. Gli effetti eccitotossici dell' L-glutammato sono associati ad un marcato afflusso di ioni Na⁺, K⁺, Ca²⁺ nei neuroni come conseguenza di una prolungata attivazione dei recettori glutammatergici^{133, 134} L-Glu stimola i recettori ionotropici, come il recettore NMDA e i recettori metabotropici. La preincubazione dei neuroni con 0.1, 1 e 10 µg/ml di **67** e **68** non hanno indotto una significativa riduzione di calcio in entrata in presenza di L-Glu o NMDA, indicando che la damituricina non si lega ai recettori del L-Glu o dell'NMDA. Ulteriori studi potrebbero essere effettuati sui composti **67** ed **68** al fine di ottenere informazioni riguardo il loro meccanismo d'azione e le relazioni struttura- attività. Tuttavia, alcuna indicazioni possono essere ottenute dai dati precedentemente riportati su composti strutturalmente relazionati. Gli esperimenti

¹³² Takenouchi, T.; Munekata, E. *Neurosci. Lett.* 1998, 246,141.

¹³³ Stys, P. K. *Curr. Mol. Med.* **2004**, 4, 113.

¹³⁴ Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, 48, 4827.

condotti su alcaloidi pirrolici per valutare le interazioni con l'omeostasi del calcio cellulare ha portato a relazioni di tipo struttura-attività che hanno sottolineato che l'importanza sia del grado di bromurazione della porzione pirrolica che della presenza di un gruppo amminoimidazolico¹³⁵. In particolare, questi studi hanno rivelato che la porzione dell'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico (**72**) non è responsabile da sola dell'effetto biologico degli alcaloidi pirrolici bromurati e che sia l'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico che l'acido pirrol-2-carbossilico non hanno diminuito l'afflusso del calcio voltaggio-dipendente nelle cellule PC12¹³⁵. In aggiunta, la differente potenza tra l'acido 4,5-bromopirrol-2-carbossilico e l'oroidina (più attiva), nella quale questa porzione è legata al gruppo amminoimidazolico attraverso un corto segmento lineare alifatico, rivela l'importanza di questo gruppo. Ciò è stato successivamente supportato da recenti studi che hanno mostrato una marcata attività serotoninergica per gli alcaloidi pirrolici hymenidina, oroidina, ed il loro analogo non bromurato, la clathrodina¹³⁶,¹³⁷, nonché la perdita di attività delle dispacamidi, nelle quali il gruppo amminoimidazolico è ossidato a porzione amminoimidazolonica.¹²⁸

La bioattività mostrata da damipecolina e damituricina suggerisce che gli effetti antiserotoninergici sono associati agli anelli bromopirrolici quando questi sono legati sia ad anelli amminoimidazolici che ad altri anelli eterociclici azotati, come porzioni pirrolidiniche e piperidiniche. Al fine di chiarire il meccanismo d'azione dei composti **67** e **68**, potrebbero essere necessari degli ulteriori esperimenti per valutare gli effetti di damipecolina e damituricina sui livelli del

¹³⁵ Bickmeyer, U.; Drechsler, C.; Kock, M.; Assmann, M. *Toxicon* **2004**, *44*, 45.

¹³⁶ Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Hirata, Y. *Experientia* **1986**, *42*, 1176.

¹³⁷ Rosa, R.; Silva, W.; de Motta, G. E.; Rodríguez, A. D.; Morales, J. J.; Ortiz, M. *Experientia* **1992**, *48*, 885.

calcio in presenza di agonisti selettivi dei recettori 5-HT, come sumatriptan, 1-(2,5-dimetossi-4-iodofenil)-2-amminopropano¹³⁸.

In conclusione, damipipecolina e damituricina sembrano essere nuovi e promettenti antagonisti della serotonina con un potenziale utilizzo nella terapia dei disordini associati ai cambiamenti dei livelli serotoninergici, come psicosi, emesi indotta da chemioterapici, psicosi, differenti fobie e sbalzi d'umore.

Di seguito sono riportati nel dettaglio i vari esperimenti condotti sui due alcaloidi.

7.6 Effetti citotossici

Test sulla sopravvivenza cellulare effettuati usando metodi di analisi MTT¹³⁹ rivelano che damipipecolina e damituricina non sono tossici ad una concentrazione uguale o inferiore a 10µg/ml, per nessuna delle linee cellulari testate (cellule PC12, HeLa , L5178y).

7.7 Effetti della damipipecolina, della damituricina e della serotonina sui livelli di calcio nei neuroni primari.

In seguito a stimolazione con 200 µM di serotonina e 2, 5 mM di CaCl₂, nelle cellule neuronali primarie (colture di cellule corticali di ratto) si è verificato un aumento marcato della concentrazione di ioni calcio liberi intracellulari ([Ca²⁺]_i)

¹³⁸ Esterle, T. M.; Sanders-Bush, E. J. *Neurosci.* **1992**, 12,4775.

¹³⁹ Bringmann, G.; Lang, G.; Mühlbacher, J.; Schaumann, K.; Steffens, S.; Rytik, P. G.; Hentschel, U.; Morschhäuser, J.; Brun, R.; Müller, W. E. G. In: *Marine Molecular Biotechnology*; Müller, W. E. G., Ed.; Springer-Press: Berlin, **2003**; p. 231.

Le immagini di fluorescenza, ottenute usando l'indicatore Ca^{2+} dye fura-2, mostrano un forte shift dal blu scuro al blu chiaro, verde, arancio e rosso in tutte le cellule immediatamente (in 30 sec.) dopo l'aggiunta di 5-HT/ CaCl_2 effettuata 10 minuti dopo l'inizio dell' esperimento. (fig.17A-c).

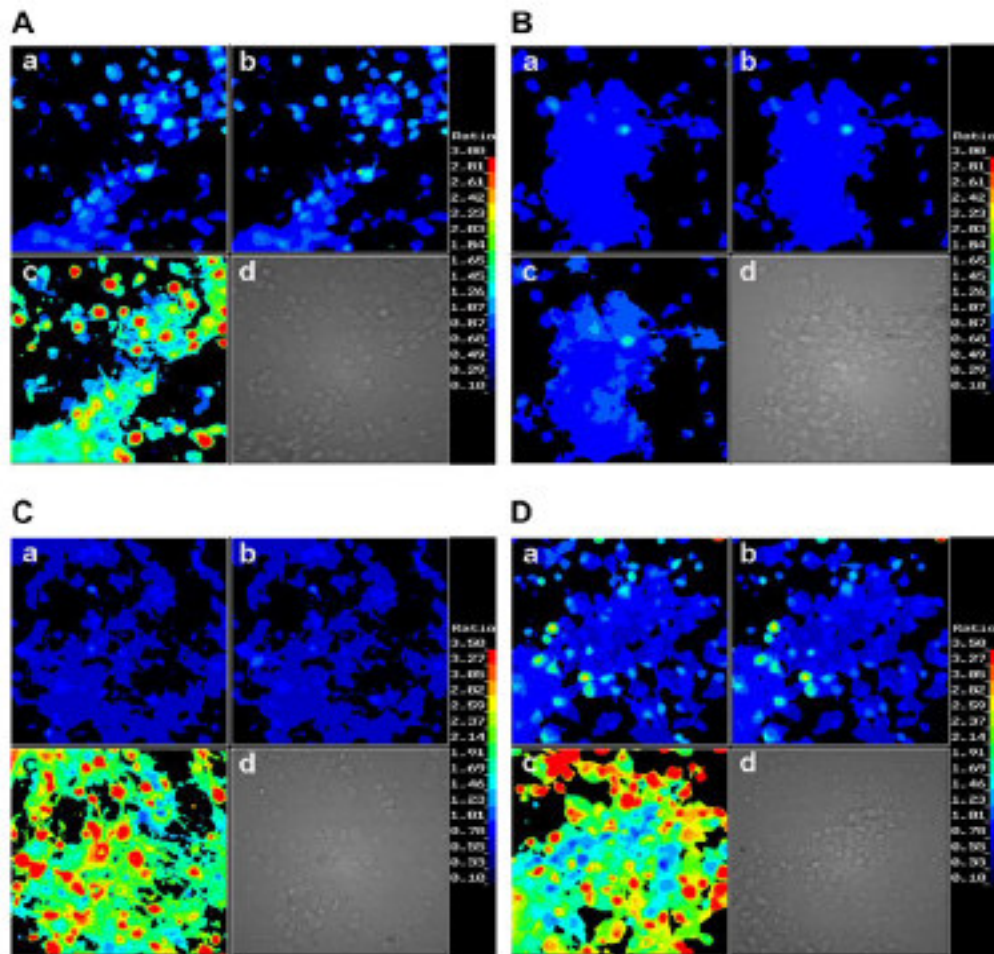


Fig. 17: Effetto della damipicolina (67) sull'aumento dei livelli di $[\text{Ca}_2^+]_i$ indotto da 5-HT (A, B) e L-Glu (C, D) nelle cellule neuronali primarie. Le cellule sono state preparate con fura-2-AM ed analizzate con il sistema della fluorescenza. Le immagini della fluorescenza sono state registrate al tempo zero (a), dopo 5 (b) e 10 min (c). In (d) le cellule sono state analizzate con il metodo del contrasto differenziale di interferenza di Nomarski. (A, B) Effetto sull'aumento dei livelli di $[\text{Ca}_2^+]_i$ indotto da 5-HT. (A-a) inizio delle misurazioni (tempo: 0 min). (A-b) Aggiunta di 0.1% (v/v) DMSO (controllo; 5 min). (A-c) Aggiunta di 200 μM di 5-HT e 2.5 mM Ca_2^+ (10 min). (B-a) Tempo zero. (B-b) Aggiunta di 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del composto **67** (5 min). (B-c) Aggiunta di 5-HT/ Ca_2^+ (10 min). (C, D) Effetto sull'aumento dei livelli di $[\text{Ca}_2^+]_i$ indotto da L-Glu. (C-a) Tempo zero. (C-b) Aggiunta di 0.1% (v/v) DMSO (controllo; 5 min).. (C-c) Aggiunta di 200 μM di L-Glu e 2.5 mM Ca_2^+ (10 min). (D-a) Tempo zero. (D-b) Aggiunta di 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del composto **67** (5 min). (D-c) Aggiunta di $\text{L-Glu}/\text{Ca}_2^+$ (10 min). il colore degli spetri varia da blu (bassa $[\text{Ca}_2^+]_i$) a rosso (alta $[\text{Ca}_2^+]_i$). ingrandimento di 400 volte.

L'aggiunta di 0.1 µg/ml del composto **67** ha ridotto fortemente l'aumento del calcio intracellulare indotto da serotonina (Fig. 17B-c). In figura 17A e 17B, è riportata una foto delle cellule alla fine dell'esperimento. I maggiori effetti sul calcio intracellulare nei neuroni è stato osservato dopo preincubazione delle cellule per 5 minuti con 0.1 µg/ml del composto **67** (fig 15) seguita da applicazione di 5-HT/CaCl₂ (riduzione all'11.2 % ± 0.8%). Un'analisi quantitativa ha rivelato che l'aumento nel valore di 340/380 nm è stato significativamente ridotto quando 0.3 o 1 µg/ml del composto **67** sono stati aggiunti alle cellule. A concentrazioni più alte o più basse, il composto è divenuto meno attivo; nessun effetto sulla variazione della concentrazione del calcio intracellulare indotta da serotonina è stato rilevato a concentrazioni pari a 0.01, 3 e 10 µg/ml del composto **67** (fig 15). La preincubazione delle cellule neuronali per 5 minuti con una soluzione di 10 µg/ml di damituricina ha portato un piccolo decremento dei valori della [Ca²⁺]_i pari a 79.3%. Al contrario, la preincubazione per 5 minuti del neurone con dosi 10 e 100 volte inferiori (1 e 0,1µg/ml) di damituricina ha provocato una significativa riduzione dell'influsso di ioni calcio (p < 0.001), dopo aggiunta di 5-HT/CaCl₂. I valori della [Ca²⁺]_i diminuiscono al 41,8±4,5% con 1µg/ml ed al 29,5 ± 9,5% con 0,1 µg/ml rispettivamente.

7.8 Effetti della damipicolina, della damituricina e della serotonina sui livelli di Ca²⁺ nelle cellule PC12 e HEK.

Lo stesso tipo di esperimenti condotti sulle linee cellulari PC 12, HeLa and HEK hanno dato i seguenti risultati. Il trattamento di tali cellule con 200 µM di 5-HT e 2.5 mM di CaCl₂ ha provocato solo un lieve aumento della [Ca²⁺]_i (espressa

come rapporto 340/380 nm) rapporto Δ 0.096 (cellule PC12), rapporto Δ 0.037 (cellule HeLa), e rapporto Δ 0.115 (cellule HEK). I valori di controllo sono stati settati sul 100%.

La preincubazione delle cellule PC12 e delle cellule HEK per 5 min con 1 $\mu\text{g/ml}$ di damipiecolina non ha indotto alcun significativo cambiamento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dopo aggiunta di 5-HT/ CaCl_2 , mentre la preincubazione delle cellule HeLa con la damipiecolina nelle stesse condizioni ha provocato un forte aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (2.7-volte).

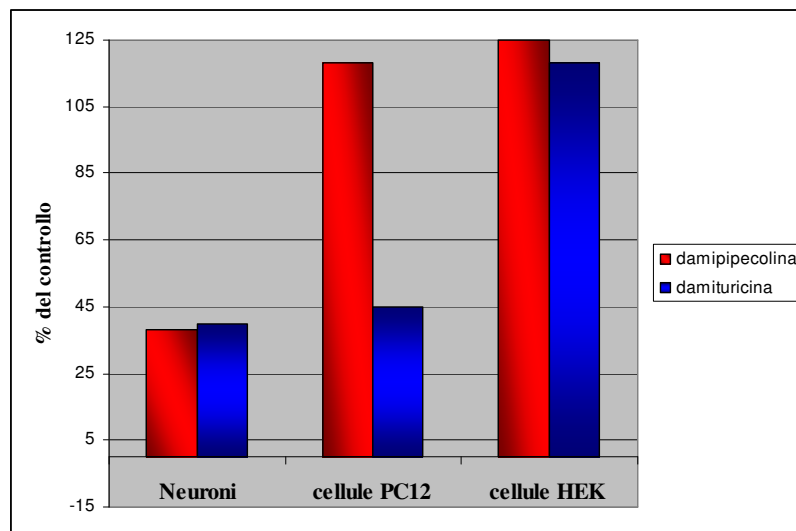


fig.18: incubazione dei neuroni primari, delle cellule PC12 ed HEK con 200 μM di 5H-T e 2.5 mM di CaCl_2 in presenza di 1 $\mu\text{g/ml}$ di **67** e **68**.

Il trattamento di preincubazione delle cellule PC12 per 5 minuti con una soluzione di 1 $\mu\text{g/ml}$ di damituricina ha indotto un cambiamento significativo della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dopo aggiunta di 5-HT/ CaCl_2 , che è diminuita al $43.8 \pm 18.4\%$. Tuttavia la preincubazione delle cellule HEK con la damituricina nelle stesse condizioni non ha provocato variazioni evidenti in termini di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig 18).

7.9 Effetti della damituricina e dell'acido L-Glutammico sui livelli di Ca^{2+} nei neuroni primari.

La stimolazione delle cellule neuronali primarie con 200 μM di acido L-Glutammico e 2,5 mM di CaCl_2 ha provocato un significativo aumento ($p < 0.001$) della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ da $0,704 \pm 0,012$ a $2,533 \pm 0,058$ (rapporto Δ 1,829; 100%). L'aggiunta di L-Glu a 2.5 mM di CaCl_2 alle cellule neuronali ha generato un forte shift di colore dal blu scuro al verde arancione e rosso (fig. 17C-c).

La preincubazione dei neuroni per 5 minuti con soluzioni di 10, 1, e 0.1 $\mu\text{g/ml}$ di **67**, dopo l'aggiunta di L-Glu/ CaCl_2 , non ha indotto una significativa riduzione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fig. 19). Le immagini di fluorescenza hanno mostrato come nel campione di controllo si sia verificato un rapido cambiamento di colore dal blu scuro al rosso dopo l'aggiunta di L-Glu/ CaCl_2 a seguito della preincubazione dei neuroni con 0.1 $\mu\text{g/mL}$ di **67** (fig. 17D-c). Se si confrontano con il controllo, le concentrazioni di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nei neuroni trattati con 10 $\mu\text{g/mL}$ di **67** sono pari a 96.6%, con 1 $\mu\text{g/mL}$ a 90.5% e con 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 83.3 % (fig. 19).

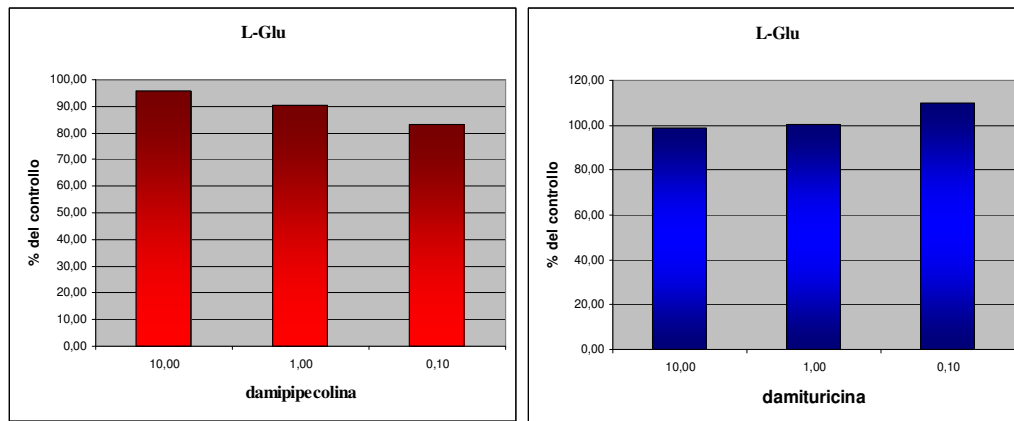


fig. 19: incubazione dei neuroni primari con 200 μM di L-Glu e 2.5 mM di CaCl_2 in presenza di 0.1, 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ di **67** e **68**.

La preincubazione dei neuroni per 5 minuti con una soluzione di 0,1, 1 e 10 µg/ml di **68** non ha indotto una significativa variazione della $[Ca^{2+}]_i$ dopo l'aggiunta di L-Glu/CaCl₂. In confronto con il controllo, le $[Ca^{2+}]_i$ nei neuroni trattati con 0,1µg/ml di **68** sono pari a 109.7%, con 1µg/ml al 100,2% e con 10µg/ml al 98.9% (Fig.19).

7.10 Effetti della damipeicolina, della damituricina e dell'acido *N*-metil-D-aspartico sui livelli di Ca^{2+} nei neuroni primari

La stimolazione delle cellule neuronali primarie con 200µM dell'acido *N*-metil-D-aspartico e 2,5 mM di CaCl₂ ha provocato un significativo aumento ($p < 0.001$) della $[Ca^{2+}]_i$; Δ rapporto 0.868 (valore di controllo 100%).

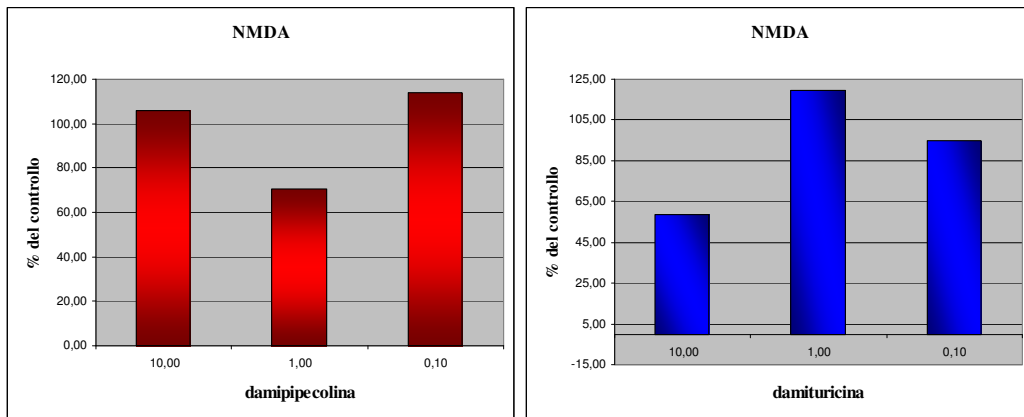


Fig. 20: incubazione dei neuroni primari con 200 µM di NMDA e 2.5 mM di CaCl₂ in presenza di 0.1, 1 e 10µg/ml di **67** e **68**.

La preincubazione (5 min) dei neuroni con 10 e 0.1 µg/mL di **67** non ha provocato nessuna diminuzione significativa di $[Ca^{2+}]_i$ in seguito all'aggiunta di NMDA/CaCl₂ (fig. 20). La variazione di $[Ca^{2+}]_i$ rispetto al controllo

è tra 105.9% (rapporto Δ 0.919; 10 $\mu\text{g/mL}$) e 114.1 % (rapporto Δ 0.990; 0.1 $\mu\text{g/mL}$). Solo in seguito all'aggiunta di 1 $\mu\text{g/mL}$ di **67** si è potuto osservare una significativa diminuzione della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (70.4%, rapporto Δ 0.611).

Il pretrattamento delle cellule neuronali con la damituricina (**68**) ha indotto solo un significativo decremento della concentrazione del calcio intracellulare alla concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$ dopo aggiunta di NMDA/ CaCl_2 (fig. 20).

Il valore di riduzione è stato pari al 58,8% ed il rapporto Δ 0,510. Nel range di concentrazione di 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ed 1 $\mu\text{g/ml}$ di **68** non si sono osservati cambiamenti della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dopo aggiunta di NMDA/ CaCl_2 . I valori osservati sono risultati rispettivamente del 95.0% e 119.52%.

7.11 Effetti della damipipecolina e della serotonina sui livelli di calcio nelle cellule di spugne

Contemporaneamente agli studi condotti su cellule di mammiferi, sono stati studiati gli effetti della 5-HT sui livelli di calcio intracellulare nei primorfi (che sono aggregati di cellule dissociate) ottenute dalla spugna marina *Suberites domuncula*. Come mostrato in figura 21, l'aggiunta di serotonina e di 10 mM di CaCl_2 alle cellule di *S. domuncula* non ha portato ad un risultato significativo nel cambiamento dei livelli di calcio (340/380 nm ratio) dopo un periodo di incubazione dai 5 ai 10 minuti. Nessun cambiamento nei livelli di calcio intracellulare è stato, inoltre, riscontrato dopo l'aggiunta di 0.1 $\mu\text{g/ml}$ o 1 $\mu\text{g/ml}$ di **67** nelle cellule.

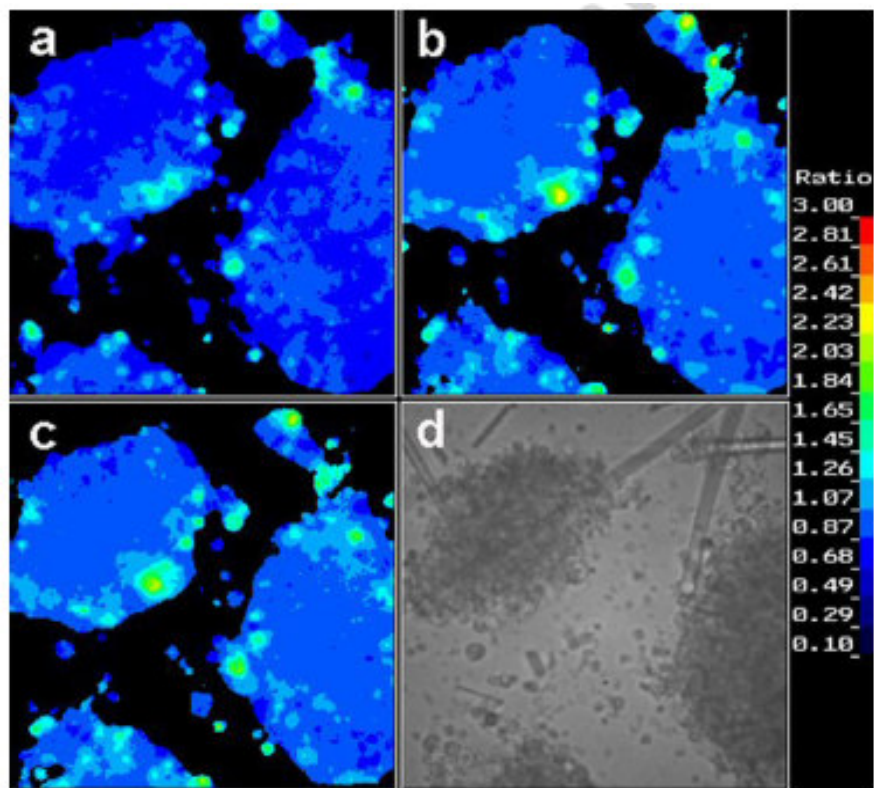


Fig. 21: valutazione dell'effetto della serotonina sui livelli di calcio intracellulare nelle cellule di *S. domuncula*, registrate al tempo zero (a), e dopo 5 (b) e 10 minuti (c). In (d) le cellule sono evidenziate con il metodo del contrasto differenziale di interferenza di Nomarski.

8. Parte sperimentale

8.1 Strumentazione

Gli spettri di massa ESI sono stati ottenuti con uno spettrometro di massa API 2000. Il potere rotatorio ottico specifico è stato misurato con un polarimetro PERKIN-ELMER 192. Gli spettri CD sono stati registrati su uno spettropolarimetro J-710 (Jasco, Tokyo, Japan) equipaggiato con un J-710 per Windows software (Jasco). Gli esperimenti NMR sono stati eseguiti su uno spettrometro Varian Unity INOVA 500. I chemical shift sono stati riferiti al segnale del solvente residuo (CD_3OD : $\delta_{\text{H}}= 3.31$, $\delta_{\text{C}}= 49.0$; CDCl_3 : $\delta_{\text{H}}= 7.26$; $\delta_{\text{C}}= 77.0$). La cromatografia a media pressione (MPLC) è stata eseguita con apparecchio Buchi 861 su colonna di SiO_2 impaccata (230 – 400 mesh). La separazione con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è stata ottenuta su un apparecchio Knauer 501 equipaggiato con un detector ad indice di rifrazione. Gli spettri UV (MeOH) sono stati registrati su uno strumento Shimadzu UV-1204.

8.2 Procedure di estrazione e di isolamento dei clavaminoli A-N

L'esemplare di *Clavelina phlegraea* è stato raccolto nella baia di Pozzuoli e conservato congelato fino all'utilizzo. L'organismo scongelato (42, 25g peso secco dopo estrazione) è stato omogeneizzato ed estratto a temperatura ambiente con metanolo (3 x 1L) e successivamente con cloroformio (3 x 1L).

Gli estratti riuniti sono stati concentrati sottovuoto ed il residuo acquoso ottenuto è stato ripartito tra H_2O ed etilacetato.

Il materiale solubile in etilacetato (2g), ottenuto dopo evaporazione del solvente, è stato cromatografato mediante cromatografia flash su colonna di silice usando un gradiente di eluizione N-esano→AcOEt→MeOH.

Tra le frazioni ottenute e monitorate mediante spettroscopia NMR, sono state identificate alcune di miscele di composti che presentavano valori di risonanza caratteristici degli amminoalcanoli; tali frazioni sono state purificate con successivi passaggi in HPLC al fine di ottenere i metaboliti in forma pura. In particolare, la frazione eluita con esano/acetato 3:7 è stata purificata su HPLC in fase diretta (LUNA 3 μ m, 150 x 4,60 mm), usando come miscela eluente Esano/acetato 1:1 (flusso 0,6 ml/min), ottenendo così il clavaminolo L (2,5 mg); la frazione eluita con Acetato 100% è stata purificata su colonna a fase inversa (LUNA 5 μ m, C18, 250 x 4,60 mm), utilizzando una miscela eluente MeOH / H₂O 7:3 (flusso 0.5 ml/min), ottenendo il clavaminolo I in forma pura (0,5 mg); la frazione eluita con AcOEt/MeOH 9:1 è stata frazionata in HPLC a fase inversa (LUNA 5 μ m, C18, 250 x 4,60 mm), con una miscela eluente MeOH / H₂O 75:25 (flusso 0.55 ml/min), che ha fornito i clavaminoli M and N in miscela; la miscela è stata poi successivamente separata su HPLC a fase inversa (LUNA 3 μ m, C18, 150 x 4,60 mm), impiegando come eluente la miscela MeOH / H₂O 55:45 che ha fornito i metaboliti in forma pura (CLA M 0,5 mg; CLA N 3 mg); la frazione ottenuta con AcOEt/MeOH 8:2 è stata purificata mediante HPLC a fase inversa HPLC (LUNA 5 μ m, C18, 250 x 4,60 mm), con una miscela MeOH / H₂O 7:3 come eluente (flusso 0.5 ml/min), che ha portato al clavaminolo G (12 mg) ed al clavaminolo H (2 mg); la frazione ottenuta con AcOEt/MeOH 7:3 e purificata su HPLC a fase inversa (Gemini, 5 μ m, 250 x 4.60 mm) con una miscela eluente

MeOH / H₂O 63:37 (flusso 1ml/min), ha fornito i clavaminoli C (15 mg), D (2 mg), E (3 mg) ed F (6 mg); infine, la frazione eluita con AcOEt/MeOH 6:4 è stata frazionata su HPLC a fase inversa (Gemini, 5 µm, 250 x 4.60 mm), con una miscela eluente MeOH / H₂O 55:45, i clavaminoli A (25 mg) e B(1.0 mg) puri.

Clavaminolo A (44): olio viscoso giallo, $[\alpha]_D^{25}$: -4,25°C (0,0094, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 202 [M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 202.2178 [M + H]^+$; la formula molecolare C₁₂H₂₈NO richiede $m/z = 202.2164$; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.99 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 0.90 (3H), 1.22 (3H).

Clavaminolo B (45): olio giallo viscoso, $[\alpha]_D^{25}$: -5° (0.001, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z=200 [M+H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 202.2027 [M + H]^+$ la formula molecolare C₁₂H₂₆NO richiede $m/z 200.2014$.

Clavaminolo C (46): polvere bianca, $[\alpha]_D^{25}$: +11.4° (0.0022, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z=244 [M+H]^+$; la formula molecolare C₁₄H₃₀NO₂ richiede $m/z 244.22765$. ¹H NMR in CD₃OD: δ _H 3.83 (m, 1H), δ 3.48 (m, 1H), δ 1.94 (s, 3H), δ 1.09 (d, 3H, J=6.9 Hz), δ 0.90 (t, 3H, J=6.9 Hz).

Clavaminolo D (47): polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: +8° (0.0013, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z=230 [M+H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z=230.2128 [M+H]^+$; la formula molecolare C₁₃H₂₇NO₂ richiede $m/z = 230.2120$.

Clavaminolo E (48): polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: +3° (0.0012, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z=242 [M+H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo):

$m/z = 242.2125$ $[M+H]^+$; la formula molecolare $C_{14}H_{28}NO_2$ richiede $m/z = 242.2120$.

Clavaminolo F (49): polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: -4° (0.004, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z=244$ $[M+H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z=244.2279$ $[M+H]^+$; la formula molecolare $C_{14}H_{30}NO_2$ richiede $m/z = 244.22765$.

Clavaminolo G (50) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: 0° (0.0017, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 230$ $[M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 230.2108$ $[M + H]^+$; la formula molecolare $C_{13}H_{28}NO_2$ richiede $m/z = 230.212$.

Clavaminolo H (51) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: $+3.19^\circ$ (0.0013, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 260$ $[M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 260.2230$ $[M + H]^+$; la formula molecolare $C_{14}H_{30}NO_3$ richiede $m/z = 260.2226$;

Clavaminolo I (52) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: $+10.45^\circ$ (0.0005, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 286$ $[M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 286.2376$ $[M + H]^+$; la formula molecolare $C_{16}H_{32}NO_3$ richiede $m/z = 286.2382$).

Clavaminolo L (53) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: $+12.17^\circ$ (0.0009, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 272$ $[M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 272.2231$ $[M + H]^+$; la formula molecolare $C_{15}H_{30}NO_3$ richiede $m/z = 272.2226$;

Clavaminolo M (54) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: -9.05 (0.0005, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 240 [M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 240.1975 [M + H]^+$; la formula molecolare $C_{14}H_{26}NO_2$ richiede $m/z = 240.19635$;

Clavaminolo N (55) polvere bianca; $[\alpha]_D^{25}$: -6.60° (0.0014, MeOH); ESI-MS (metodo ione positivo): $m/z = 258 [M + H]^+$; HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 258.2448 [M + H]^+$; la formula molecolare $C_{15}H_{32}NO_2$ richiede $m/z = 258.2433$.

8.2.1 Preparazione del derivato dibenzoilato 44b

Il cloruro di benzoile (15 μ L, 0.13 mmol) è stato addizionato ad una soluzione di **44** (3.3 mg, 0.016 mmol) e piridina (0,5 mL). La reazione è stata mantenuta a 50°C per 12 ore e successivamente la piridina è stata rimossa sottovuoto ed il residuo purificato in HPLC a fase diretta (LUNA SiO₂, 3 μ m , 150 x 4.60 mm) usando come eluente EtOAc/n-esano (25:75) al flusso di 0.4 ml/min, dando l'*eritro*-(2R, 3S)-N,O-dibenzoil-2-ammino-3-dodecanolo (1b, 2.3 mg). I valori di chemical shift osservati sono risultati essere identici a quelli precedentemente riportati in letteratura. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 8.09 (dd,2H), 7.77 (m, 2H), 7.61 (m, 1H), 7.41 – 7.50 (m, 5H), 6.96 (br d, 1H, NH), 5.22 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.45 (m, 2H), 1.30 (d, 3H), 0.87 (t, 3H). ¹³C NMR 500 MHz, CDCl₃ δ_C 166.5, 166.4, 133.2, 132.0, 1298.8, 128.4, 127.0, 77.6, 48.8, 34.3, 19.0, 14.7, 13.76. HRFABMS (metodo ione positivo): $m/z = 326.1755 [M + H]^+$; la formula molecolare $C_{20}H_{24}NO_3$ richiede $m/z = 326.1756$.

8.2.2 Preparazione del derivato diacetilato 44a

Ad una soluzione di clavaminolo A (0,9 mg; 0,0045 mmol) è stata aggiunta una soluzione di piridina (0,3mL) ed acido acetico; la reazione è stata mantenuta per 5 ore a temperatura ambiente. Successivamente la piridina è stata allontanata sottovuoto ed il residuo purificato in HPLC a fase inversa (LUNA, 3 μ m C18) usando come eluente una miscela MeOH/H₂O 8:2 ad un flusso di 0.6 mL/min, ottenendo il derivato diacetilato **44b** (0.8 mg, 0.003 mmol). Il clavaminolo C (1.4 mg, 0.0058 mmol) ed il clavaminolo F sono stati acetitati utilizzando la stessa procedura riportata per il clavaminolo A portando in entrambi i casi al derivato diacetilato **44b** (1.2 mg, 0.0042 mmol). (2R,3S)-2-acetamido-3-acetoxydodecane (44b). $[\alpha]_D^{25}$: +18.8° (0.0008, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 5.78 (br d, J = 7.4 Hz, 1H, NH), 4.83 (ddd, 1H, H-3), 4.16 (m, 1H, H-2), 2.09 (s, 3H, MeCOO-), 1.95 (s, 3H, Me-CONH-), 1.56 (m, 1H, H-4a), 1.50 (m, 1H, H-4b), 1.29 (m, 2H, H-5), 1.25–1.29 (m, 8H, H6-H9), 1.26 (m, 2H, H-10), 1.30 (m, 2H, H-11), 1.10 (d, J = 7.06 Hz, 3H, H-1), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H-12); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_C 171.34 (s, MeCOO-), 168.9 (s, MeCONH-), 77.2 (d, C-3), 47.7 (d, C-2), 32.05 (t, C-10), 31.51 (t, C-4), 29.4–29.6 (t, C-6, C-7, C-8, C-9), 25.8 (t, C-5), 23.74 (q, MeCONH-), 22.93 (t, C-11), 21.4 (q, MeCOO-), 14.8 (q, C-1), 14.1 (q, C-12). ESIMS (metodo ione positivo): m/z = 286 [M+H]⁺. HRFABMS (metodo ione positivo): m/z = 286.2391; la formula molecolare C₁₆H₃₂NO₃ richiede 286.2382.

8.2.3 Preparazione dell'idrolizzato HY-G (50a)

Una soluzione di 0.9 mg di **50** è stata trattata con una soluzione 1N di HCl in metanolo al 91% ad una temperatura di 80°C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto, fornendo 1 mg di 50a puro. (**50a**, ESIMS : m/z 188 [M+H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.70, 3.01, 2.74, 1.48, 1.30, 0.90.

8.2.4 Preparazione dell'idrolizzato HY-H (51a)

Una soluzione di 1.5 mg di **51** è stata trattata con una soluzione 1N di HCl in metanolo al 91% ad una temperatura di 80°C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto, fornendo 1 mg of pure (**51a**, ESIMS : m/z 218 [M+H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.83, 3.77, 3.70, 3.19, 1.49, 1.31, 0.91 .

8.2.5 Preparazione dell'idrolizzato HY-L (53a=44a)

Una soluzione di 1.5 mg di **53** è stata trattata con una soluzione 1N di HCl in metanolo al 91% ad una temperatura di 80°C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto, fornendo 1.7 mg del composto puro. (**44a**, ESIMS : m/z 202 [M+H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.70 (m), 3.26 (dq), 1.30 (m), 1.44 (m), 1.22 (d; J=6.8), 0.90 (t; J= 6.8).

8.2.6 Preparazione dell'idrolizzato HY-N (55a)

Una soluzione di 1.5 mg di **55** è stata trattata con una soluzione 1N di HCl in metanolo al 91% ad una temperatura di 80°C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto, fornendo 1 mg di **55a** puro (ESIMS : m/z

216 [M+H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.70 (m), 3.26 (dq), 1.53 (m), 1.45 (m), 1.33 (m), 1.22 (d; J=6.8), 0.88 (d; J= 6.8).

8.2.7 Preparazione del derivato tribenzoilato 51b

Il cloruro di benzoile (15µL, 0.13 mmol) è stato aggiunto ad una soluzione di **51a** (0.5 mg, 0.0031 mmol) e piridina (0.2 mL). La reazione è stata mantenuta a 50°C per 12 ore e successivamente la piridina è stata rimossa sottovuoto ed il residuo purificato in HPLC a fase diretta (LUNA SiO₂, 3µm , 150 x 4.60 mm) usando come eluente EtOAc/n-esano (25:75) al flusso di 0.4 ml/min, dando **51b** puro (0.5 mg, 0.0009 mmol).

***Erythro*-(2R,3S)-N,N,O-tribenzoyl-2-amino-1,3-dodecandiol (51b).**

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 8.03 (d, J=7.9 2H), 7.96 (d, J=7.9 2H), 7.78 (d, J=7.9 2H), 7.36-7.56 (m, 9H), 7.08 (d, 1H, NH), 5.38 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.63 (m, 2H), 1.88 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.23 (m, 8H), 1.30 (d, J=7, 2H), 0.86 (t, J=7.5, 3H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_C 167, 166.5, 165, 131.8, 130, 127.5, 127.3, 76.9, 48.8, 31.5, 32.8, 29.5, 13.8, 14.3. ESI-MS (positive ion mode): *m/z* = 530 [M + H]⁺; HRFABMS (positive ion mode): *m/z* = 530.6788 [M + H]⁺; the molecular formula C₃₃H₄₀NO₅ requires 530.6762.

8.2.8 Colture cellulari

Le tre linee cellulari AGS (carcinoma gastrico), T47D (carcinoma mammario) e A549 (carcinoma polmonare), sono state conservate in DMEM a cui è stato aggiunto il 10% di siero bovino fetale inattivato dal calore, 2mM di

glutamina, penicillina (50 U/mL) e streptomicina (50µg/mL). La linea della leucemia umana a cellule T Jurkat ,è stata fatta crescere in sospensione e mantenuta in RPMI 1640.

Le colture cellulari sono state conservate a 37°C al 5% di CO₂ in atmosfera umidificata.

8.2.9 Saggio dell'uptake della calceina.

La calceina-AM è un colorante fluorogenico, molto solubile nella porzione lipidica e che penetra rapidamente la membrana plasmatica. All'interno della cellula le esterasi endogene tagliano il legame estereo, producendo il colorante idrofilo e fluorescente che non può abbandonare la cellula attraverso la membrana plasmatica. Le cellule AGS, A549 e T47D sono state messe in coltura in mezzo completo su piastra a 96 pozzetti (104 cellule) ed incubate con concentrazioni crescenti dei composti per altre 24 ore. Dopo il trattamento, è stata aggiunta la calceina-AM (concentrazione finale 1 µM) e le cellule sono state incubate per 60 min. L'assorbimento è stato quindi stoppato trasferendo le piastre in ghiaccio e lavando le cellule due volte con HBSS pre-raffreddato a 4°C. La fluorescenza della calceina generata all'interno delle cellule è stata analizzata in un fluorimetro Tecan Pro con eccitazione a 485-nm e filtri di emissione a 535-nm.

8.2.10 Analisi del ciclo cellulare e delle rotture del filamento di DNA

La percentuale di cellule apoptotiche è stata misurata usando il metodo TUNEL. Le cellule Jurkat di controllo o trattate ($1 \cdot 10^6$) sono state fissate in paraformaldeide 4% in PBS per 24h a 4°C, lavate due volte in PBS e

permeabilizzate in una soluzione allo 0.1% di citrato di sodio contenente Triton X-100 0.1% per 2 min. le cellule fissate sono state lavate tre volte in PBS e risospese in un volume finale di 50 µl di buffer TUNEL (0.3 nmol FITC-dUTP, 3 nmol dATP, 50 nmol CoCl₂, 5 U TdT, 200 mM di cacodilato di potassio, 250 mg/mL di Siero Albumina Bovina (BSA) e 25 mM di Tris-HCl, pH 6.6). le cellule sono state incubate per 1h a 37°C e poi lavate due volte in PBS ed analizzate con flusso citometrico. Per determinare le rotture dei filamenti di DNA e la fase del ciclo cellulare dove esse avvengono, le cellule colorate con TUNEL sono state contrastate con PI (20 mg/mL) e trattate con RNasi (50 U/mL) in PBS per 1h a temperatura ambiente, prima dell'analisi citofluorimetrica. In questo metodo, il fissaggio in formaldeide previene l'estrazione di DNA a basso peso molecolare dalle cellule apoptotiche e di conseguenza la distribuzione del ciclo cellulare valuta sia le cellule apoptotiche che quelle non-apoptotiche. Dopo l'incubazione, le cellule sono state immediatamente analizzate mediante citometria di flusso usando un analizzatore EPIC XL (Beckman- Coulter, Hialeah, MI).

8.3 Procedure di estrazione e di isolamento della damipecolina e damituricina

L' esemplare della spugna *A. damicornis* è stato raccolto e congelato fino al suo utilizzo. La spugna scongelata (peso secco dopo estrazione 75, 2 g) è stata omogeneizzata e trattata a temperatura ambiente con metanolo (3 x 600 mL) e successivamente con cloroformio (3 x 600 mL). Gli estratti sono stati riuniti e concentrati sotto vuoto per dare una sospensione acquosa la quale è stata poi

ripartita tra acqua e butanolo. La parte butanolica, dopo evaporazione del solvente, è stata sottoposta a cromatografia liquida a media pressione (MPLC), su colonna a gel di silice a fase inversa (RP-18), mediante eluizione a gradiente ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{CHCl}_3$). Successivamente, la frazione eluita con MeOH/ H_2O 8:2, e costituita principalmente da alcaloidi polari, è stata separata in HPLC su colonna preparativa RP-18 (Kromasil, 10 μm 250x10mm) con MeOH/ H_2O 3:7 come eluente, ottenendo la damituricina in miscela con altri alcaloidi. La purificazione finale dei composti è stata effettuata in HPLC su colonna RP-18 (Luna, 5 μm , 250x436mm), usando MeOH/ H_2O 2:8 come eluente ed ottenendo 1.4 mg di damipiecolina e 2,3 mg di damituricina allo stato puro.

Damipiecolina (67): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5.4$ (H_2O , c 0.001). HR-FABMS (positive ion mode): $m/z = 317.013694$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; the molecular formula $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$ requires 317.013688. ^1H (500 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) data are reported in Table 1.

Damituricina (68): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.7$ (H_2O , c=0,0013). HRFABMS (ione in modalità positiva): $m/z=331,029354$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; formula molecolare $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$, 331,029338. ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD) sono riportati nella tabella 1.

8.3.1 Idrolisi della damipiecolina

Ad 1.3 mg di damipiecolina è stata aggiunta una soluzione di HCl 1N in metanolo al 91%, e la miscela ottenuta è stata mescolata a T 80° C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto e poi sottoposta a

purificazione con HPLC usando una colonna a fase inversa RP-18 Luna 5 μ (250 x 3 mm) e come eluente una miscela H₂O/MeOH 8:2; si è così ottenuto 1 mg di acido 4-bromopirrol-2-carbossilico e di acido (+)-*trans*-4-idrossipipepolico in forma pura, ($[\alpha]_D^{20} = + 23$, c = 0.001, H₂O; ESISMS : m/z 146 [M+H]⁺ ; ¹H e ¹³C-NMR sono riportati in tabella 1).

8.3.2 *Idrolisi della damituricina*

Una soluzione di 2 mg di damituricina è stata trattata con una soluzione di HCl 1N in metanolo al 91% a temperatura di 80°C per una notte. La miscela di reazione è stata evaporata sotto azoto e poi sottoposta a purificazione in HPLC usando una colonna a fase inversa RP-18 Luna 5 μ (250 x 3 mm) e come eluente una miscela MeOH/H₂O 2:8; si è così ottenuto l'acido 4-bromopirrol-2-carbossilico ed 1,3 mg di (+)-*cis*-*N,N'*-dimetil -4-idrossi-D-prolina in forma pura. (turicina, $[\alpha]_D^{20} = + 20.3$, c = 0.001, H₂ O; ESIMS: m/z 182[M+Na]⁺ ; ¹H e ¹³C-NMR sono riportati nella Tabella 2).

8.3.3 *Linee cellulari*

Le cellule neuronali primarie (cellule corticali di ratto) sono state preparate dal tessuto cerebrale dell'embrione di ratto Wistar di 17-18 giorni. Le cellule sono state mantenute in DME/HG (alta concentrazione di glucosio; 4,5 g/l glucosio) addizionato con 0,1% (w/v) di siero albumino bovino (BSA), 2 mM L-glutamina, 100 μ g/ml di transferina, 100 mU/l di insulina, 16 μ g/ml di putresceina, 6,3 ng/ml di progesterone e 5,2 ng/ml Na₂ SeO₃. Le cellule PC12 sono state coltivate nel mezzo di coltura di Dulbecco modificato (DMEM)/10% (v/v) di siero di feto di

vitello (FCS)/5% (v/v) di siero di cavallo. Le cellule HEK sono state coltivate in DMEM /10% (v/v) FCS /4,5 g/L di glucosio. Le cellule PC12 e HEK sono state aumentate due volte a settimana in un rapporto 1:10. Le cellule L5178y ed HeLa sono state mantenute nel mezzo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 con aggiunta di FCS al 10% (v/v). Le cellule sono state subcoltivate due volte a settimana in un rapporto 1:160 per le cellule L5178y e in un rapporto 1:10 per le cellule HeLa. Tutte le cellule sono state tenute in un' atmosfera composta per il 95% da aria e per il 5% da CO₂ ad una temperatura di 37°C.

8.3.4 Saggi con MTT

Per stimare i valori di IC₅₀, le cellule PC12, L5178y, HeLa sono state incubate per 72 ore in presenza di damituricina a diverse concentrazioni (0,1, 0,3, 1,3 e 10 µg/mL). Il volume finale è stato di 200 µL. Il composto in esame è stato solubilizzato in DMSO (soluzione disponibile 10 mg/mL) e conservato a -20°C. La vitalità cellulare è stata determinata usando un sistema colorimetrico MTT. Tale valutazione è stata eseguita in piastre da 96 pozzetti a 595 nm, usando un piatto di ELISA dopo una notte di incubazione a 37°C.

8.3.5 Misura del Ca²⁺ nei neuroni primari nelle cellule PC12, HeLa e Hek

Per la determinazione della concentrazione di calcio intracellulare, le cellule sono state coltivate su vetro borosilicato ricoperto da poly-L-lisina (Nunc). Per la misurazione della fluorescenza è stato usato un microscopio IX70 Olympus inverted-stage con obiettivo UApo40X/340. Le cellule sono state illuminate

alternativamente con una lunghezza d'onda di 340 e di 380 nm. E' stato usato un filtro addizionale 0,25 ND a 380 nm. Le emissioni fluorescenti a 510 nm sono state monitorate con una camera intensificata CCD, modello C2400-87 (Hamamatsu, Herrsching, Germany). Le immagini sono state poi digitalizzate con un sistema computerizzato (Argus 50, Hamamatsu). La concentrazione di calcio intracellulare è stata determinata misurando il rapporto di fluorescenza dell'indicatore di Ca^{2+} fura-2-AM a 340 e 380 nm. I neuroni sono stati caricati con $4\mu\text{M}$ di un estere del fura-2-acetossimetile (AM) e le cellule PC12, HeLa e HEK con $10\mu\text{M}$ di fura-2-AM in un mezzo DMEM/HG senza siero, con aggiunta di 1% (w/v) di BSA a 37°C per un' ora. Le cellule della spugna sono state trattate con $12\mu\text{M}$ di fura-2-AM in CMFSW contenente 1% (w/v) BSA alla temperatura di 17°C per due ore. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte con un mezzo addizionato con 10% di FCS (cellule di mammifero) e sono state incubate a 37°C per un' ora; le cellule della spugna sono state lavate con CMFSW e incubate a 17°C per un' ora. Utilizzando il metodo di Grynkiewicz è stata preparata una curva di calibrazione del calcio. Un valore del rapporto 340/380nm equivale a 228 nM di $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Per tutto il set di esperimenti è stata usata come mezzo d'incubazione la soluzione di Locke (154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 5,6 mM di glucosio e 10 mM di HEPES; pH 7,4) senza Ca^{2+} e Mg^{2+} . E' stata usata una soluzione di 5 mg/mL di dantrolina disciolta in acqua. Tutta la serie di diluizioni sono state effettuate in acqua. Nel primo set di esperimenti le cellule neuronali sono state stimulate con 0.1% (v/v) di acqua dopo 5 minuti e con $200\mu\text{M}$ di serotonina (5-HT), di acido N-metil-D-aspartico (NMDA) o acido L-glutammico (L-Glu) e 2,5 mM di CaCl_2 dopo 10 minuti dall'

inizio delle misurazioni. Nel secondo set di esperimenti i neuroni primari sono stati prima incubati con 10, 1, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di damituricina (5 minuti) e dopo 10 minuti sono stati aggiunti ai neuroni 5-HT/ CaCl_2 , NMDA/ CaCl_2 , o L-Glu/ CaCl_2 .

Nel terzo set di esperimenti le cellule PC12 e HEK sono state prima preincubate con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di damituricina (5minuti) e dopo 10 minuti sono stati aggiunti 5-HT/2,5mM di CaCl_2 . Nel caso delle cellule di spugna, la preincubazione delle cellule è stata ottenuta con 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ della damituricina (5minuti) e dopo 10 minuti è stato aggiunto alle cellule 5-HT/10 mM CaCl_2 . Come un controllo, le cellule sono state trattate con 0.1% (v/v) DMSO e 200 μM di 5-HT con 2,5 o 10 mM di CaCl_2 . In tutti gli esperimenti la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è stata misurata durante tutto il periodo di incubazione per un arco di 20 minuti.

8.4 Procedure di estrazione e di isolamento delle polyzorratine A-C

L'esemplare di *P. zorrinitensis* è stato raccolto nell'ottobre 2006 lungo le coste di Taranto e congelato fino all'utilizzo. Il tunicato scongelato (47.078 g peso secco dopo estrazione) è stato omogenizzato e trattato a temperatura ambiente con metanolo (3 x 1.5 L) e successivamente cloroformio (3 x 1.5 L). gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto ed il residuo acquoso ripartito tra acqua ed acetato di etile e tra acqua e butanolo. Il materiale solubile in acetato di etile (3.42 g), ottenuto dopo evaporazione del solvente, è stato cromatografato mediante cromatografia flash su colonna di silice usando un gradiente di eluizione N-esano \rightarrow AcOEt \rightarrow MeOH, mentre il materiale solubile in butanolo (7.77 g) è

stato cromatografato mediante cromatografia flash su colonna reverse usando un gradiente di eluizione H₂O/MeOH/CHCl₃.

La frazione eluita con Esano/AcOEt 1:1 è stata cromatografata su HPLC a fase diretta (LUNA silica 5µm, 250 x 4,60 mm), usando esano/AcOEt 7:3 come eluente (flusso 0.8 ml/min) fornendo le polyzorritine **A** (2 mg) e **B** (1.7 mg) pure; la frazione eluita in MPLC con H₂O/MeOH 9:1 è stata purificata prima su HPLC reverse preparativa (Kromasil 10µm, 250 x 10 mm; H₂O/MeOH 95:5, flow 2 ml/min) per dare un a miscela di polyzorritina C e metaboliti polari che è stata ulteriormente separata su HPLC reverse (Synergie 4µ POLAR-RP 80A, 250 x 4,60 mm), con H₂O/MeOH 98:2 come eluente (flow 1 ml/min), per dare il composto 6.. in forma pura (0,6 mg).

Polyzorritine A (64) composto giallo stabile; ESI-MS (ione modalità positiva): $m/z = 211 [M + H]^+$; HRFABMS (ione modalità positiva): $m/z = 211.19278 [M + H]^+$; la formula molecolare C₁₀H₁₀O₅ richiede 211.19245; dati ¹H NMR selezionati in CD₃OD: δ_H 7.54 (d, 1H, $J=2.30$), 7.49 (d, 1H, $J=8.35$), 6.91 (dd, $J=2.30; 8.35$), 3.94 (s), 3.92 (s); δ_C: 165.31, 185.4, 124.34, 111.99, 148.06, 154.93, 115.91, 127.32, 52.77, 56.15.

Polyzorritine B (65) composto giallo stabile; ESI-MS (ione modalità positiva): $m/z = 204 [M + H]^+$; HRFABMS (ione modalità positiva) $m/z = 204.2029 [M + H]^+$; la formula molecolare C₁₁H₉NO₃ richiede 204.20325; dati ¹H NMR selezionati in CDCl₃: δ_H 8.80 (m, 1H, NH), 8.51 (d, 1H, $J=3.22$), 8.46 (m), 7.45 (m), 7.35 (m), 3.96 (s).

Polyzorritine C (66) solido rosa; ESI-MS (ione modalità positiva): $m/z = 252 [M + H]^+$; HRFABMS (ione modalità positiva): $m/z = 252.2481 [M + H]^+$; la

formula molecolare $C_{11}H_{13}N_3O_4$ richiede 252.24795; dati 1H NMR selezionati in DMSO δ_H : 6.84, 6.73, 6.55, 3.74, 2.65; δ_C : 118.52, 115.46, 110.62, 55.97, 26.27.

9. DATI SPETTROSCOPICI

