



Università degli Studi di Palermo



Ministero dell'Università e della Ricerca
Scientifica e Tecnologica

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia

Dottorato in Scienze Farmaceutiche

Bando A. A. 2011-2013 (CICLO XXIV) SSD:CHIM/08

Sintesi e attività antiproliferativa di nuovi composti eterociclici

Tesi di dottorato di ricerca della

Dott. Gabriella Cancemi

Tutor

Chiar.mo Prof. Giuseppe Daidone

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Girolamo Cirrincione

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
(STEBICEF)

PRIMA PARTE: SINTESI E ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA DI NUOVI DERIVATI ISOSSAZOLOPIRIDAZINONICI

Stato dell'arte

Nell'ambito di uno screening per l'attività antitumorale condotto dall'NCI di Bethesda, USA, su un gruppo di composti disponibili presso il laboratorio nel quale ho svolto la mia tesi di dottorato, è emerso che il composto **1** (Fig. 1) è risultato essere alquanto attivo verso un panel di 60 linee cellulari tumorali umane, con valori di GI₅₀ quasi sempre inferiori a 1 µM, come riportato di seguito nel report (Tabella 1).

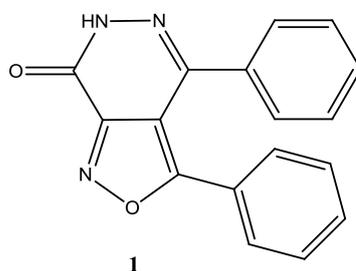


Figura 1. Formula di struttura del 3,4-difenil-isosazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1**.

**National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
In-Vitro Testing Results**

NSC : 749505 / 1		Experiment ID : 0903NS66					Test Type : 08					Units : Molar				
Report Date : November 18, 2013		Test Date : March 30, 2009					QNS :					MC :				
COMI : D27 (80471)		Stain Reagent : SRB Dual-Pass Related					SSPL : 0WKA									
Panel/Cell Line	Time Zero	Log10 Concentration										GI50	TGI	LC50		
		Ctrl	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0				-4.0	
Leukemia																
HL-60(TB)	0.592	1.703	1.618	1.591	0.522	0.453	0.379	92	90	-12	-23	-36	2.47E-7	7.65E-7	> 1.00E-4	
K-562	0.266	1.781	1.794	1.678	0.447	0.377	0.284	101	93	12	7	1	3.40E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
MOLT-4	0.667	2.063	2.083	2.009	1.026	1.050	0.560	101	98	26	27	-16	4.52E-7	4.26E-5	> 1.00E-4	
RPMI-8226	0.636	1.608	1.650	1.587	0.786	0.715	0.582	104	98	13	8	-9	3.89E-7	3.07E-5	> 1.00E-4	
SR	0.262	0.682	0.654	0.623	0.214	0.217	0.155	93	86	-19	-17	-41	2.20E-7	6.65E-7	> 1.00E-4	
Non-Small Cell Lung Cancer																
A549(ATCC)	0.291	1.401	1.300	1.282	0.701	0.820	0.450	91	89	37	48	14	5.62E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
EKVX	0.353	1.415	1.341	1.269	0.773	0.532	0.398	93	86	39	17	4	5.96E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
HOP-62	0.509	1.311	1.254	1.195	0.791	0.762	0.654	93	86	35	32	18	5.07E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
HOP-92	0.872	1.247	1.233	1.174	1.052	0.912	0.791	96	81	48	11	-9	8.64E-7	3.40E-5	> 1.00E-4	
NCI-H226	0.580	1.304	1.252	1.289	1.037	0.890	0.729	93	98	63	43	21	4.42E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
NCI-H23	0.323	1.043	0.975	0.990	0.677	0.603	0.368	91	93	49	39	6	9.56E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
NCI-H322M	0.508	1.615	1.589	1.489	1.158	0.980	0.682	98	89	59	43	16	3.49E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
NCI-H460	0.203	1.712	1.713	1.654	0.372	0.376	0.187	100	96	11	11	-8	3.49E-7	3.91E-5	> 1.00E-4	
NCI-H522	0.606	1.318	1.246	1.307	0.882	0.696	0.485	90	99	39	13	-20	6.48E-7	2.43E-5	> 1.00E-4	
Colon Cancer																
COLO 205	0.294	0.961	0.976	0.942	0.447	0.281	0.177	102	97	23	-5	-40	4.31E-7	6.81E-6	> 1.00E-4	
HCC-2998	1.219	2.847	2.826	2.790	2.208	2.272	1.193	99	96	61	65	-2	1.66E-5	9.28E-5	> 1.00E-4	
HCT-116	0.188	1.262	1.208	1.170	0.319	0.491	0.219	95	91	12	28	3	3.33E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
HCT-15	0.469	2.312	1.989	2.028	1.136	0.952	0.533	82	85	36	26	3	5.18E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
HT29	0.210	1.366	1.432	1.290	0.377	0.332	0.225	107	94	15	11	1	3.59E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
KM12	0.188	0.696	0.707	0.688	0.258	0.250	0.094	102	98	14	12	-50	3.73E-7	1.57E-5	> 1.00E-4	
SW-620	0.213	1.219	1.098	1.052	0.333	0.438	0.317	88	83	12	22	10	2.93E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
CNS Cancer																
SF-268	0.397	0.977	0.983	0.989	0.661	0.520	0.374	101	102	45	21	-8	8.30E-7	6.05E-5	> 1.00E-4	
SF-295	0.731	2.682	2.525	2.562	1.502	1.185	0.817	92	94	40	23	4	6.42E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SF-539	0.612	1.531	1.514	1.408	0.649	0.247	0.177	98	96	4	-60	-71	2.76E-7	1.15E-6	7.04E-6	
SNB-19	0.717	1.333	1.278	1.243	1.130	1.061	0.999	91	85	67	56	48	3.74E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SNB-75	0.557	1.224	1.115	1.080	0.756	0.479	0.542	84	78	30	-14	-3	3.85E-7	4.79E-6	> 1.00E-4	
U251	0.288	1.219	1.179	1.215	0.514	0.526	0.395	96	100	24	26	11	4.55E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
Melanoma																
LOX IMVI	0.274	1.436	1.376	1.326	0.697	0.697	0.472	95	90	36	36	17	5.61E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
MALME-3M	0.556	1.168	1.129	1.095	0.804	0.828	0.806	94	88	40	44	41	6.31E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
M14	0.243	0.845	0.798	0.778	0.326	0.429	0.264	92	89	14	31	3	3.29E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
MDA-MB-435	0.372	1.975	1.848	1.616	0.330	0.419	0.197	92	78	-11	3	-47	2.05E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SK-MEL-2	0.652	1.279	1.262	1.265	0.748	0.858	0.661	97	98	15	33	1	3.79E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SK-MEL-28	0.615	1.439	1.347	1.315	0.995	1.016	0.705	89	85	46	49	11	7.93E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SK-MEL-5	0.345	1.929	1.965	1.892	0.654	0.408	0.406	102	98	20	4	4	4.07E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
UACC-257	0.681	1.507	1.355	1.466	1.143	1.140	0.863	82	95	56	56	22	1.47E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
UACC-62	0.559	2.192	2.002	1.905	0.841	0.828	0.661	88	82	17	16	6	3.14E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
Ovarian Cancer																
IGROV1	0.511	1.188	1.231	1.180	0.826	0.774	0.691	106	99	46	39	27	8.56E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
OVCAR-3	0.362	0.785	0.804	0.767	0.346	0.174	0.126	104	96	-5	-52	-65	2.86E-7	9.01E-7	9.10E-6	
OVCAR-4	0.344	1.095	1.040	1.037	0.725	0.634	0.497	93	92	51	39	20	1.14E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
OVCAR-5	0.361	0.894	0.885	0.843	0.722	0.714	0.570	95	90	68	66	39	3.95E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
OVCAR-8	0.464	1.629	1.479	1.566	1.007	0.908	0.615	87	94	47	38	13	8.47E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
NCI/ADR-RES	0.511	1.541	1.534	1.513	0.578	0.847	0.517	99	97	7	33	1	3.32E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
SK-OV-3	0.475	0.875	0.870	0.883	0.649	0.486	0.465	99	102	43	3	-2	7.72E-7	3.56E-5	> 1.00E-4	
Renal Cancer																
786-O	0.584	1.849	1.784	1.804	1.156	1.136	0.860	95	96	45	44	22	8.06E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
A498	1.019	1.623	1.478	1.487	1.177	0.856	0.720	76	77	26	-16	-29	3.43E-7	4.17E-6	> 1.00E-4	
ACHN	0.292	1.146	1.115	1.093	0.662	0.627	0.486	96	94	43	39	23	7.37E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
CAKI-1	0.612	2.652	2.474	2.593	1.410	1.016	0.742	91	97	39	20	6	6.48E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
RXF 393	0.326	0.757	0.743	0.673	0.496	0.350	0.230	97	81	39	6	-30	5.54E-7	1.44E-5	> 1.00E-4	
SN12C	0.403	1.519	1.489	1.428	0.894	0.957	0.739	97	92	44	50	30	7.48E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
TK-10	0.608	1.548	1.423	1.516	1.078	0.885	0.692	87	97	50	29	9	9.99E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
UO-31	0.738	1.343	1.234	1.194	0.955	0.830	0.788	82	75	36	15	8	4.37E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
Prostate Cancer																
PC-3	0.258	0.923	0.971	0.890	0.627	0.382	0.286	107	95	55	19	4	1.41E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
DU-145	0.454	1.196	1.211	1.207	0.886	0.582	0.270	102	102	58	17	-41	1.56E-6	1.99E-5	> 1.00E-4	
Breast Cancer																
MCF7	0.305	1.540	1.461	1.406	0.491	0.570	0.410	94	89	15	21	8	3.37E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
MDA-MB-231(ATCC)	0.450	1.156	1.167	1.139	0.916	0.838	0.641	101	97	66	55	27	1.50E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
HS 578T	0.493	0.858	0.807	0.769	0.453	0.314	0.209	86	76	-8	-36	-58	2.02E-7	8.00E-7	4.36E-5	
BT-549	1.094	2.484	2.326	2.211	1.569	1.429	1.276	89	80	34	24	13	4.55E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	
T-47D	0.445	0.883	0.877	0.857	0.531	0.469	0.395	99	94	20	5	-11	3.90E-7	2.12E-5	> 1.00E-4	
MDA-MB-468	0.521	1.559	1.505	1.323	0.827	0.677	0.590	95	77	29	15	7	3.71E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4	

Tabella 1. Report del test a cinque dosi del composto 1.

Nella tabella 2 sono riportati in particolare i valori di GI_{50} rilevati per linee cellulari tumorali rappresentative di vari tipi di tumori umani quali K-562 (crisi blastica di leucemia mieloide cronica), NCI-H460 (cancro al polmone), SW-620 (cancro al colon), SF-539 (cancro al sistema nervoso centrale), SK-MEL-5 (melanoma), OVCAR-3 (cellule tumorali ovariche), A498 (cancro renale); PC-3 (cancro alla prostata) e MCF7 (cancro al seno).

Linea cellulare	IG_{50} (μM)
K-562	0.44
NCI-H460	0.42
SW-620	0.35
SF-620	0.45
SK-MEL-5	0.30
OVCAR-3	0.45
A498	0.24
PC-3	1.41
MCF7	0.40

Tabella 2. Valori di IG_{50} del composto **1** sulle linee cellulari tumorali K-562, NCI-H460, SW-620, SF-539, SK-MEL-5, OVCAR-3, A498 e MCF7.

La molecola in esame rispetta la cosiddetta “regola del cinque”, nota anche come “regola di Lipinski” dal nome dello scienziato che la formulò con il fine di identificare quali caratteristiche strutturali fossero importanti per avere un buon profilo farmacocinetico in termini di biodisponibilità orale di un principio attivo; l’assenza di tale proprietà è alla base dell’impossibilità per molti composti attivi di trovare impiego clinico [1]. I parametri in esame sono [2]:

- Peso molecolare inferiore o uguale a 500 g/mol (pari a 289.29 g/mol per il composto **1**);
- Un numero di gruppi donatori di legame a idrogeno inferiore o uguale a 5 (pari a 1 per il composto **1**);
- La somma del numero di gruppi accettori e donatori di legame a idrogeno inferiore o uguale a 10 (pari a 5 per il composto **1**);
- Un valore di logP calcolato (ovvero il logaritmo del coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua)

minore di 5 (pari a 2.878 ± 0.761 alla $T=25^{\circ}\text{C}$ per il composto **1** calcolato tramite ACD/Labs Software v11.02).

Tale regola è di natura empirica e non ha carattere quantitativo né può essere considerata infallibile, ma il rispetto delle caratteristiche da essa dettate costituisce un fattore incoraggiante per ulteriori studi sulla struttura in esame.

Infine, in letteratura sono riportati diversi lavori che hanno come oggetto molecole di tipo isossazolo-piridazinonico 3,4-disostituite, concernenti la loro sintesi [3] [4] [5], reattività [6] [7] e proprietà farmacologiche [4] [8].

Relativamente a queste ultime, è riportato uno studio che analizza le proprietà antinocicettive degli isossazolo-piridazinoni **2a-c** (Fig. 2).

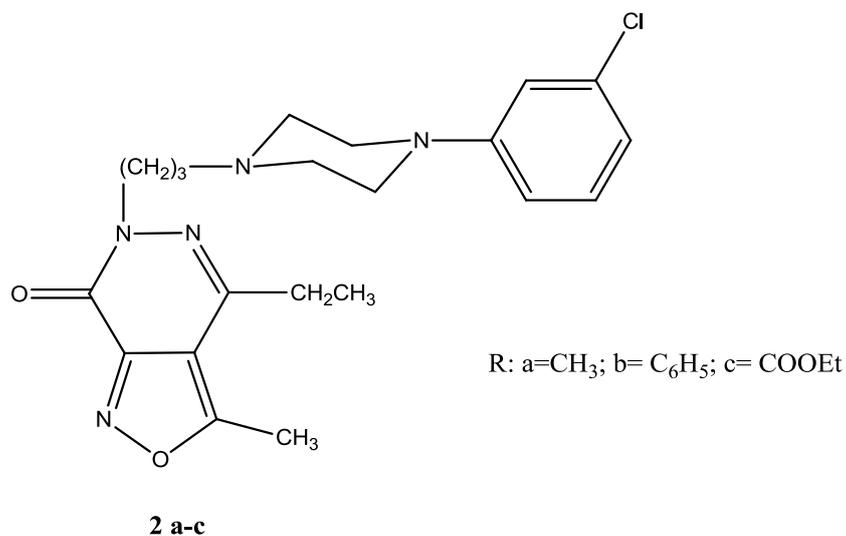


Figura 2. Formula di struttura degli isosazolo-piridazinoni **2a-c**.

Alle concentrazioni di 20 mg/Kg (**a**, **c**) e 10 mg/Kg (**b**), tali composti hanno prodotto il 71-75% dell'effetto analgesico della morfina (8 mg/Kg), usata come farmaco di riferimento, con un buon rapporto MNTD/MAD (minimal nontoxic dose/minimal analgesic dose) e assenza di alterazione del comportamento e della motilità spontanea nel topo. A livello molecolare, i composti **2a,b** esercitano un'azione antinocicettiva legata ad una parziale o totale attivazione del sistema monoaminergico, diversamente da quanto avviene per il **2c** che agisce secondo un meccanismo differente non chiarito [8].

Un altro lavoro riporta alcune prove farmacologiche sul 3,4,6-trimetilisossazolo-[3,4-d]-piridazin-7-one **3** (Fig. 3).

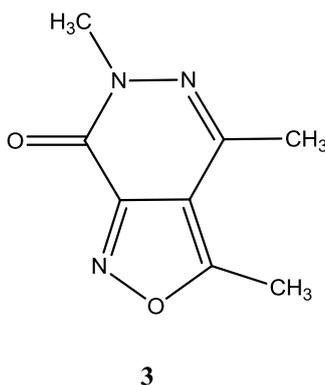


Figura 3. Formula di struttura del 3,4,6-trimetilisossazolo-[3,4-d]-piridazin-7-one **3**.

In particolare, per questo composto è stata valutata la tossicità acuta nel ratto per via orale, che ha evidenziato una elevata DL_{50} , pari a 1-1.5 g/Kg con sintomatologia tossica caratterizzata da crisi convulsive tonico-cloniche. E' inoltre stato provato che il composto **3** alle dosi di 1-2 mg/Kg non ha effetti rilevanti sulla pressione arteriosa e sul respiro nel coniglio e nel ratto. Alla stessa dose non provoca alterazioni rilevanti sul meccanogramma e sul flusso coronarico nel cuore di cavia. E' stato infine visto

che il composto non è dotato di attività antipiretica e non potenzia la narcosi indotta da tiopentale sodico nel topo, né ne altera la motilità spontanea [4].

Come si vede, tra i lavori ad oggi riportati in letteratura, non compaiono studi relativi all'attività antiproliferativa di questa classe di composti.

Obiettivi della tesi

Sulla base di questi dati, scopo di parte del mio lavoro di tesi è stato prendere il composto **1** a modello come “hit compound” per valutare l’effetto di varie modificazioni chimiche sull’attività biologica.

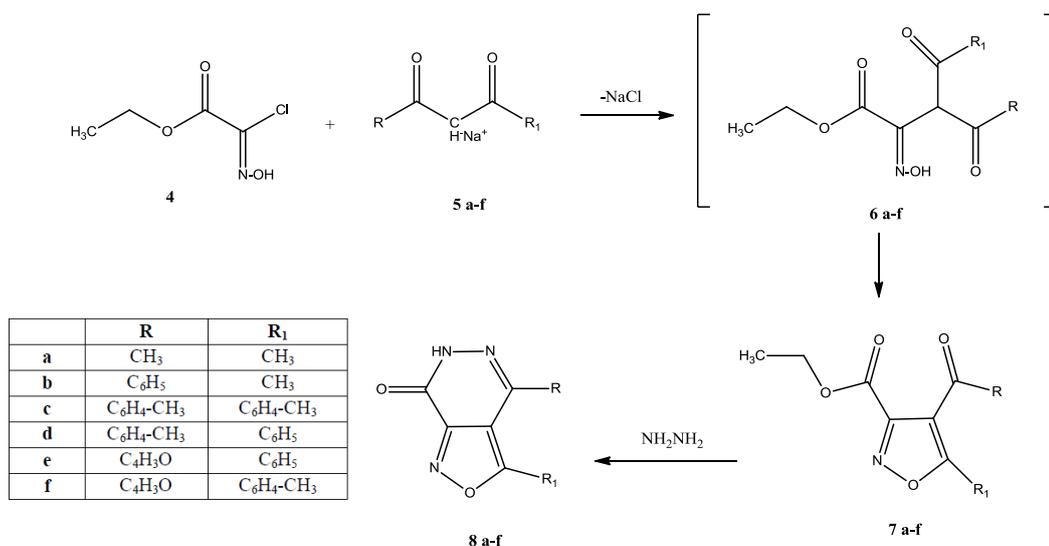
A tal fine è stata progettata la sintesi di analoghi del derivato **1** che si differenziano dal prodotto di riferimento per:

- la presenza di due metili al posto dei fenili in posizione 3 e 4 del nucleo isossazolo-piridazinonico;
- la presenza di sostituenti nei due fenili in posizione 4’;
- la presenza di un fenile ed un eterociclo in posizione 3 e 4 del nucleo isossazolo-piridazinonico;
- la presenza di un gruppo alchilico legato all’azoto 6 dell’isossazolo-piridazinone;
- l’introduzione di gruppi arilamminici in posizione 7;

- la presenza di un anello aromatico diverso da quello isossazolico condensato al nucleo piridazinonico.

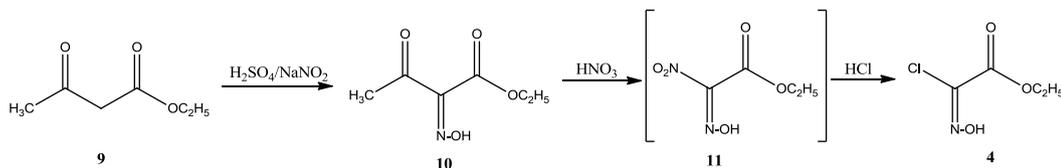
Parte chimica

Per la sintesi dei derivati isossazolopiridazinonici è stata seguita la sintesi riportata nello schema 1 [3].



Schema 1. Sintesi dei derivati isossazolo[3,4-*d*]piridazinonici **8a-f**.

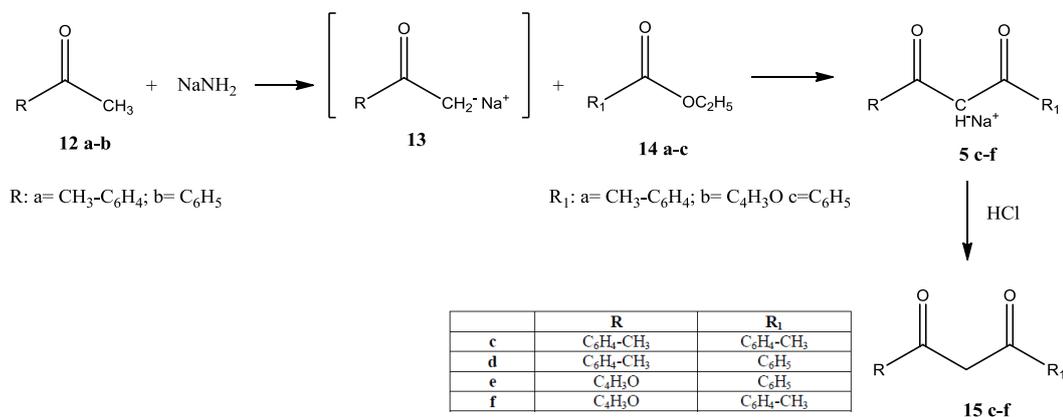
Il cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** è un prodotto noto ma non commerciale. E' stato dunque sintetizzato come riportato in letteratura secondo lo schema 2 [9].



Schema 2. Sintesi del cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4**.

Ad una miscela di acetoacetato d'etile **9** ed acido solforico viene aggiunta goccia a goccia sotto agitazione una soluzione di nitrito di sodio. Il composto **10** così ottenuto si fa reagire con acido nitrico e di seguito acido cloridrico per dare il desiderato composto **4**.

I sali sodici dei 1,3-dichetoni non commerciali di struttura **5c-f** sono stati sintetizzati secondo lo schema 3 [10] [11] [12].

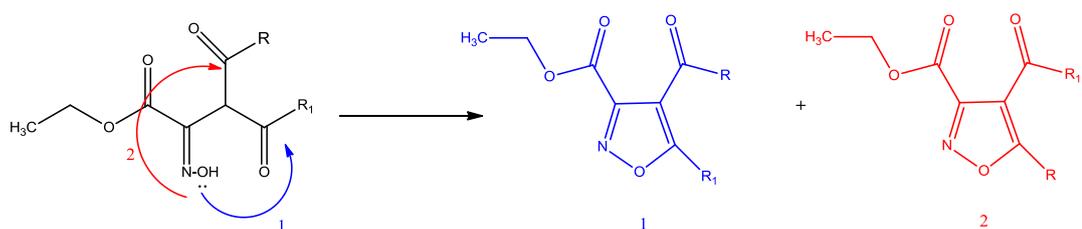


Schema 3. Sintesi dei sali sodici dei 1,3-dichetoni **5c-f**.

Una sospensione eterica di sodio amide energicamente agitata si tratta con l'appropriato acetofenone **12a-b** e quindi con il derivato estereo **14a-c**, ottenendo così il

relativo composto **5c-f**. Questo può essere trasformato in dichetone **15c-f** mediante acidificazione con acido cloridrico, oppure filtrato e messo a reagire in sospensione etanolica con il cloro(idrossimino) acetato d'etile **4** (schema 1) per dare i composti **7**.

Quando i sostituenti R ed R₁ sono diversi si formano 1,3-dichetoni asimmetrici. Questi, per condensazione con il cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** danno l'intermedio aperto **6** che ciclizzando può portare a due diversi isomeri strutturali con nucleo isossazolico in base al carbonile sul quale ricade l'attacco dall'idrossile del gruppo idrossiminico come mostrato nello schema 4.



Schema 4. Formazione di isomeri strutturali per derivati **7** ottenuti da 1,3-dichetoni asimmetrici.

In tali casi la struttura potrebbe essere attribuita

mediante studio cristallografico; pertanto la struttura attualmente assegnata è da considerarsi non definitiva.

Gli intermedi **7a-f** sono stati isolati tramite colonna cromatografica e trasformati nei composti finali **8a-f** per reazione con idrazina idrata all'80% a riflusso in etanolo (schema 1).

Sono stati ottenuti i composti **8** riportati in tabella 3.

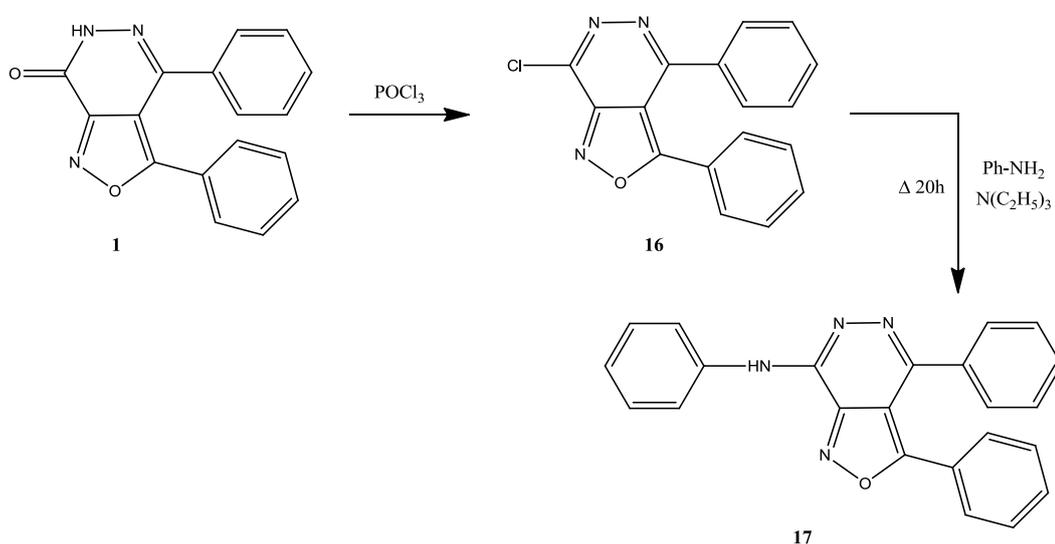
Composto 8	R	R1
a	CH ₃	CH ₃
b	C ₆ H ₅	CH ₃
c	C ₆ H ₅ -CH ₃	C ₆ H ₅ -CH ₃
d	C ₆ H ₅ -CH ₃	C ₆ H ₅
e	C ₄ H ₃ O	C ₆ H ₅
f	C ₄ H ₃ O	C ₆ H ₅ -CH ₃

Tabella 3. Derivati **8** ottenuti.

Il composto **1** risintetizzato secondo la stessa metodica è stato opportunamente fatto reagire per ottenere

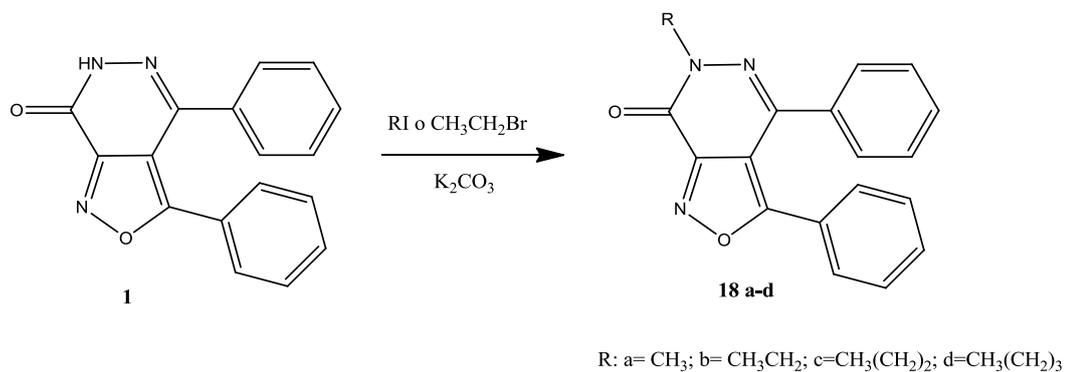
le trasformazioni desiderate.

Per reazione del composto **1** con ossicloruro di fosforo a refluxo per 17 ore si ottiene l'intermedio clorurato **16** che non è stato isolato; quest'ultimo è stato fatto reagire con anilina in presenza di trietilammina per 20 ore a refluxo in etanolo anidro dando il composto **17** (schema 5).



Schema 5. Sintesi del derivato **17**.

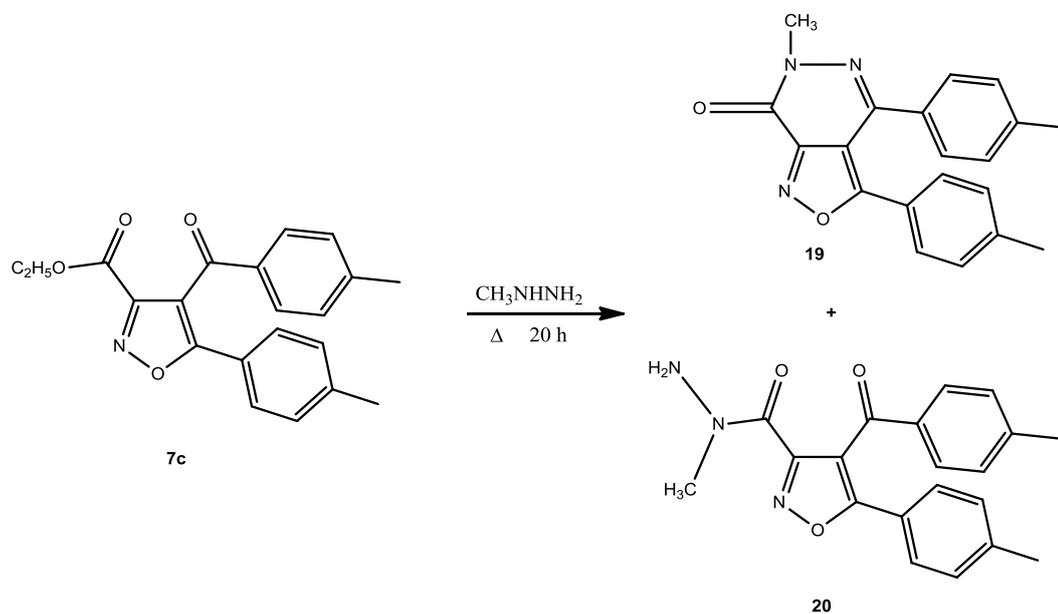
Al fine di verificare l'utilità del gruppo NH, donatore di legame idrogeno, per l'attività di **1**, si è effettuata la reazione con ioduro di metile, propile e butile, e bromuro di etile a temperatura ambiente per una notte ottenendo i composti N-alchilati **18a-d** (schema 6).



Schema 6. Sintesi dei derivati 18a-d.

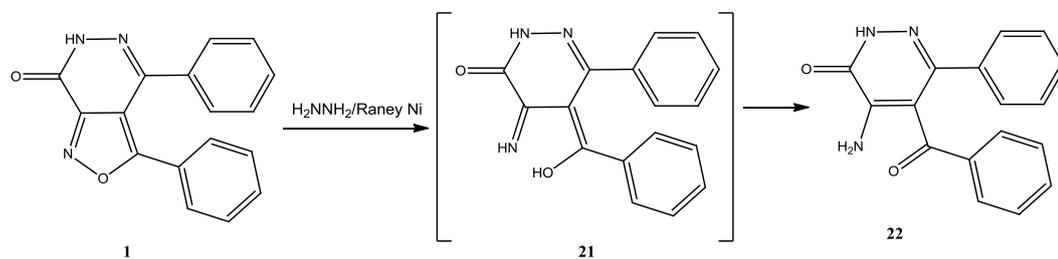
E' stata inoltre eseguita la sintesi del composto **19**, analogo metilato in posizione 6 dell'**8c**, secondo una'altra via sintetica di seguito riportata nello schema 7.

Tale sintesi ha portato all'ottenimento del derivato **19** con resa più bassa rispetto alla via sintetica precedentemente descritta, ma ha consentito di ottenere anche il derivato idrazidico metilato aperto **20**, anch'esso sottoposto a valutazione dell'attività antiproliferativa.



Schema 7. Sintesi dei derivati **19** e **20**.

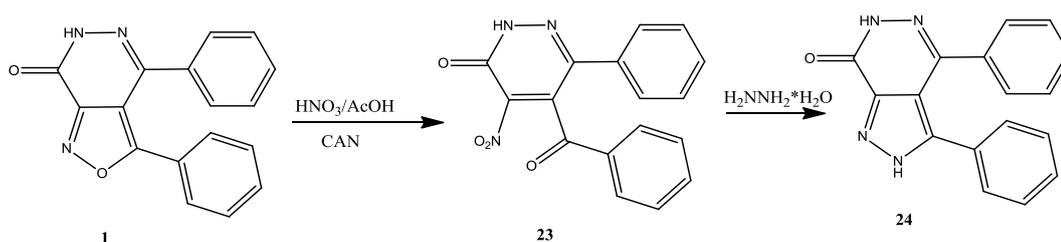
Al fine di valutare se la presenza del nucleo isossazolico sia importante per l'attività biologica è stata effettuata l'apertura di tale ciclo per riduzione del composto **1** come di seguito riportato (schema 8).



Schema 8. Sintesi del derivato **22**.

Inoltre, si è pensato di sintetizzare analoghi dell'**1** aventi al posto dell'isossazolo un anello aromatico diverso, come ad esempio, il nucleo pirazolico.

Il desiderato derivato pirazolopiridazinonico **24** è stato ottenuto come riportato nello schema 9, secondo una metodica descritta in letteratura per questo tipo di trasformazioni [13].



Schema 9. Sintesi del derivato **24**.

La reazione del cerio ammonio nitrato con il composto **1** in ambiente acido per acido acetico e acido nitrico ha prodotto l'apertura ossidativa dell'anello isossazolico dando il composto **23** isolato e caratterizzato tramite NMR. Questo

per reazione con idrazina idrata a temperatura ambiente ha dato il desiderato **24**.

Parte Biologica

Dei derivati **8** ottenuti, **8b** e **8c** sono stati saggiati presso l'NCI. Il composto **8b** alla concentrazione di 10 μ M ha mostrato un bassa percentuale di inibizione della crescita cellulare; ciò indicherebbe che l'assenza di un gruppo fenilico comporta un abbattimento dell'attività antiproliferativa degli isossazolopiridazinoni. A scopo di ulteriore conferma, è stato sintetizzato il derivato **8a**, nella cui molecola sono presenti due gruppi metilici nelle posizioni 3 e 4. L'attività antiproliferativa è stata valutata sulla linea cellulari tumorali K-562, NCI-H460 e HCT-116, dando alla concentrazione di 10 μ M una percentuale di inibizione della crescita rispettivamente pari a 27.4%, 5.8% e 0%. Questi valori sono di gran lunga peggiori rispetto al caso del composto di riferimento **1**.

Diversamente da **8b**, il derivato **8c** ha mostrato una buona attività antiproliferativa, paragonabile a quella di **1**, composto di riferimento, mostrando nel test a cinque dosi

su un panel di 60 linee cellulari tumorali un valore di MG-MID (*Mean graph midpoint*) pari a -5.92 contro -5.96 di **1**, e valori di GI₅₀ compresi nel range che va da 0.194 a 10.1 µM come di seguito riportato nel report (Tabella 4). Per 27 linee cellulari il valore di GI₅₀ è risultato inferiore a 1 µM.

**National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
In-Vitro Testing Results**

NSC : 765773 / 1		Experiment ID : 1207NS11										Test Type : 08		Units : Molar	
Report Date : September 19, 2012		Test Date : July 23, 2012										QNS :		MC :	
COMI : GD370 (118504)		Stain Reagent : SRB Dual-Pass Related										SSPL : OWKA			
Panel/Cell Line	Time	Log10 Concentration										GI50	TGI	LC50	
		Zero	Ctrl	Mean Optical Densities					Percent Growth						
		-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0				
Leukemia															
CCRF-CEM	0.516	2.141	2.194	2.170	1.703	0.742	0.842	103	102	73	14	20	2.45E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HL-60(TB)	0.673	2.301	2.253	2.209	0.740	0.714	0.727	97	94	4	3	3	3.10E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
K-562	0.353	2.233	2.117	2.199	0.646	0.576	0.602	94	98	16	12	13	3.83E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MOLT-4	0.809	2.000	1.957	2.011	1.380	1.120	1.239	97	101	55	37	45	1.95E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
RPMI-8226	0.999	2.495	2.468	2.401	1.573	1.098	1.118	98	94	38	7	8	6.16E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SR	0.194	0.735	0.720	0.700	0.335	0.303	0.316	97	94	26	20	23	4.41E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Non-Small Cell Lung Cancer															
A549/ATCC	0.413	1.796	1.778	1.816	0.997	0.870	0.420	99	101	42	33	.	7.40E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HOP-62	0.514	1.628	1.599	1.578	1.028	0.648	0.091	97	96	46	12	-82	8.35E-7	1.34E-5	4.54E-5
HOP-92	1.087	1.336	1.315	1.263	1.074	0.944	0.398	91	71	-1	-13	-63	1.94E-7	9.62E-7	5.41E-5
NCI-H226	0.746	2.138	2.103	2.101	1.867	1.360	0.751	97	97	81	44	.	6.88E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H23	1.173	3.135	3.008	2.935	2.642	1.931	1.329	94	90	75	39	8	4.86E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H322M	0.689	1.538	1.504	1.624	1.449	0.973	0.513	96	110	89	33	-26	5.06E-6	3.68E-5	> 1.00E-4
NCI-H460	0.271	2.635	2.609	2.633	1.285	0.594	0.215	99	100	43	14	-21	7.51E-7	2.50E-5	> 1.00E-4
NCI-H522	0.986	1.959	1.869	1.785	1.276	0.859	0.497	91	82	30	-13	-50	4.11E-7	4.98E-6	> 1.00E-4
Colon Cancer															
COLO 205	0.374	1.191	1.229	1.231	0.719	0.308	0.273	105	105	42	-18	-27	7.52E-7	5.05E-6	> 1.00E-4
HCC-2998	0.542	1.595	1.603	1.486	1.219	0.964	0.591	101	90	64	40	5	3.89E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HCT-116	0.192	1.768	1.763	1.814	0.696	0.665	0.184	100	103	32	30	-4	5.57E-7	7.55E-5	> 1.00E-4
HCT-15	0.249	1.975	1.949	1.990	0.911	0.745	0.553	98	101	38	29	18	6.51E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HT29	0.300	1.468	1.542	1.529	0.457	0.352	0.247	106	105	13	4	-18	4.00E-7	1.58E-5	> 1.00E-4
KM12	0.515	2.500	2.433	2.335	1.365	1.127	0.922	97	92	43	31	20	7.13E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SW-620	0.251	2.027	1.983	1.925	0.677	0.744	0.710	98	94	24	28	26	4.27E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
CNS Cancer															
SF-268	0.737	2.095	1.971	1.916	1.564	1.135	0.466	91	87	61	29	-37	2.21E-6	2.77E-5	> 1.00E-4
SF-539	0.797	2.707	2.744	2.687	1.644	0.578	0.224	102	99	44	-28	-72	7.87E-7	4.14E-6	3.21E-5
SNB-19	0.753	2.237	2.078	2.141	1.555	1.373	0.569	89	94	54	42	-24	2.13E-6	4.28E-5	> 1.00E-4
U251	0.678	2.348	2.321	2.338	1.432	1.116	0.210	98	99	45	26	-69	8.14E-7	1.88E-5	6.30E-5
Melanoma															
LOX IMVI	0.552	2.982	2.886	2.786	1.560	1.303	0.556	96	92	41	31	.	6.77E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MALME-3M	0.673	1.290	1.338	1.247	0.990	0.779	0.476	108	93	51	17	-29	1.09E-6	2.34E-5	> 1.00E-4
M14	0.425	1.737	1.683	1.696	0.714	0.780	0.710	96	97	22	27	22	4.22E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-435	0.396	1.698	1.663	1.595	0.313	0.356	0.298	97	92	-21	-10	-25	2.35E-7	6.51E-7	> 1.00E-4
SK-MEL-2	1.283	2.245	2.216	2.188	1.540	1.275	0.487	97	94	27	-1	-62	4.51E-7	9.49E-6	6.37E-5
SK-MEL-2B	0.449	1.100	1.116	1.062	0.873	0.777	0.519	103	94	65	50	11	1.02E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-MEL-5	0.729	3.050	3.017	2.992	1.875	0.951	0.925	99	97	49	10	8	9.70E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
UACC-257	0.996	1.846	1.778	1.878	1.563	1.378	1.259	92	104	67	45	31	5.87E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
UACC-62	0.857	2.885	2.801	2.801	1.715	1.352	0.788	96	96	42	24	-8	7.18E-7	5.65E-5	> 1.00E-4
Ovarian Cancer															
IGROV1	0.662	1.977	1.975	1.974	1.424	1.048	0.430	100	100	58	29	-35	1.90E-6	2.86E-5	> 1.00E-4
OVCAR-3	0.601	1.777	1.805	1.795	1.191	0.337	0.109	102	101	50	-44	-82	1.00E-6	3.41E-6	1.44E-5
OVCAR-4	0.644	1.105	1.068	1.094	0.999	0.877	0.461	92	98	77	50	-28	1.01E-5	4.36E-5	> 1.00E-4
OVCAR-5	0.406	1.212	1.177	1.150	1.038	0.743	0.471	96	92	78	42	8	5.99E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
OVCAR-8	0.564	2.056	2.022	2.043	1.412	1.020	0.347	98	99	57	31	-39	1.82E-6	2.77E-5	> 1.00E-4
NCI/ADR-RES	0.868	2.851	2.767	2.779	1.622	1.486	1.036	96	96	38	31	8	6.23E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-OV-3	0.651	1.439	1.438	1.416	1.121	0.695	0.099	100	97	60	6	-85	1.51E-6	1.15E-5	4.12E-5
Renal Cancer															
786-0	0.732	2.672	2.599	2.591	2.007	1.321	0.394	96	96	66	30	-46	2.78E-6	2.49E-5	> 1.00E-4
A498	1.207	1.862	1.920	1.907	1.581	1.063	0.753	109	107	57	-12	-38	1.27E-6	6.71E-6	> 1.00E-4
ACHN	0.340	1.646	1.726	1.602	1.215	0.771	0.323	106	97	67	33	-5	3.16E-6	7.33E-5	> 1.00E-4
CAKI-1	0.946	3.015	2.874	2.898	2.259	1.478	1.258	93	94	63	26	15	2.27E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
RXF 393	0.779	1.049	1.035	1.048	0.833	0.446	0.165	95	99	20	-43	-79	4.19E-7	2.08E-6	1.59E-5
SN12C	0.721	2.631	2.561	2.594	1.685	1.625	0.818	96	98	50	47	5	1.40E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
TK-10	0.770	1.392	1.324	1.333	1.223	0.841	0.286	89	91	73	11	-63	2.35E-6	1.42E-5	6.70E-5
UO-31	0.706	2.168	1.939	1.873	1.480	1.056	0.616	84	80	53	24	-13	1.26E-6	4.49E-5	> 1.00E-4
Prostate Cancer															
PC-3	0.651	2.031	2.001	1.960	1.603	0.776	0.691	98	95	69	9	3	2.07E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
DU-145	0.333	1.248	1.238	1.225	1.108	0.405	0.217	99	97	85	8	-35	2.82E-6	1.52E-5	> 1.00E-4
Breast Cancer															
MCF7	0.380	1.619	1.549	1.672	0.778	0.687	0.482	94	104	32	25	8	5.65E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-231/ATCC	0.625	1.449	1.453	1.440	1.066	0.949	0.462	100	99	54	39	-26	1.77E-6	3.98E-5	> 1.00E-4
HS 578T	0.954	2.140	2.143	2.054	1.617	1.019	0.747	100	93	56	5	-22	1.31E-6	1.59E-5	> 1.00E-4
BT-549	0.918	1.857	1.861	1.861	1.450	0.950	0.655	100	100	57	3	-29	1.33E-6	1.28E-5	> 1.00E-4
T-47D	0.681	1.756	1.679	1.686	1.378	0.961	0.686	93	94	65	26	.	2.41E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-468	0.679	1.474	1.393	1.385	0.842	0.616	0.588	90	89	21	-9	-13	3.70E-7	4.88E-6	> 1.00E-4

Tabella 4. Report del test a cinque dosi del composto **8c**.

Sulla linea cellulare non tumorale 16HBE (cellule di epitelio bronchiale umano), il composto **8c** ha dato un valore di IC₅₀ pari a 60.9 μM. E' stato calcolato l'indice di tossicità, inteso come il rapporto tra l'IC₅₀ su una data linea cellulare tumorale e l'IC₅₀ su una linea cellulare primaria, che è risultato essere pari a 0.004 (IC₅₀K562/IC₅₀16HBE).

Gli altri derivati aventi sostituenti diversi dal fenile in posizione 3 e/o 4 del nucleo isossazolopiridazinonico non ancora saggiati presso l'NCI sono stati testati preliminarmente su linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e MCF-7. I valori di inibizione della crescita alla concentrazione di 10 μM sono riportati nella tabella 5.

% inibizione della crescita (10µM)			
	K562	NCI-H460	MCF-7
8d	49.0	33.1	12.9
8e	58.3	34.6	23.2
8f	26.4	13.4	24

Tabella 5. Valori percentuali di inibizione della crescita cellulare per i composti **8d-f** alla concentrazione di 10 µM sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e MCF-7.

Complessivamente questi risultati indicherebbero una diminuzione dell'attività antiproliferativa, dato che potrà essere verificato meglio in seguito ad ulteriori saggi su un maggiore numero di linee cellulari. Il composto **8e** è risultato discretamente attivo sulla linea cellulare K562 con un valore di IC₅₀ pari a 6.2 µM.

Per l'**8e** è stata valutata la tossicità sulla linea cellulare non tumorale 16HBE sulla quale il composto, alla concentrazione di 10 µM, ha dato una percentuale di

inibizione della crescita cellulare pari al 9% e un basso indice di tossicità pari a 0.05 (IC₅₀K562/IC₅₀16HBE).

I prodotti di trasformazione del derivato **1**, nonché alcuni intermedi di sintesi, utili a comprendere l'importanza della presenza del ciclo a sei, ovvero il derivato **7** avente come R ed R₁ il gruppo fenilico (**7g**) (Fig. 4), l'idrazide **25** (Fig. 4) (isolata tramite cromatografia dalla miscela di reazione di sintesi dell'**1**), il **7c** e il **20** (schema 7) sono stati saggiati sempre in via preliminare sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e MCF-7. In tabella 6 sono riportati i risultati ottenuti.

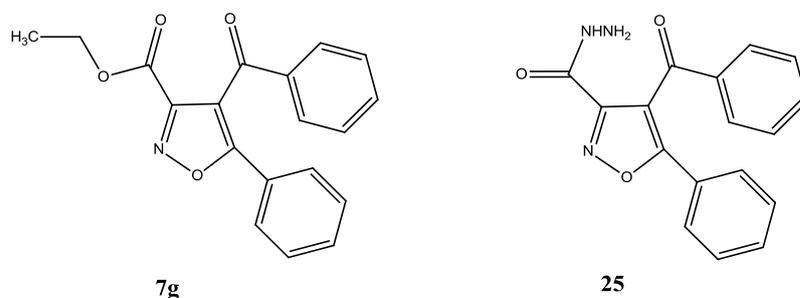


Fig. 4. Formule di struttura dei derivati **7g** e **25**.

% inibizione della crescita (10μM)			
	K562	NCI-H460	MCF-7
7c	32.1	2.1	0
7g	44	33.3	0
25	49.0	9	19.7
20	26.4	17.1	33.3
22	30.9	10.6	9.6
24	54.8	22.7	25.4
17	67.9	12.9	0
18a	50.5	15.7	34.2
18b	49.8	19.6	21
18c	48.2	10.9	0
18d	9.5	20.0	0
19	64.1	35.9	9.1

Tabella 6. Valori percentuali di inibizione della crescita cellulare per i composti **7c,g, 25, 20, 22, 24, 17, 18a-d, 19** alla concentrazione di 10 μ M sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e MCF-7.

I dati riportati evidenzerebbero un peggioramento dell'attività antiproliferativa per i composti in cui non si ha

il ciclo a 6 (**7c,g, 25, 20**) o manca il nucleo a cinque (**22**), attività diversificate per le linee cellulari saggiate del derivato pirazolopiridazinonico **24** e del derivato che porta in 7 il raggruppamento fenilamminico **17**, e mediamente una lieve diminuzione, anche se con mantenimento di una buona attività, per i composti alchilati in posizione 6 **18a-c** e **19**, attività che subisce una consistente diminuzione quando la catena alchilica raggiunge le quattro unità carboniose nel **18d**.

Per i composti che hanno mostrato una discreta attività antiproliferativa sulla linea cellulare K562, ossia **17, 18a, 19** e **24** è stato misurato il valore di IC_{50} su tale linea cellulare, sulla linea cellulare primaria 16HBE e calcolato l'indice di tossicità. I valori ottenuti sono riportati in tabella 7.

Composto	IC ₅₀ (μM)		Indice di tossicità
	K562	16HBE	IC ₅₀ K562/IC ₅₀ 16HBE
17	5.8	149.6	0.04
18a	7.7	220.0	0.03
19	7.8	103.3	0.07
24	9.4	97.8	0.09

Tabella 7. Valori di IC₅₀ sulle linee cellulari K562 e 16HBE e indice di tossicità per i composti **17**, **18a**, **19** e **24**.

I bassi valori di Indice di tossicità indicano che tali composti hanno una buona selettività verso le cellule tumorali rispetto alle cellule normali. E' stato inoltre valutato l'andamento dell'attività del composto **1**, di alcuni composti **8** e di alcuni prodotti di trasformazione del composto **1** in funzione del tempo sulle linee cellulari K562 e NCI-H460. Come si evince dal grafico di seguito riportato, sulle cellule K562 a 10 μM si registra un aumento dell'attività inibente tempo dipendente per i composti **1**, **17**, **19**, e **24** da 4 a 72 ore; per i composti **8c** e **18a** si registra

una buona attività inibente costante nelle prime 24 ore che tende ad aumentare tra le 24 e le 48 ore, per poi mantenersi costante nelle ore successive; per il composto **8e** non si registrano invece particolari variazioni di attività correlate al tempo (Fig. 5).

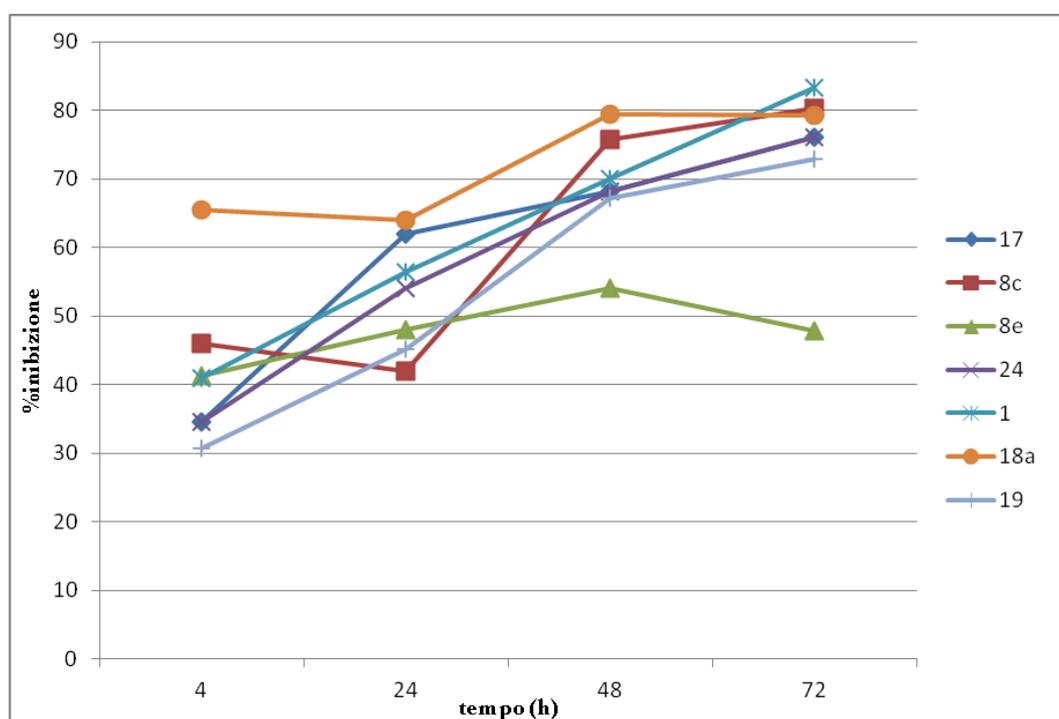


Figura 5. Andamento della percentuale di inibizione di crescita cellulare nel tempo sulla linea cellulare K562 per i composti **1**, **8c,e**, **17**, **18a**, **19** e **24**.

Sulla linea cellulare NCI-H460 alla concentrazione di 100 μM si registra un aumento dell'attività antiproliferativa tra

le 24 e le 72 ore per i composti **8c**, **8e**, **19**, **24** e **25** particolarmente evidente per l'**8e** come riportato di seguito nel grafico (Fig. 6)

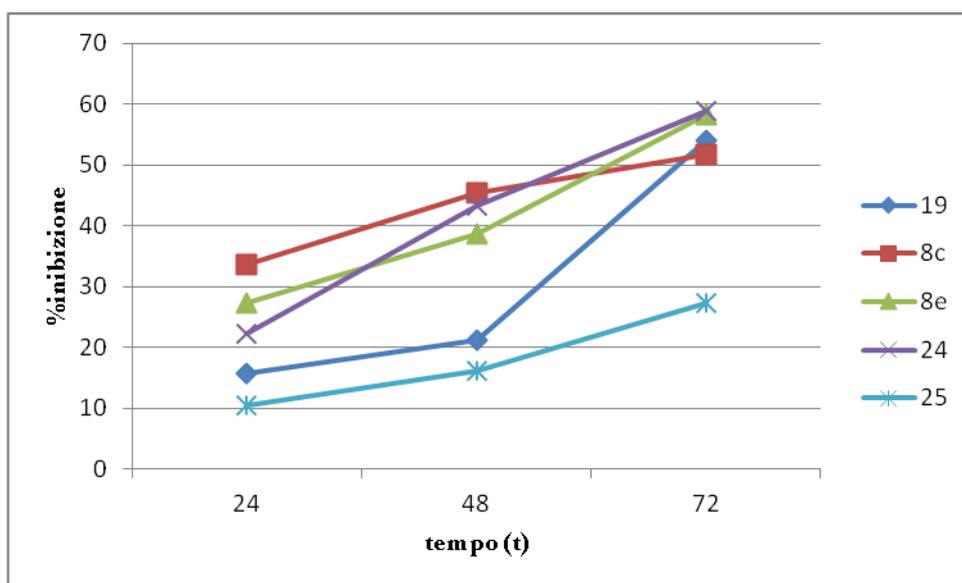


Figura 6. Andamento della percentuale di inibizione di crescita cellulare nel tempo sulla linea cellulare NCI-H460 per i composti **1**, **8c,e**, **19**, **24** e **25**.

Il meccanismo d'azione con cui i derivati isossazolopiridazinonici agiscono a livello cellulare è stato studiato analizzando l'influenza dell'esposizione ai composti **8c** e **1** sul ciclo cellulare e su diversi target cellulari.

L'effetto sul ciclo cellulare è stato valutato su cellule MDA-MB231, una linea di carcinoma mammario “triplo negativo”, così definito in quanto privo di recettori per estrogeni, progesterone e HER-2 (recettore 2 per il fattore di crescita epidermico). Tali forme di carcinoma mammario sono insensibili alla terapia ormonale e rappresentano delle forme tumorali particolarmente aggressive e metastatiche. Le cellule MDA-MB231 sono inoltre caratterizzate dall'over-espressione del recettore per l'EGF (fattore di crescita epidermico) e dalla presenza di una forma mutata di p53, che mostra una sostituzione amminoacidica (G/A) nel codone 280 del gene corrispondente.

Tale linea cellulare rientra tra quelle su cui sono stati testati i composti **8c** e **1** dall'NCI, e risultata sensibile alla loro azione citotossica.

Il trattamento delle cellule MDA-MB231 con **8c** determina una riduzione della vitalità cellulare dose-dipendente, riduzione dapprima valutata mediante il saggio colorimetrico che impiega l'MTT, composto che misura

l'attività delle deidrogenasi mitocondriali.

Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con differenti concentrazioni (1-25 μM) di **8c** per tempi diversi (24 e 48 h). Come si evince dai dati riportati in tabella 8, tale trattamento determina un decremento della vitalità delle cellule dose e tempo dipendente. In particolare la vitalità cellulare si riduce di circa il 50% dopo 48 h di trattamento con **8c** 5 μM .

	Vitalità cellulare (% del controllo)	Vitalità cellulare (% del controllo)
	24 h	48 h
MDA-MB231		
Controllo	100	100
8c 1 μ M	90	80
8c 2 μ M	70	60
8c 5 μ M	62	51
8c 10 μ M	50	45
8c 15 μ M	45	38
8c 25 μ M	35	25

Tabella. 8. Effetto dell'**8c** sulla vitalità delle cellule MDA-MB231. Il valore di vitalità è espresso come per cento del controllo non trattato.

Per chiarire se la riduzione della vitalità cellulare fosse dovuta ad induzione di necrosi cellulare, le cellule MDA-MB231 sono state trattate per 48 h con **8c** 15 μ M e alla fine del trattamento sono state colorate con una soluzione contenente ioduro di propidio: esso penetra solo all'interno

di cellule con membrana danneggiata (necrotiche) legandosi al DNA e dando una colorazione rossa visibile al microscopio a fluorescenza. I risultati, riportati in Fig. 7, indicano che la riduzione della vitalità cellulare, evidente all'osservazione al microscopio ottico, non si associa a positività allo ioduro di propidio. Solo pochissime cellule, infatti, sono colorate di rosso. I risultati suggeriscono, pertanto, che la riduzione della vitalità cellulare indotta dall'**8c** nelle cellule MDA-MB231 non è dovuta ad induzione di necrosi cellulare.

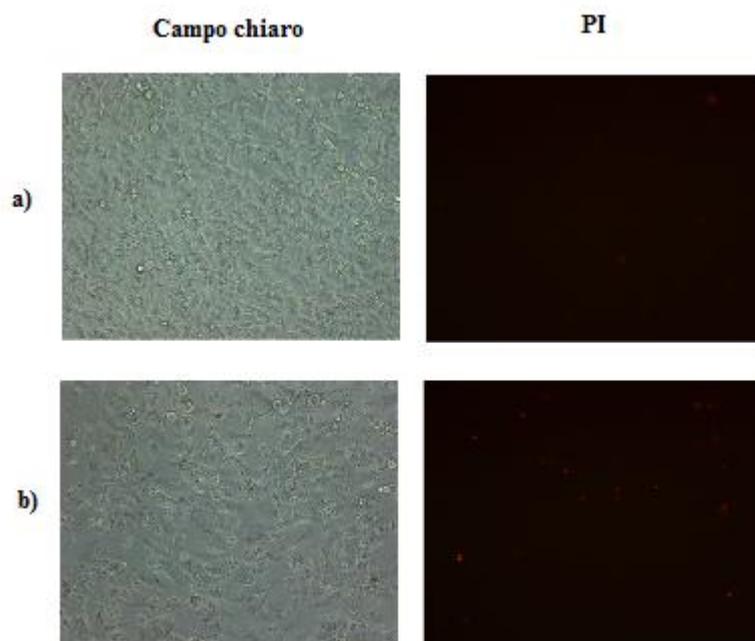


Figura 7. Immagine al microscopio ottico e a fluorescenza delle cellule MDA-MB231 senza e con Ioduro di Propidio (PI). a) Controllo. b) Dopo 48h di trattamento con **8c** 15 μM .

L'analisi del ciclo cellulare è stata condotta a tempi diversi (24 e 48 ore) trattando le cellule con **8c** alla concentrazione di 15 μM (Fig. 8).

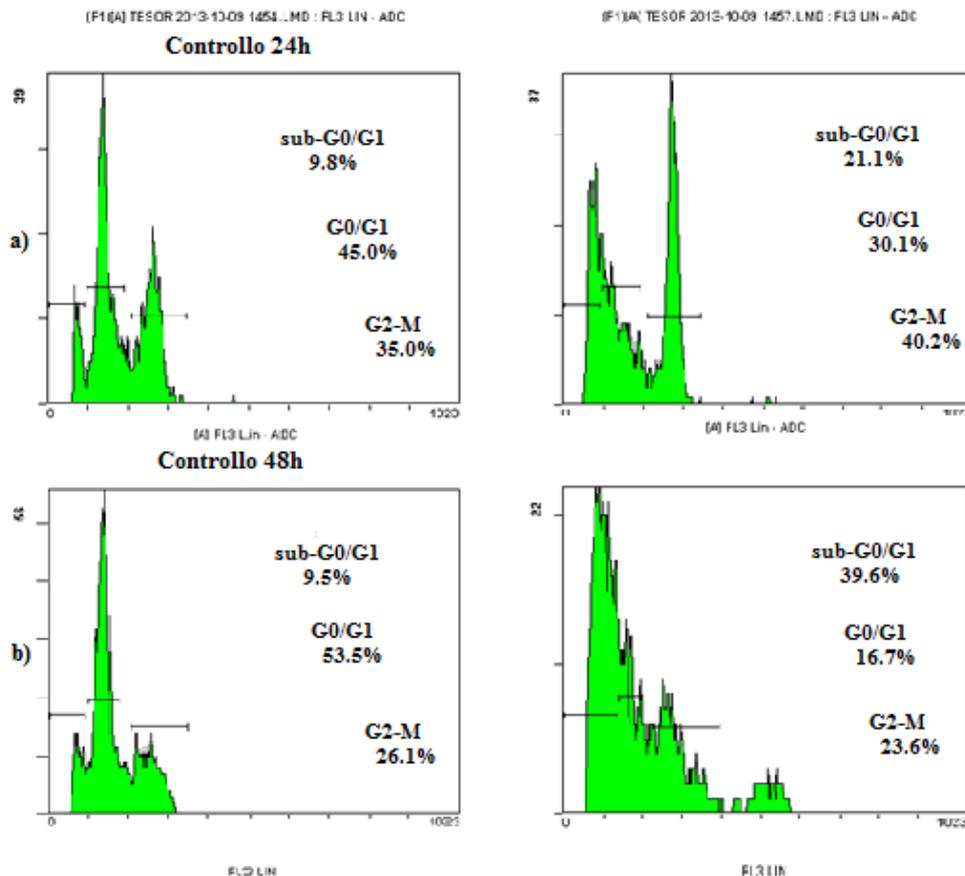


Figura 8. Effetto sul ciclo cellulare del composto **8c** sulle cellule MDA-MB231 a) Controllo e cellule esposte a **8c** alla concentrazione di 15 μM dopo 24 ore. b) Controllo e cellule esposte a **8c** alla concentrazione di 15 μM dopo 48 ore.

Il trattamento delle cellule MDA-MB231 con **8c** induce un aumento della popolazione cellulare in fase S (frazione compresa tra le fasi G1 e G2). L'effetto è già evidente a 24 h e si mantiene a 48 h. I risultati indicano, inoltre, che il composto **8c** incrementa la frazione di cellule in fase pre-

Go/G1, indice di cellule con DNA frammentato in seguito a morte cellulare. L'effetto, già evidente a 24 h, risulta più marcato dopo 48 h di trattamento, quando la porzione delle cellule confinate in fase pre-G0/G1 passa dal 9.5% nelle cellule controllo al 39.6% nelle cellule trattate con **8c** 15 μ M. L'effetto sul ciclo cellulare dell'**8c** è stato paragonato a quello indotto da **1** (Fig. 9).

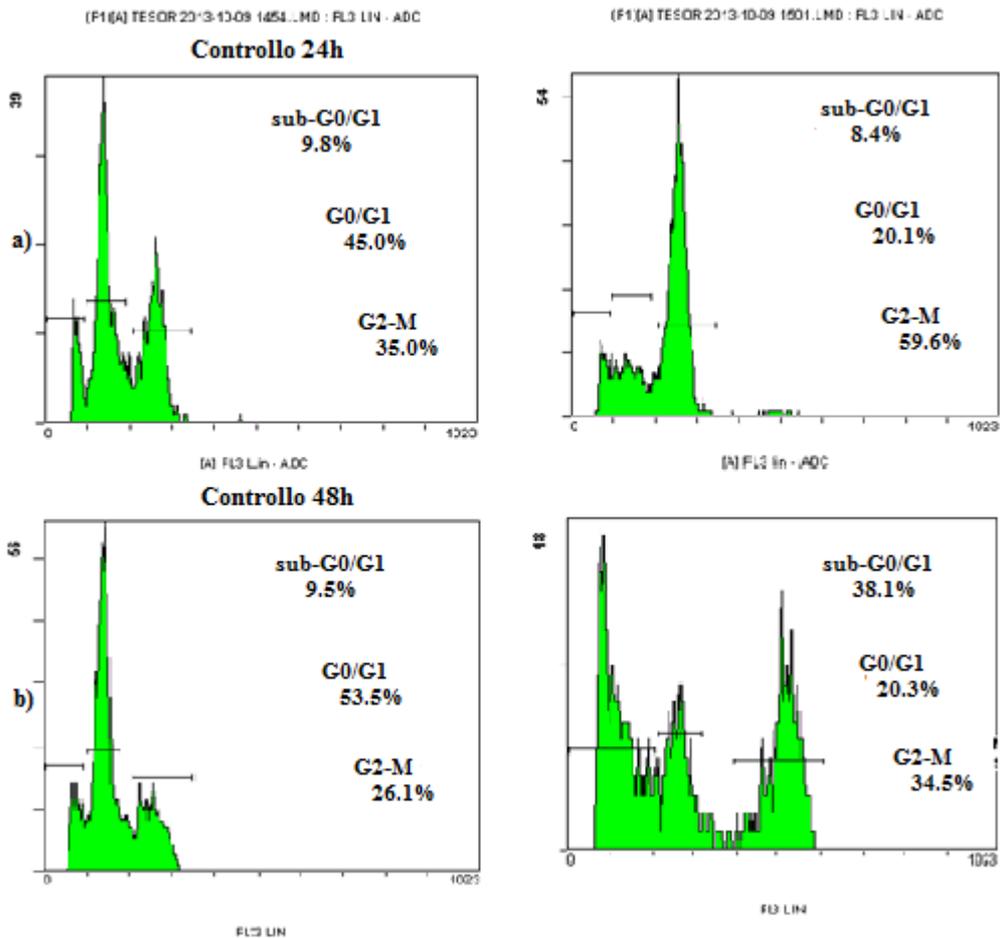


Figura 9. Effetto sul ciclo cellulare del composto **1** sulle cellule MDA-MB231 a) Controllo e cellule esposte a **1** alla concentrazione di 15 μM dopo 24 ore. b) Controllo e cellule esposte a **1** alla concentrazione di 15 μM dopo 48 ore.

Il trattamento delle cellule con **1** determina dopo 24 h un incremento della frazione di cellule in fase G2/M. Prolungando il trattamento a 48 h gli effetti indotti dal

composto **1** sono simili a quelli osservati trattando le cellule con **8c**. Si osserva, infatti, un aumento sia della fase S che della fase pre-Go/G1. Questi ultimi risultati indicano che gli effetti del composto **1** anche se simili sono tuttavia meno marcati e più ritardati di quelli osservati con **8c**.

Concludendo, nel complesso l'analisi del ciclo cellulare ha evidenziato che sia **8c** che **1** inducono morte delle cellule MDA-MB231 che si accompagna ad un aumento della frazione di cellule in fase S, evento che potrebbe essere associato a cellule con DNA danneggiato.

L'analisi si è pertanto rivolta a proteine preposte al controllo dell'integrità del genoma.

Tra queste si è scelto di esaminare l'effetto dell'**8c** e dell'**1** su ATM, una chinasi che interviene in un fine meccanismo di controllo noto come "checkpoint del ciclo cellulare", deputato al mantenimento dell'integrità genomica. Gli eventi biochimici implicati in questo processo hanno luogo sostanzialmente tra le fasi G1/S e tra le fasi G2/M del ciclo cellulare e, oltre ad ATM, coinvolgono complessi

macchinari molecolari e molteplici cascate di attivazione e disattivazione che cooperano per un unico scopo: la riparazione di eventuali danni al DNA in condizioni di stress cellulare e, qualora questo non fosse possibile, l'induzione di morte cellulare per apoptosi.

ATM è una delle più importanti proteine sensore specifica per la rottura del doppio filamento del DNA [14]. E' una chinasi del peso molecolare di 370 kDa normalmente associata al DNA. Nelle cellule con DNA integro si presenta in forma dimerica inattiva in cui il dominio catalitico di ogni monomero entra in contatto con un sito di fosforilazione dell'altro monomero, rappresentato da una serina in posizione 1981. La rottura del DNA comporta un'alterazione della cromatina che determina l'autofosforilazione intermolecolare del dimerico di ATM. Il dominio catalitico di ogni monomero fosforila, cioè, la serina del corrispettivo determinando la scissione del dimerico e quindi attivandolo. Il monomero di ATM attivo agisce poi fosforilando altre proteine substrato, come

l'istone H2AX, coinvolte nel processo di risposta al danno del doppio filamento. L'individuazione di ATM fosforilata rappresenta pertanto un'indicazione di danno al DNA.

Come si evince dall'analisi di western blotting riportata in Fig. 10, quando le cellule MDA-MB231 sono state trattate con **8c** alla concentrazione di 15 μ M si è osservato un incremento della forma fosforilata di ATM. L'effetto è già evidente dopo 24 h di trattamento e si mantiene a 48 h. Si può osservare che, anche se in misura inferiore, il composto **1** ha lo stesso effetto.

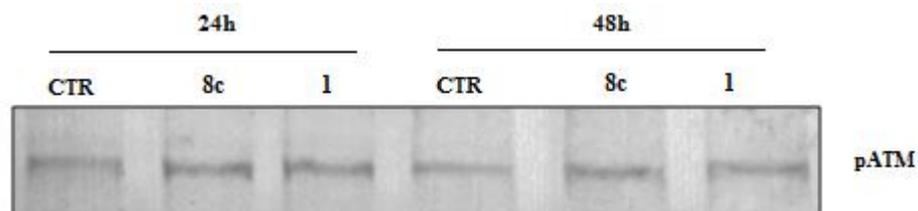


Figura 10. Espressione della proteina ATM fosforilata dopo 24 e 48 ore su controllo e in presenza di **8c** (15 μ M) e di **1** (15 μ M) rispetto al controllo (CTR).

Come precedentemente anticipato, uno dei target della proteina ATM è l'istone H2AX [15]. Anche l'aumento della forma fosforilata di H2AX, dunque, segnala la presenza di

un danno al DNA. Nei mammiferi, una delle risposte cellulari più precoci dopo l'induzione di una doppia rottura del DNA è, per l'appunto, la fosforilazione dell'istone H2AX in corrispondenza del sito di danno, che avviene per opera delle fosfatidilinositolol-3-OH-chinasi (ATM, DNA-PK e ATR). Questo evento sembra essere importante nel reclutamento di fattori di segnalazione del danno e di proteine coinvolte nella riparazione delle DSBs (*Double Strand Breacks*) nei siti danneggiati (i.e 53BP1, Mre11, Rad50, Nbs1).

Come emerge dalla Fig. 11, il trattamento delle cellule MDA-MB231 sia con **8c** alla concentrazione di 15 μ M che con **1** alla stessa concentrazione si associa ad un marcato incremento del livello di H2AX fosforilato. L'effetto si osserva già a 24 h ma è particolarmente evidente dopo 48 h di trattamento.

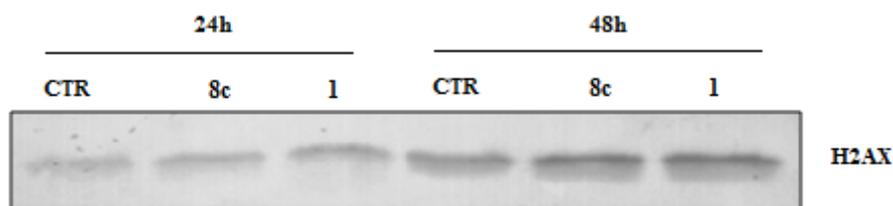


Figura 11. Espressione della proteina H2AX dopo 24 e 48 ore su controllo e in presenza di **8c** (15µM) e di **1** (15µM) rispetto al controllo (CTR).

In conclusione, i dati relativi alla fosforilazione sia di ATM che di H2AX suggeriscono che i composti **8c** e **1** agiscono determinando un danno al DNA (probabilmente una rottura al doppio filamento).

L'incremento della frazione pre-G0/G1 dopo trattamento con i composti **8c** e **1** suggerisce che la riduzione della vitalità cellulare è associata ad induzione di morte cellulare. La mancata positività alla colorazione con ioduro di propidio (Fig. 7) esclude la morte per necrosi.

Si è pertanto valutata l'eventuale attivazione delle caspasi, proteasi attivate negli eventi apoptotici [16].

Le caspasi sono presenti nella cellula in forma di pro-

caspasi inattive. L'attivazione consiste nella conversione di una pro-caspasi in caspasi per rimozione di un frammento di inattivazione. In particolare, la caspasi-2 è una caspasi a sede nucleare generalmente attivata in risposta a danno al DNA [17].

I risultati del test indicano che il trattamento con **8c** e **1** si associa ad attivazione della caspasi-2, attivazione dimostrata dal decremento della forma inattiva di pro-caspasi-2 (Fig. 12).

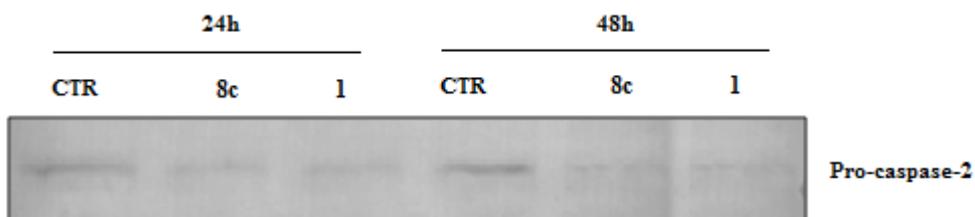


Figura 12. Espressione della proteina pro-caspasi-2 dopo 24 e 48 ore su controllo e in presenza di **8c** (15 μ M) e di **1** (15 μ M).

Tale dato rappresenta un'ulteriore conferma dell'induzione da parte dei composti **8c** e **1** di un danno al DNA e di attivazione di un meccanismo apoptotico.

Al fine di comprendere se il danno indotto al DNA

dai composti **8c** e **1** sia correlato a fenomeni di intercalazione, sono state condotte misure di dicroismo circolare.

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica che trova applicazione nello studio strutturale di un'ampia gamma di molecole chirali, in particolare nell'analisi della struttura secondaria e della conformazione di macromolecole, tra cui il DNA [18].

Uno spettro di dicroismo circolare rappresenta la differenza tra l'assorbimento della luce circolarmente polarizzata sinistra e destra.

Il CD del DNA nella sua forma conformazionale più frequentemente osservata, la forma B, è caratterizzato da una banda positiva centrata a circa 260-280 nm e una banda negativa a circa 245 nm. Variazioni della sua conformazione secondaria, come quella prodotta, ad esempio, dalla presenza di un agente intercalante, producono marcati cambiamenti dello spettro CD.

La registrazione di spettri CD di soluzioni a concentrazione

costante di DNA con quantità crescenti dei composti **8c** (0-34.99 μ M) e **1** (0-45.07 μ M) ha prodotto i grafici riportati in figura 13.

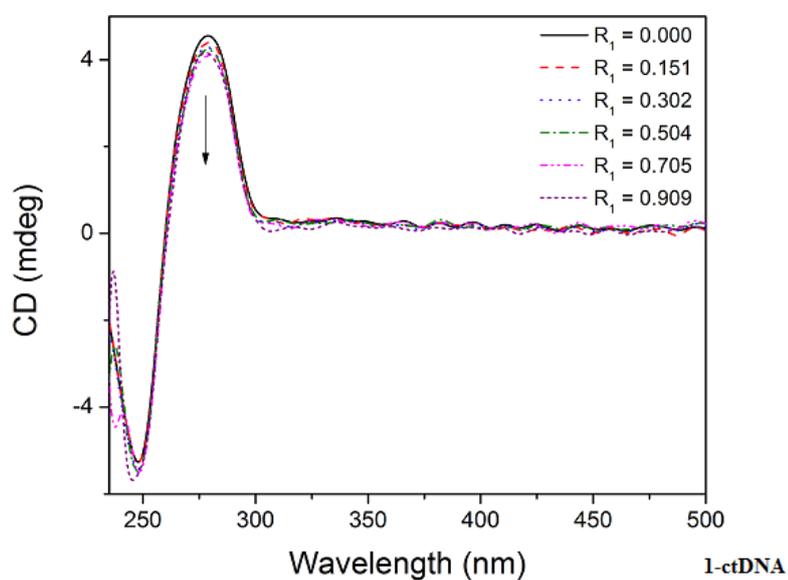
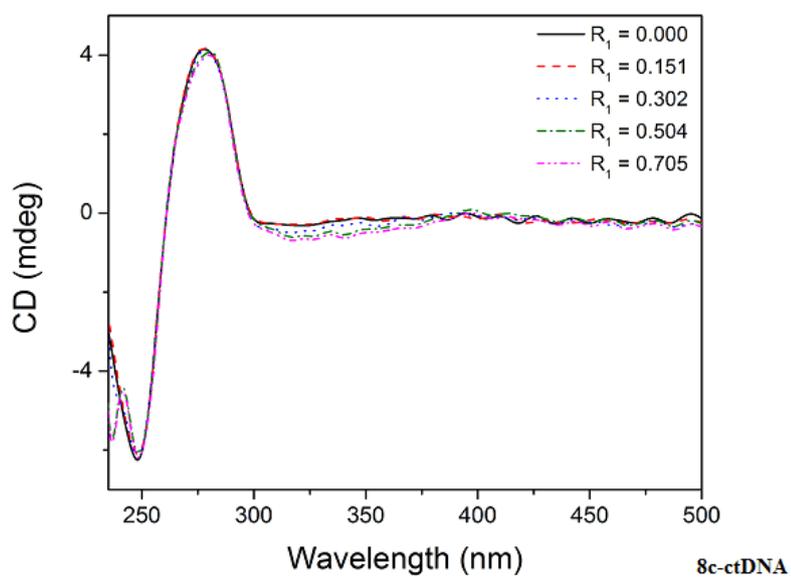


Figura 13. CD di soluzioni di DNA (linea nera continua) in presenza di quantità crescenti di **8c** e **1**. $[DNA_{fosfato}] = 50 \mu M$. R_1 = rapporto molare tra la molecola **8c** o **1** e DNA in unità monomeriche ($DNA_{fosfato}$).

L'assenza di sostanziali alterazioni dello spettro del DNA in presenza dei due composti in esame permette di escludere l'intercalazione di questi ultimi nella doppia elica.

Altre analisi, come la misura di assorbimento UV-vis e la valutazione della variazione di temperatura di denaturazione e della viscosità del DNA, consentiranno di comprendere se **8c** e **1** si comportano da “groove-binders”: in tal caso, infatti, l'alterazione della struttura del DNA non è tale da produrre cambiamenti apprezzabili sul suo spettro CD, come nel caso degli spettri sopra riportati.

**PARTE SECONDA: SINTESI E ATTIVITA'
ANTIPROLIFERATIVA DI NUOVI DERIVATI
TRIAZENIL-INDAZOLO-CARBOSSAMIDICI**

Stato dell'arte

Nell'ambito della Ricerca di nuove entità chimiche dotate di attività antiproliferativa, nell'ultimo decennio il nucleo indazolico ha rappresentato uno scaffold di notevole interesse. La letteratura fornisce diversi esempi in cui tali studi hanno portato a composti in grado di interferire con il processo di crescita di cellule tumorali: si ricordano, tra gli altri, diversi N-2-(benzilsostituiti)-3-(4-metil-fenil)-2H-indazoli **26**, che hanno mostrato attività angiogenica [19]; la 4-metossi-N-(3-cloro-indazol-7-il)benzensulfonammide **27** che possiede buona attività antiproliferativa su cellule leucemiche murine L1210 [20]; l'N-[4-(3-ammino-1H-indazol-4-il)-fenil]-N'-(3-metilfenil)-urea **28** che ha prodotto una significativa inibizione della crescita tumorale

in diversi modelli animali preclinici [21]; i pirimido[1,2-b]indazoli **29** che si sono rivelati potenziali agenti anticancro contro la linea cellulare tumorale polmonare A-549 [22]; e infine la Lonidamina **30**, l'acido 1-(2,4-diclorobenzil)-1H-indazolo-3-carbossilico, che è un farmaco antitumorale relativamente nuovo in grado di inibire selettivamente il metabolismo energetico delle cellule neoplastiche e aumentare la permeabilità delle membrane cellulari [23] (Fig. 14).

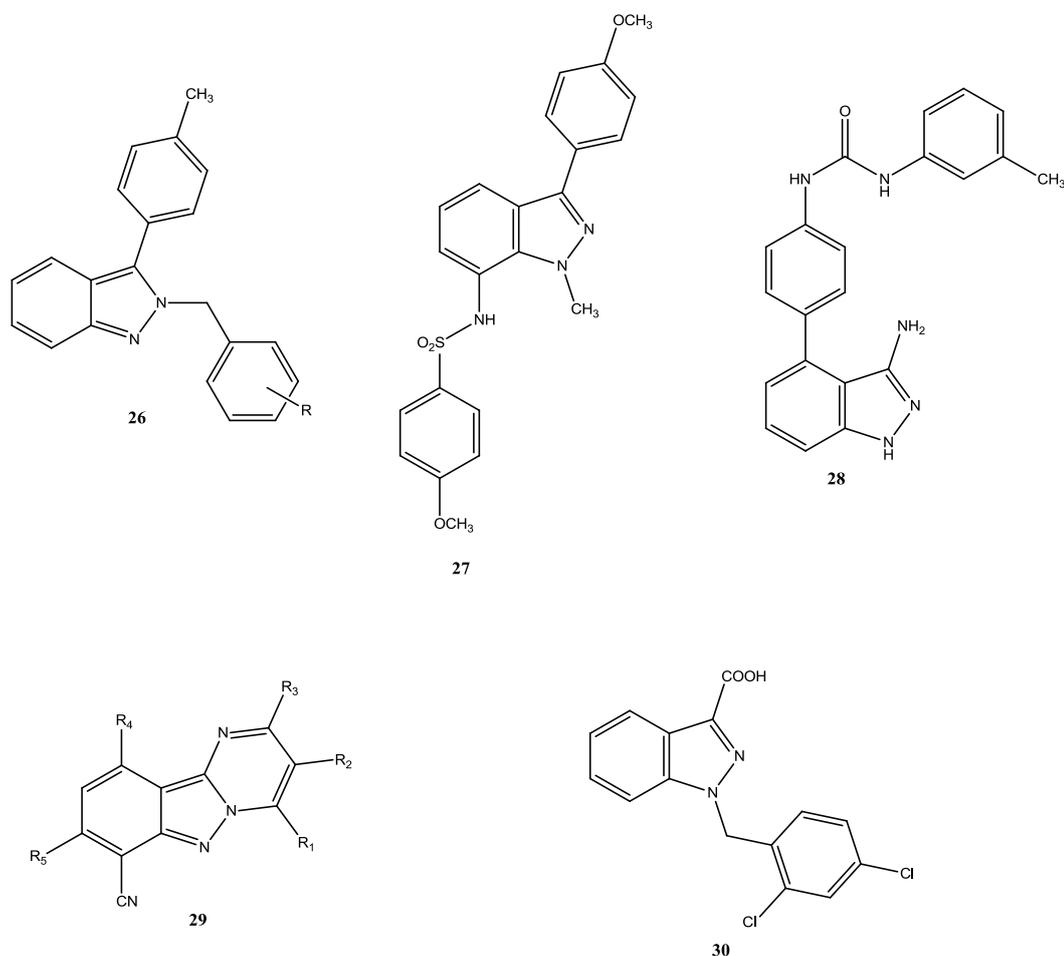


Fig 14. Alcune molecole con attività antitumorale contenenti il nucleo indazolico descritte in letteratura.

Sulla base di queste incoraggianti premesse il gruppo di ricerca presso cui ho elaborato la mia tesi di dottorato ha condotto diversi studi finalizzati all'ottenimento di nuove entità chimiche contenenti in nucleo indazolico come

potenziali antitumorali [24] [25] [26] [27]. Uno di questi ha messo in luce come composti con struttura 3-amino-N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamida **31** (Fig. 15) possedessero attività antiproliferativa [27].

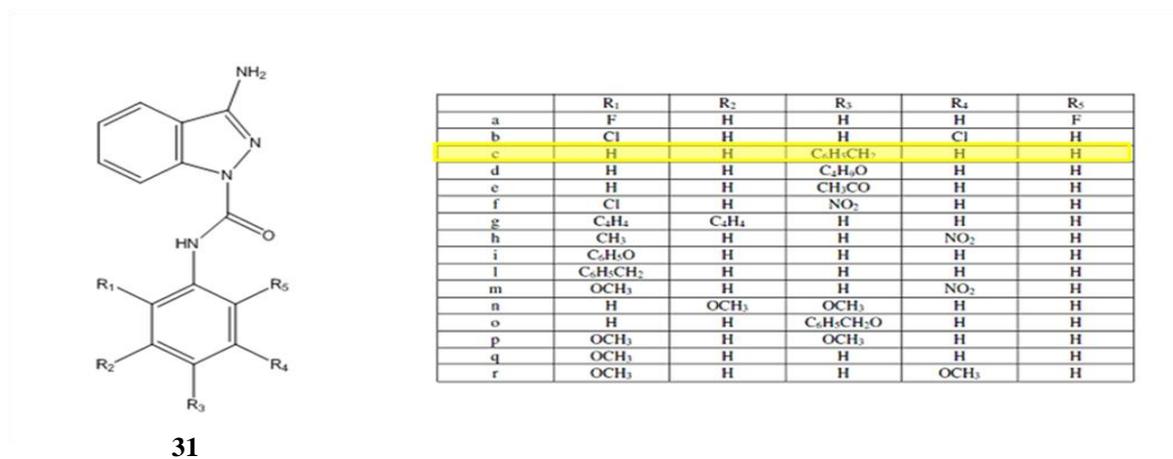


Fig. 15. Formula di struttura delle 3-amino-N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamidi **31**.

Lo screening su un panel di 60 linee cellulari tumorali condotto presso l'NCI sui composti **31a,c,d,n,q** ha dato valori di GI₅₀ nel range di 0.015-98.8 μM. Il migliore agente antiproliferativo contro tutte le linee cellulari saggiate è risultato il composto **31c**. Nella tabella 9 sono riportati alcuni valori di GI₅₀ ottenuti per tale composto.

Cancer types	Panel/cell line	36c GI ₅₀
Leukemia	HL-60 (TB)	0.466
	K-562	1.20
	MOLT-4	0.636
	RPMI-8226	1.86
	SR	0.0153
Non-small cell lung cancer	NCI-H460	0.408
	NCI-H522	2.90
Colon cancer	HCT-15	1.08
	HT29	2.39
	KM12	2.94
CNS cancer	SF-295	0.530
	SF-539	0.495
Melanoma	LOX IMVI	0.477
	M14	0.772
	SK-MEL-5	2.22
	UACC-62	0.353
Renal cancer	ACHN	1.69
	UO-31	0.347
Prostate cancer	DU-145	1.02
Breast cancer	MCF7	0.555
	MDA-MB-231/ATCC	0.847
	MDA-MB-435	2.82
	T-47D	1.55

Tabella 9. Alcuni valori di GI₅₀ ottenuti per il composto **31c** su diverse linee cellulari tumorali.

Studi sull'effetto di tali composti sul ciclo cellulare hanno mostrato che essi provocano un marcato arresto delle cellule in fase G₀-G₁ (Fig. 16) e una diminuzione della

forma fosforilata della proteina retinoblastoma (Fig. 17) coinvolta nel processo di crescita incontrollata di molte cellule neoplastiche. Si registra infatti la presenza predominante di tale proteina nella sua forma fosforilata nelle cellule in fase di proliferazione, mentre la forma ipofosforilata è presente principalmente nelle cellule in fase di arresto, dove lega fattori di trascrizione come l'E2F e sopprime la trascrizione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare dalla fase G₁ alla fase S.

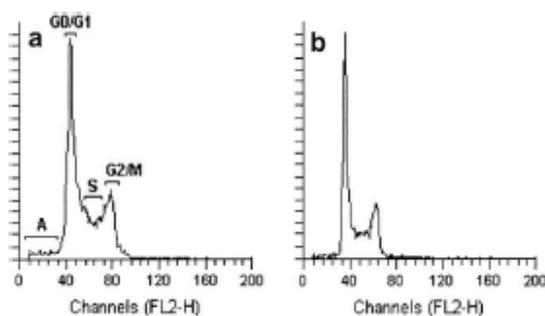


Fig. 16. Effetto sul ciclo cellulare del composto **31c** (b) alla concentrazione corrispondente alla GI₅₀ su cellule K562 (1.20 μ M) per 24h rispetto al controllo (a).

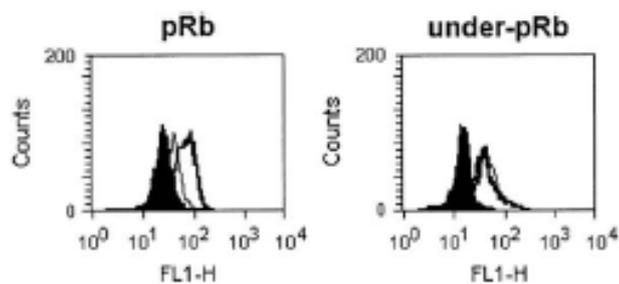
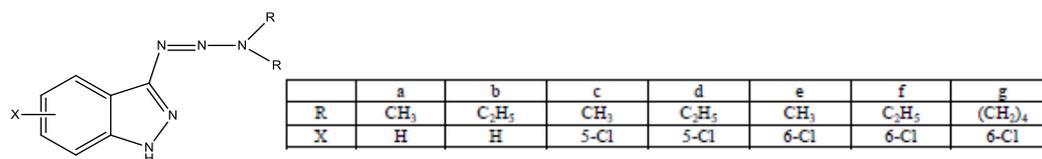
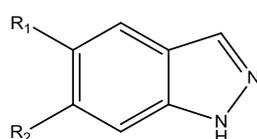


Fig. 17. Effetto del composto **31c** alla concentrazione di $14\mu\text{M}$ sull'espressione della proteina retinoblastoma totale (pRb) e ipofosforilata (under-pRb). Nero: controllo; Linea spessa: cellule con anticorpi monoclonali anti-pRb o anti-under-pRb; Linea sottile: cellule con anticorpi monoclonali anti-pRb o anti-under-pRb dopo 24h di trattamento con il composto.

Un altro lavoro precedentemente pubblicato aveva messo in evidenza l'attività citotossica di alcuni triazenil-indazoli **32a-g** e **33a-d** (Fig. 18) [26].



32 a-g



33 a-d

	a	b	c	d
R ₁	X	Y	H	H
R ₂	H	H	X	Y

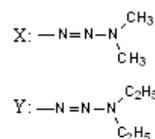


Fig. 18. Formule di struttura dei triazenil-indazoli **32a-g** e **33a-d**.

Tali composti hanno mostrato attività antiproliferativa sulle linee cellulari K562, HL60, L1210 e MCF7 con valori di GI₅₀ che vanno da 11.7 a 91.3 μM. La rilevazione della loro attività citotossica in vitro mostra che questi composti, analogamente ad altri triazenileterocicli, sono in grado di interferire con le funzioni cellulari con un meccanismo diverso da quello alchilante, tipico della classe dei metil-triazeni, che può esplicarsi solo in seguito ad attivazione metabolica.

Obiettivi della tesi

Basandomi su tali premesse, scopo di una parte del mio lavoro di tesi di dottorato è stato la progettazione e la sintesi di composti “ibridi” **34** (Fig. 19) che mantengono la struttura indazolo-carbossamidica dei derivati **31** e che presentano la sequenza triazenica, al posto del gruppo aminico.

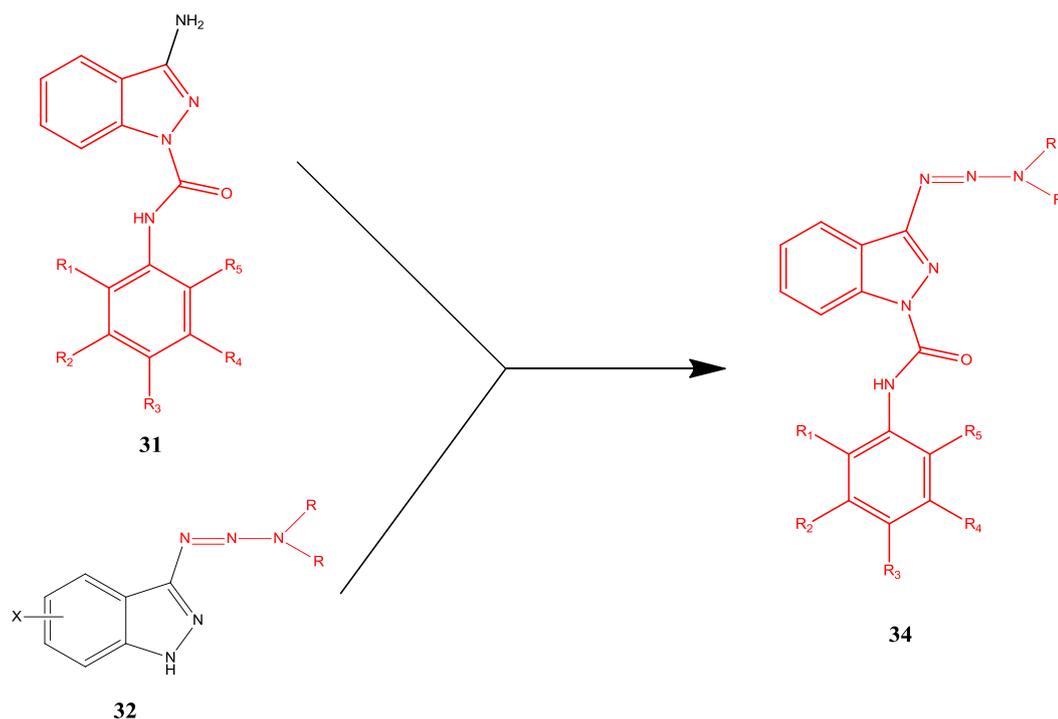
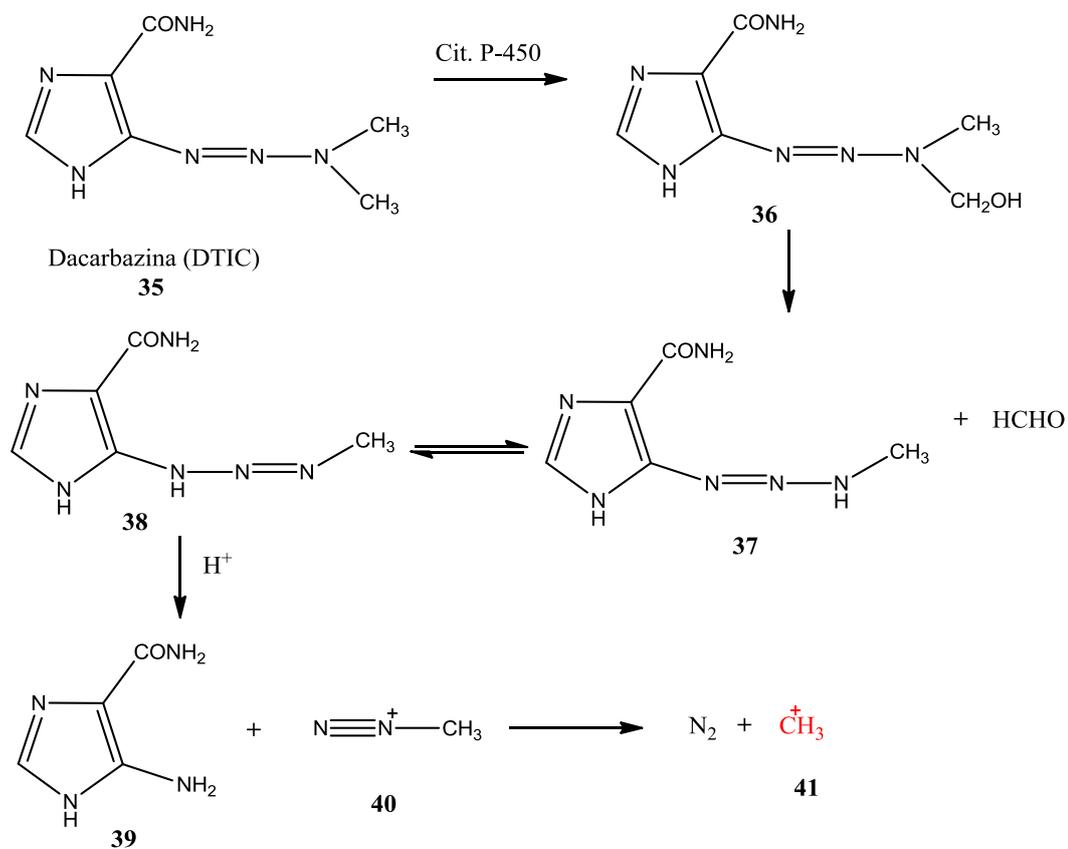


Fig. 19. Formula di struttura delle triazenil-indazol-carbossamidi di tipo **34**.

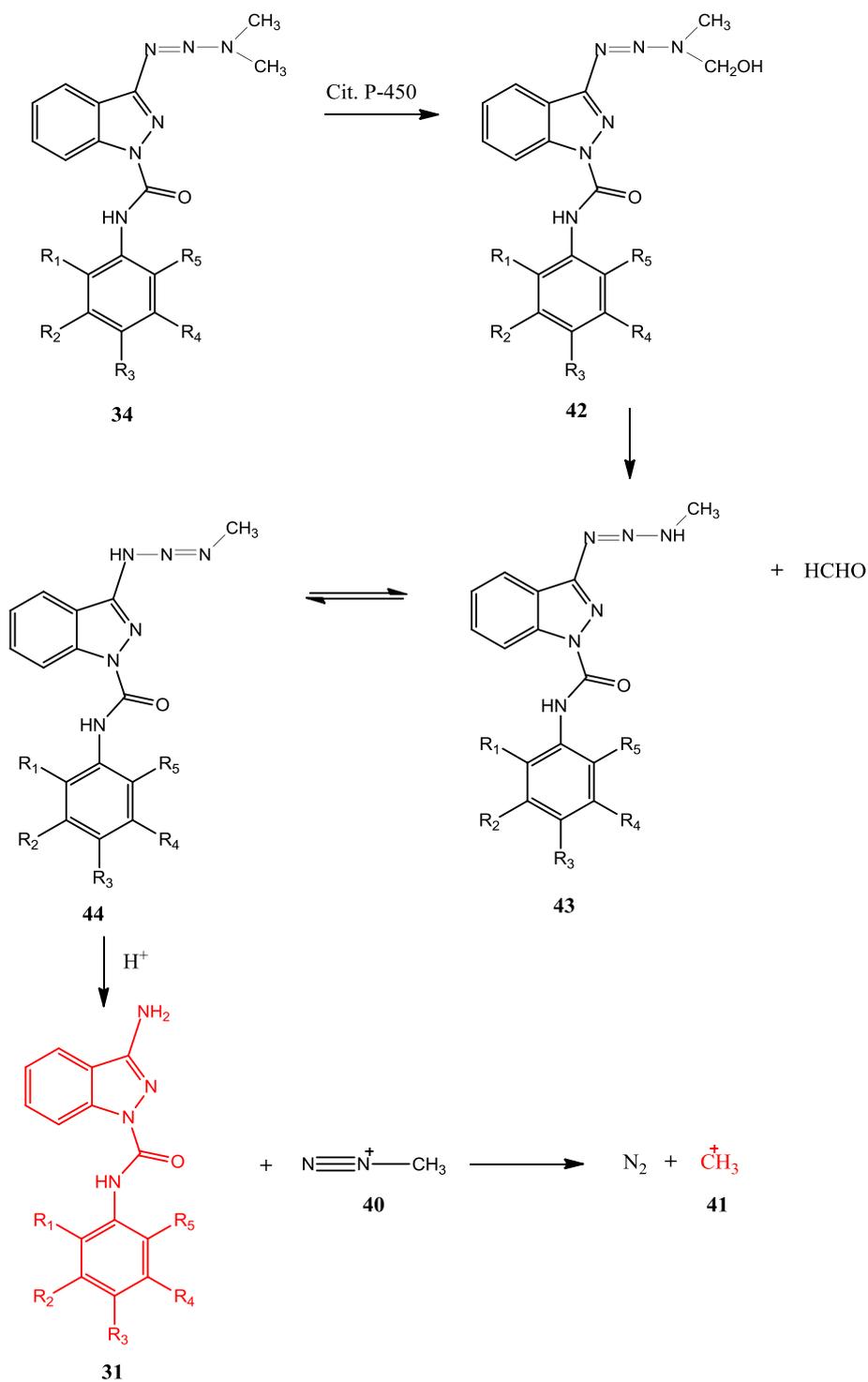
Sulla base di quanto detto, infatti, i composti di tipo **34** ottenuti dovrebbero presumibilmente essere dotati di attività antiproliferativa anche in assenza di attività metabolica, come molti dialchiltriageni riportati in letteratura [28] [29] [30]. Nel caso dei triageni dimetilici si può supporre un'attività antiproliferativa ulteriore esplicabile in vivo in seguito ad attivazione enzimatica, analogamente a quanto noto per molti dimetiltriageni, come ad esempio la dacarbazina **35**, 5-(3,3-dimetiltriagen-1-il)imidazolo-4-carbossamide (DTIC), farmaco usato nel trattamento del melanoma maligno [31]. Il meccanismo di attivazione in vivo per questo genere di composti si basa sull'azione metabolica operata dal citocromo P-450 nel fegato [32] [33] che porta alla formazione di un 3-monometiltriagene instabile **38** [31] il quale libera la specie alchilante vera e propria **41** come raffigurato nello schema 10.



Schema 10. Meccanismo di attivazione enzimatica della dacarbazina **35**.

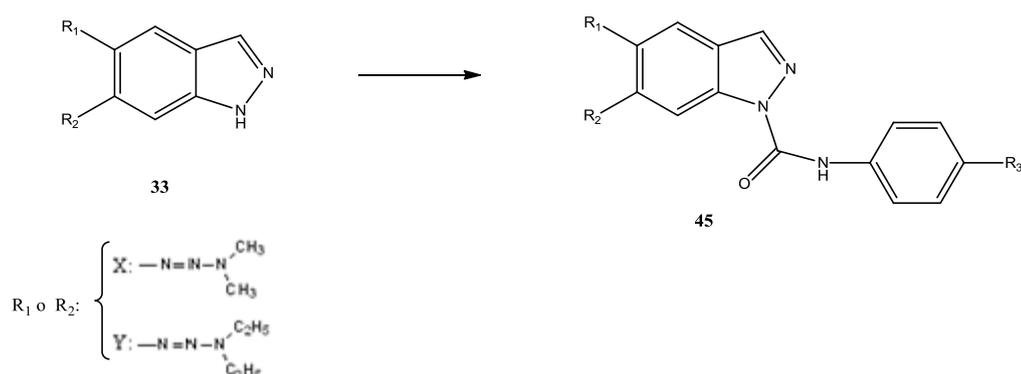
Nel caso dei composti di tipo **34**, in seguito all'attivazione metabolica non solo si avrebbe la liberazione di una specie alchilante, il carbocatione metilico, ma si avrebbe anche il rilascio del composto di tipo **31** (schema 11) dotato a sua volta di attività

antiproliferativa, diversamente da quanto avviene, ad esempio, per la dacarbazina, dove la porzione 5-ammino-1H-imidazol-4-carbossamidica **39** costituisce un semplice carrier non dotato di attività antiproliferativa intrinseca.



Schema 11. Possibile meccanismo di attivazione in vivo delle 3-dimetiltriazeno-1H-indazolo-1-carbossamidi **34**: formazione della specie alchilante e concomitante rilascio del composto attivo **31**.

In questo contesto è stato anche considerato di trasformare i triazenil-indazoli di tipo **33**, aventi la catena dialchiltriazenica in posizione 5 o 6, nelle corrispondenti N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamidi **45** al fine di un potenziale miglioramento dell'azione antiproliferativa rispetto ai composti di partenza (schema 12).



Schema 12. Trasformazione dei dialchiltriazenil-indazoli **33** nelle corrispondenti dialchiltriazenil-N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamidi **45**.

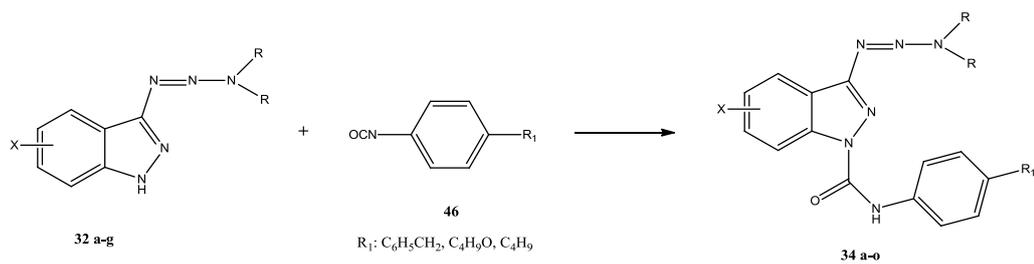
Riassumendo, il secondo obiettivo della mia tesi di dottorato è stato la sintesi di composti triazenici, tra questi i derivati dimetiltriazenici **34**, i quali potrebbero essere

dotati di azione antiproliferativa multipla:

- Come dialchiltrialeni in caso di non attivazione metabolica;
- Come profarmaci in grado di rilasciare in vivo dopo attivazione metabolica i composti di tipo **31** e l'agente alchilante carbocatione metilico.

Parte chimica

I composti desiderati **34a-o** sono stati ottenuti secondo lo schema 13 per reazione dei rispettivi triazenilindazoli **32** con il 4-benzilfenilisocianato e con il 4-butossifenilisocianato, con i quali si erano ottenute le 3-amino-N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamidi **31** con migliore attività antiproliferativa, e in più con il 4-terz-butilfenilisocianato. La reazione viene condotta usando quantità equimolari dei reagenti sotto agitazione a temperatura ambiente per 24h. Talvolta, quando dopo questo tempo la TLC mostrava la presenza di triazenilindazolo di partenza, la reazione veniva portata a completezza con un'ulteriore aggiunta di isocianato in quantità pari al 25-50% rispetto alla quantità di partenza.



	a	b	c	d	e	f	g
R	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	(CH ₂) ₄
X	H	H	5-Cl	5-Cl	6-Cl	6-Cl	6-Cl

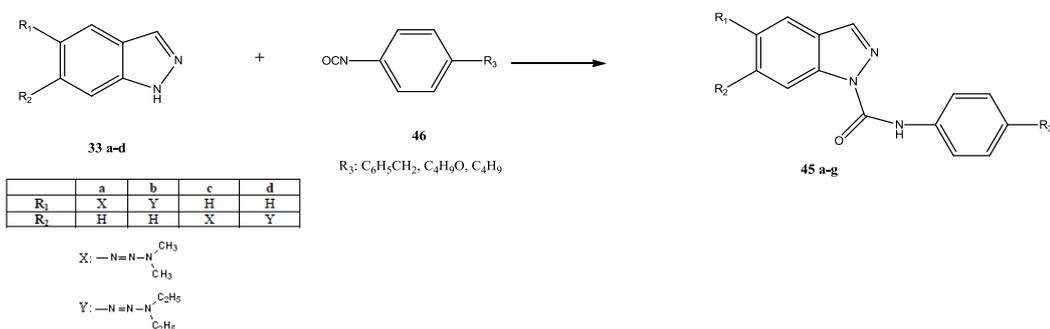
Schema 13. Sintesi delle triazenil-indazolo-carbossamidi **34a-o**.

In tabella 10 sono riportati i derivati **34a-o** ottenuti con le rispettive rese.

Triazenil-indazolo-carbossamidi 34	R	X	R ₁	p.f. (°C)	Solvente di cristallizzazione	Resa %
a	CH ₃	6-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	178-181	Acetato	35.8
b	CH ₃	5-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	213-215	Acetato	46.2
c	C ₂ H ₅	6-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	152-153	Acetato	42.7
d	C ₂ H ₅	5-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	146-147	Acetato	42.7
e	CH ₃	H	C ₆ H ₅ CH ₂	126-128	Acetato	60
f	(CH ₂) ₄	6-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	188-190	-	85
g	(CH ₂) ₄	5-Cl	C ₆ H ₅ CH ₂	199-201	-	60
h	CH ₃	6-Cl	C ₄ H ₉ O	153-156	Acetato	58
i	C ₂ H ₅	6-Cl	C ₄ H ₉ O	138-139	-	50
l	C ₂ H ₅	5-Cl	C ₄ H ₉ O	108-109	Etanolo	55.7
m	(CH ₂) ₄	6-Cl	C ₄ H ₉ O	176-177	Etanolo	61.3
n	C ₂ H ₅	6-Cl	C ₄ H ₉	98-107	-	82.5
o	(CH ₂) ₄	6-Cl	C ₄ H ₉	130-132	Etanolo	66.7

Tabella 10. Triazenil-indazolo-carbossamidi **34a-o**.

E' stata inoltre realizzata la trasformazione dei dialchiltriazenil-indazoli **33** nelle corrispondenti N-fenil-1H-indazolo-1-carbossamidi **45a-g**. La sintesi, realizzata analogamente ai composti **34a-o**, è riportata schematicamente di seguito (schema 14).



Schema 14. Sintesi delle triazenil-indazolo-carbossamidi **45a-g**.

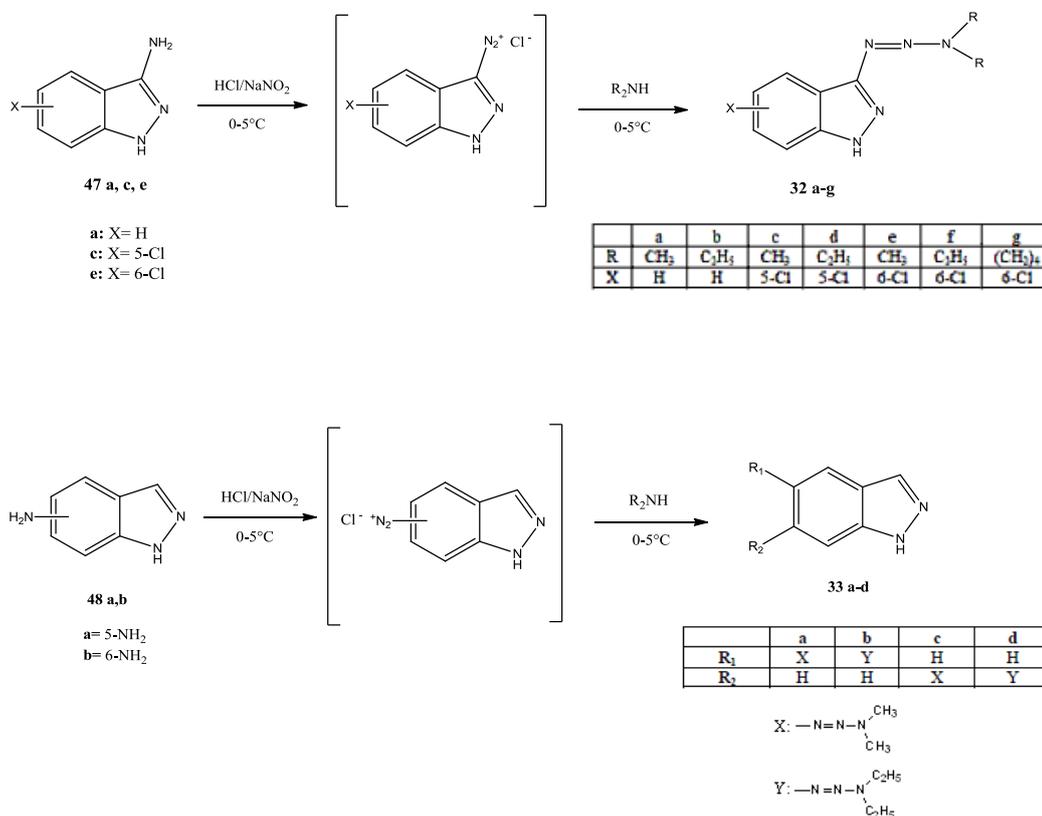
In tabella 11 sono riportati i derivati **45a-g** ottenuti con le rispettive rese.

Triazenil-indazolo-carbossamidi 45	R_1	R_2	R_3	p.f. ($^{\circ}\text{C}$)	Solvente di cristallizzazione	Resa %
a	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}_3$	H	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	92-94	Etanolo	46
b	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}_3$	H	OC_4H_9	82	Etanolo	38
c	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}_3$	H	C_4H_9	144-145	Etanolo	56
d	$(\text{CH}_3)_2\text{N}_3$	H	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	138-140	Acetato	38
e	$(\text{CH}_3)_2\text{N}_3$	H	OC_4H_9	99-102	Etanolo	51.8
f	H	$(\text{CH}_3)_2\text{N}_3$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	100-102	Acetato	35.8
g	H	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}_3$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$	79-81	Etanolo	42.5

Tabella 11. Triazenil-indazolo-carbossamidi **45a-g**

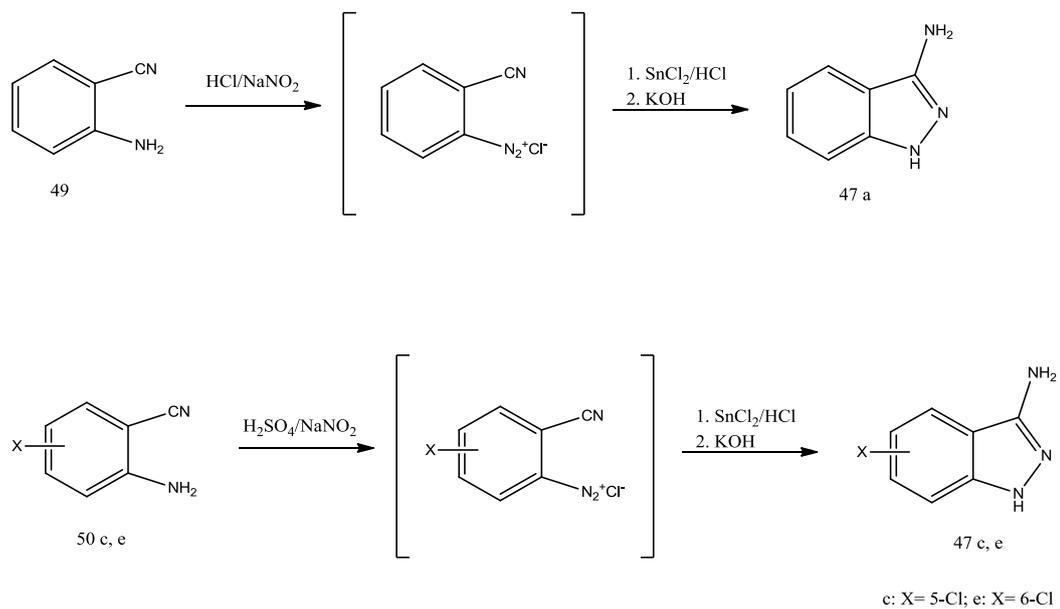
Per la sintesi delle triazenil-indazolo-carbossamidi **34** e **45** è stato necessario risintetizzare i triazenil-indazoli

di partenza **32** e **33** a partire dai relativi amino-indazoli secondo i seguenti schemi di reazione [26] (schema 15).



Schema 15. Sintesi dei triazenil-indazoli **32a-g** e **33a-d**.

Gli amino-indazoli di partenza **47a,c,e** sono prodotti noti ma non commerciali e sono pertanto anch'essi stati sintetizzati secondo letteratura (schema 16) [34].



Schema 16. Sintesi degli amminoindazoli **47a,c,e**.

Parte Biologica

I composti ottenuti sono stati proposti all'NCI per uno screening sull'attività antitumorale. Di questi solo il **34a** e il **34e** sono stati selezionati. Alla concentrazione di 10 μM il composto **34a** ha mostrato basse percentuali di inibizione della crescita cellulare su tutte le linee cellulari tumorali saggiate. Il "one dose" test sul composto **34e** ha invece messo in evidenza una buona attività antiproliferativa. Nel test a cinque dosi esso ha mostrato valori di GI_{50} compresi in un range che va da 0.0359 μM a più di 100 μM , come si può vedere nel report sottostante (Tabella 12).

**National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
In-Vitro Testing Results**

NSC : 765771 / 1		Experiment ID : 1207NS11					Test Type : 08		Units : Molar						
Report Date : September 19, 2012		Test Date : July 23, 2012					QNS :		MC :						
COMI : GD359 (118333)		Stain Reagent : SRB Dual-Pass Related					SSPL : 0WKA								
Panel/Cell Line	Time	Log10 Concentration										GI50	TGI	LC50	
		Zero	Ctrl	Mean Optical Densities					Percent Growth						
		-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0				
Leukemia															
CCRF-CEM	0.516	2.204	2.145	2.003	1.779	1.130	1.054	96	88	75	36	32	4.42E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HL-60(TB)	0.673	2.134	2.382	2.132	2.062	1.498	1.402	117	100	95	56	50	9.62E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4
K-562	0.353	2.365	2.186	0.695	0.589	0.533	0.483	91	17	12	9	6	3.59E-8	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MOLT-4	0.609	2.073	2.092	2.133	1.584	1.282	1.203	101	104	67	46	41	6.35E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
RPMI-8226	0.999	2.473	2.436	2.364	2.251	1.514	1.403	97	93	85	35	27	5.00E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SR	0.194	0.660	0.657	0.691	0.669	0.534	0.505	99	107	102	73	67	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Non-Small Cell Lung Cancer															
A549(ATCC)	0.413	1.796	1.714	1.512	1.224	0.837	0.803	94	79	59	31	28	2.04E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HOP-62	0.514	1.544	1.491	1.253	1.179	1.078	1.109	95	72	65	55	58	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HOP-92	1.087	1.340	1.268	1.228	1.227	1.133	1.113	71	55	55	18	10	1.39E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H226	0.746	2.199	2.211	1.982	1.853	1.547	1.538	101	85	76	55	54	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H23	1.173	3.046	2.964	2.908	2.474	2.080	1.985	96	93	69	48	43	8.40E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H322M	0.689	1.596	1.552	1.420	1.339	1.324	1.249	95	81	72	70	62	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H460	0.271	2.537	2.644	1.343	0.831	0.633	0.547	105	47	25	16	12	8.97E-8	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NCI-H522	0.966	1.844	1.813	1.710	1.537	1.281	1.158	96	84	64	34	20	3.00E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Colon Cancer															
COLO 205	0.374	1.196	1.188	1.193	0.639	0.122	0.132	99	100	32	-68	-65	5.45E-7	2.10E-6	6.67E-6
HCC-2998	0.542	1.566	1.481	1.464	1.053	0.897	0.798	92	90	50	35	25	9.93E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HCT-116	0.192	1.757	1.779	1.479	1.080	1.073	0.982	101	82	57	56	50	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HCT-15	0.249	2.092	1.980	1.171	0.980	0.737	0.630	94	50	40	26	21	1.00E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HT29	0.300	1.433	1.477	1.179	1.025	0.549	0.412	104	78	64	22	10	2.15E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
KM12	0.515	2.465	2.489	1.648	0.933	0.811	0.752	101	59	21	15	12	1.66E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SW-620	0.251	2.069	2.010	1.085	0.834	0.668	0.542	97	46	32	23	16	8.29E-8	> 1.00E-4	> 1.00E-4
CNS Cancer															
SF-268	0.737	2.015	1.983	1.802	1.668	1.324	1.238	97	83	73	46	39	7.05E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SF-539	0.797	2.809	2.730	2.595	1.728	0.674	0.637	96	89	46	-15	-20	8.19E-7	5.61E-6	> 1.00E-4
SNB-19	0.753	2.131	2.026	1.981	1.483	1.469	1.492	92	89	53	52	54	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
U251	0.251	2.395	2.337	2.019	1.660	1.332	1.254	97	78	57	36	34	2.37E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Melanoma															
LOX IMVI	0.552	2.854	2.653	1.126	0.764	0.704	0.539	91	25	9	7	-2	4.19E-8	5.37E-5	> 1.00E-4
MALME-3M	0.673	1.334	1.322	1.317	1.235	0.939	0.856	98	97	85	40	28	6.04E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
M14	0.425	1.784	1.782	1.112	0.869	0.661	0.587	100	51	33	17	12	1.07E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-435	0.396	1.831	1.789	1.156	0.986	0.936	0.904	97	53	41	38	35	1.78E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-MEL-2	1.283	2.249	2.274	2.291	1.917	1.651	1.429	103	104	66	38	15	3.69E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-MEL-28	0.449	1.137	1.116	1.110	1.097	0.975	0.986	97	96	94	76	78	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-MEL-5	0.729	3.108	3.048	2.835	0.828	0.621	0.584	97	88	4	-15	-20	2.86E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
UACC-257	0.996	1.877	1.810	1.688	1.409	1.241	1.191	92	79	47	28	22	7.93E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
UACC-62	0.857	2.829	2.719	1.203	0.867	0.674	0.611	94	18	1	-21	-29	3.78E-8	1.05E-6	> 1.00E-4
Ovarian Cancer															
IGROV1	0.662	2.058	2.070	1.738	1.481	1.419	1.278	101	77	59	54	44	2.61E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4
OVCAR-3	0.601	1.694	1.774	1.775	1.464	1.018	0.947	107	107	79	38	32	5.11E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
OVCAR-4	0.644	1.130	1.101	1.080	1.053	0.982	0.949	94	90	84	70	63	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
OVCAR-5	0.406	1.278	1.250	1.153	1.111	1.101	1.094	97	86	81	80	79	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
OVCAR-8	0.564	1.993	1.984	1.648	1.399	1.153	1.019	99	76	58	41	32	3.09E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
NOIADR-RES	0.868	2.720	2.894	2.174	1.677	1.543	1.426	109	70	44	36	30	5.81E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SK-OV-3	0.651	1.439	1.389	1.396	1.445	1.301	1.337	94	95	101	82	87	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Renal Cancer															
786-0	0.732	2.603	2.609	2.527	2.128	1.532	1.404	100	96	75	43	36	5.92E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
A498	1.207	1.932	1.883	1.783	1.805	1.615	1.531	93	79	82	56	45	3.47E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4
ACHN	0.340	1.864	1.823	1.168	1.023	0.909	0.900	97	54	45	37	37	2.84E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
CAKI-1	0.946	3.085	2.942	2.486	1.987	1.526	1.399	93	72	49	27	21	8.75E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
RXF 393	0.779	1.051	1.037	1.026	1.045	0.904	0.902	95	91	98	46	45	8.35E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
SN12C	0.721	2.613	2.483	2.426	2.038	1.787	1.741	93	90	70	56	54	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
TK-10	0.770	1.364	1.441	1.460	1.326	1.195	1.129	113	116	94	71	60	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
UO-31	0.706	2.112	1.973	1.829	1.584	1.103	1.021	90	80	62	28	22	2.31E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Prostate Cancer															
PC-3	0.651	1.914	1.793	1.504	1.390	1.072	1.032	90	68	59	33	30	2.18E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
DU-145	0.333	1.233	1.288	1.102	1.043	1.024	0.941	106	85	79	77	68	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
Breast Cancer															
MCF7	0.380	1.707	1.679	1.411	0.789	0.648	0.651	98	78	31	20	20	3.89E-7	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-231(ATCC)	0.625	1.354	1.266	1.112	1.008	0.924	0.777	88	67	53	41	21	1.65E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4
HS 578T	0.954	2.033	1.966	1.873	1.863	1.766	1.742	94	85	84	75	73	> 1.00E-4	> 1.00E-4	> 1.00E-4
BT-549	0.918	1.926	2.001	1.969	1.758	1.553	1.326	107	104	83	63	40	3.76E-5	> 1.00E-4	> 1.00E-4
T-47D	0.681	1.746	1.684	1.204	1.028	0.996	0.996	94	49	33	30	29	9.56E-8	> 1.00E-4	> 1.00E-4
MDA-MB-468	0.679	1.482	1.462	1.365	1.264	0.976	0.893	97	85	73	37	27	4.33E-6	> 1.00E-4	> 1.00E-4

Tabella 12. Report del test a cinque dosi del composto **34e**.

In tabella 13 sono riportati i migliori valori di GI_{50} ottenuti per il composto **34e**.

Tipo di tumore	Linea cellulare	GI_{50} (μ M)
Leukemia	K-562	0.0359
	CCRF-CEM	4.42
Non-Small Cell Lung Cancer	NCI-H460	0.0897
	HOP-92	1.39
Colon Cancer	SW-620	0.0829
	KM12	0.166
Melanoma	LOX IMVI	0.0419
	UACC-62	0.0378
Breast Cancer	MCF7	0.389
	T-47D	0.0956

Tabella 13. Alcuni dei valori di GI_{50} ottenuti per il composto **34e**.

Nella tabella 14 sono riportati i migliori valori di GI_{50} ottenuti per il composto **34e** e i rispettivi valori registrati sulle stesse linee cellulari tumorali per il composto **31c**. Dai dati riportati si può notare che l'introduzione della catena triazenica sul composto **31c** ha

prodotto un aumento dell'attività antiproliferativa con valori di GI₅₀ inferiori nell'ordine di dieci/cento volte.

	K-562	NCI-H460	SW-620	LOX IMVI	UACC	T-47D
31c GI ₅₀ (μM)	1.2	0.408	3.62	0.477	0.353	1.55
34e GI ₅₀ (μM)	0.0359	0.0897	0.0829	0.0419	0.0378	0.0956

Tabella 14. Confronto delle GI₅₀(μM) dei composti **31c** e **34e** sulle linee cellulari K-562, NCI-H460, SW-620, LOX IMVI, UACC, T-47D.

Sulla linea cellulare non tumorale 16HBE (cellule di epitelio bronchiale umano), il composto **34e** ha dato un valore di IC₅₀ pari a 336.9 μM. E' stato calcolato l'indice di tossicità che è risultato essere pari a 0.028 (IC₅₀K562/IC₅₀16HBE).

I composti **34** e **45** non accettati per i test dall'NCI sono stati saggiati presso il laboratorio di microbiologia del dott. Domenico Schillaci al fine di valutarne l'attività antiproliferativa e la citotossicità. I test sono stati realizzati sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460, HT29 e

sulla linea cellulare normale HuDe. In tabella 15 sono riportati i valori di GI₅₀ ottenuti per i derivati **34**.

Composto	K562	NCI-H460	HT29	HuDe
	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)
34b	>10	>10	>10	191.4
34c	>10	>10	>10	248.0
34d	>10	>10	>10	54.4
34f	>10	>10	>10	Nd
34g	>10	>10	>10	Nd
34h	>10	>10	>10	60.7
34i	>10	>10	>10	Nd
34l	8.8	>10	>10	>100
34m	>10	>10	8.9	63.8
34n	8.9	>10	>10	>100
34o	>10	>10	>10	Nd

Tabella 15. GI₅₀ dei composti **34** sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e HT29 e sulla linea cellulare normale HuDe.

I risultati evidenzieranno la presenza di alcuni altri derivati potenzialmente interessanti.

E' stata inoltre valutato l'andamento dell'attività inibitoria della crescita cellulare per le K562 in funzione del tempo per i composti **34e,l,n** alla concentrazione di 10 μM. Come si evince dal grafico riportato in figura 20, l'attività dei composti **34e,l** aumenta dalle 4 alle 72 ore, mentre il **34n** raggiunge il massimo di attività a 24 ore,

attività che diminuisce nelle ore successive.

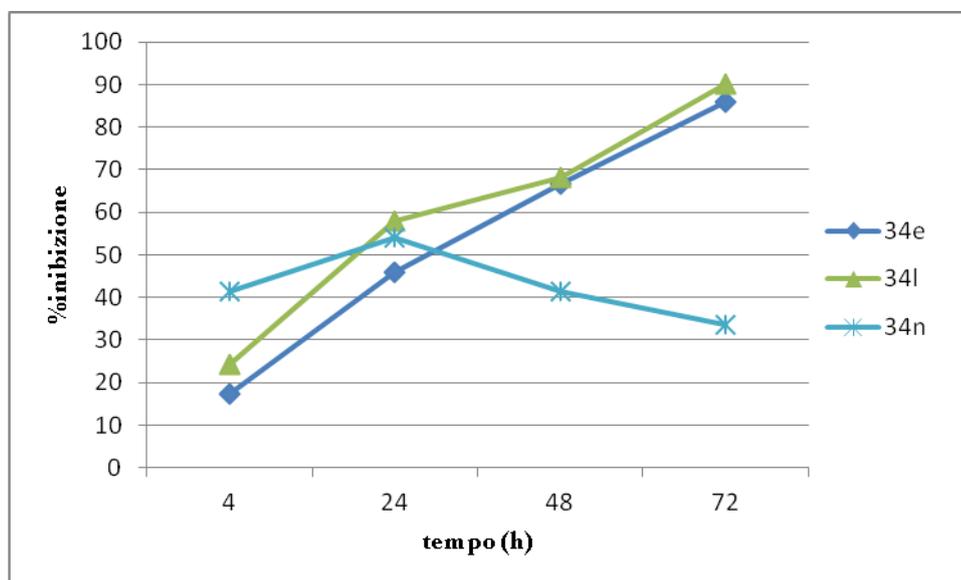


Figura 20. Andamento della percentuale di inibizione di crescita cellulare nel tempo sulla linea cellulare K562 per i composti **34e,l,n** a 10 μ M.

Nella tabella 16 sono riportati i valori di GI_{50} sulle stesse linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e HT29 e sulla linea cellulare primaria HuDe dei composti **45a-g**.

Composto	K562	NCI-H460	HT29	HuDe
	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)
45a	0.77	>10	10	>100
45b	6.18	>10	>10	>100
45c	>10	>10	>10	Nd
45d	>10	>10	Nd	Nd
45e	>10	>10	Nd	Nd
45f	>10	5.2	Nd	Nd
45g	>10	>10	>10	Nd

Tabella 16. GI₅₀ dei composti **45a-g** sulle linee cellulari tumorali K562, NCI-H460 e HT29 e sulla linea cellulare normale HuDe.

Al fine di valutare se la trasformazione del composto **33** nei derivati **45** abbia o meno apportato un miglioramento per l'attività antiproliferativa, si riportano in tabella 17 i valori percentuali di inibizione della crescita cellulare per il **33b** rispetto ai suoi derivati **45a-c** sulle linee cellulari tumorali K562 e NCI-H460.

% inibizione della crescita (10μM)		
	K562	NCI-H460
33b	18.4	8.1
45a	89.7	14.3
45b	62.9	42.3
45c	20.2	27.3

Tabella 17. Percentuali di inibizione della crescita alla concentrazione di 10μM per i composti **33b** e **45a-c** su cellule K562 e NCI-H460.

Tali analisi preliminari indicherebbero complessivamente un aumento della attività antiproliferativa dei nuovi derivati **45a-c** rispetto al precursore **33b**.

Per i composti **45a,b** è stato valutato l'andamento dell'attività inibitoria sulla linea cellulare K562 alla concentrazione di 10 μ M in funzione del tempo. Il grafico di seguito riportato mostra che l'attività inibitoria del **45a** aumenta tra le 4 e le 72 ore mentre quella del **45b** raggiunge il picco massimo a 4 ore, diminuisce tra le 4 e le 48 ore per poi mantenersi costante (Fig. 21).

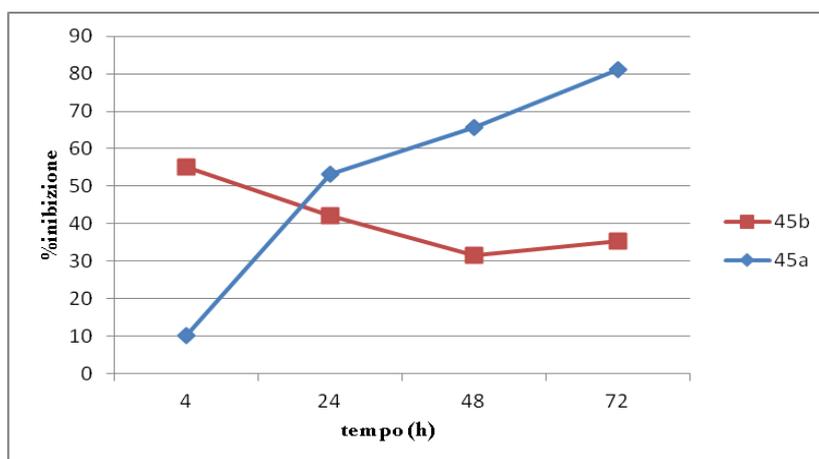


Figura 21. Andamento della percentuale di inibizione di crescita cellulare nel tempo sulla linea cellulare K562 per i composti **45a,b** a 10 μ M.

L'NCI ha eseguito un test di tossicità acuta in vivo sul composto **34e** per la determinazione della MTD (maximum tolerated dose). Il test prevede una singola somministrazione per animale per via intraperitoneale del composto in soluzione in DMSO su tre topi alle dosi di 400, 200 e 100 mg/Kg. Segue un periodo di osservazione di due settimane in cui si valuta l'eventuale insorgenza di reazioni di tossicità; in caso positivo segue l'abbattimento dell'animale. Come si evince dal report di seguito riportato, per il composto **34e** il test non ha provocato mortalità per nessun animale anche alla dose più alta (Tabella 18).

EXPERIMENT: AAZ-770 / 0 / SB			TUMOR: NO CELLS			HOST: Athymic Nudes	
MEMO NO:			SOURCE/LINE: 0			SOURCE: APA	
BOOK NO:			IMPLANT SITE: 0			SEX: F	
TREATMENT							
Grp	NSC	Dose/Units	Rt.	Schedule	Death Days	Surv/Total Day 16	
7	S765771	100.00 mg/kg/dose	IP	QD X 1, Day 0	--	1/1	
8	S765771	200.00 mg/kg/dose	IP	QD X 1, Day 0	--	1/1	
9	S765771	400.00 mg/kg/dose	IP	QD X 1, Day 0	--	1/1	
VEHICLES							
Grp 7	→	NSC # S765771 / 2 (Dose = 100.00)		: in 100% DMSO		(Soluble - no visible particles)	
Grp 8	→	NSC # S765771 / 2 (Dose = 200.00)		: in 100% DMSO		(Soluble - no visible particles)	
Grp 9	→	NSC # S765771 / 2 (Dose = 400.00)		: in 100% DMSO		(Soluble - no visible particles)	
NOTE: All treatment was administered according to exact body weight.							

Tabella 18. Report sul test di tossicità acuta in vivo per il composto **34e**.

Sul **34e** verrà condotto un test di valutazione del suo effetto sul ciclo cellulare, e in base ai risultati verranno programmati ulteriori studi.

PARTE SPERIMENTALE

Chimica

L'andamento delle reazioni è stato monitorato tramite TLC su gel di silice (Merck 60, F₂₅₄, 0.2mm). Le soluzioni organiche sono state rese anidre con Na₂SO₄. L'evaporazione si riferisce alla rimozione del solvente al rotavapor a pressione ridotta. I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi 530 e non sono corretti. Gli spettri IR sono stati registrati in KBr o in nujol con uno spettrofotometro Perkin Elmer Spectrum RXI FT-IR. Gli spettri ¹H-NMR a 300 MHz sono stati ottenuti usando uno spettrometro Bruker Avance 300 MHz (TMS come standard interno): i valori di chemical shifts sono espressi in δ (ppm). Gli spettri di massa a 70 eV sono stati ottenuti usando uno spettrometro Autospec Ultima Orthogonal T.O.F.T. (Micromass) o un GC-MS Varian Star

3400cx Saturn III. Per la cromatografia flash è stato utilizzato gel di silice Merck (Kiesegel 60/230-400 mesh). Le rese si riferiscono ai prodotti purificati dopo una cristallizzazione. Le reazioni condotte con l'ausilio delle microonde sono state realizzate con l'uso di un forno MONOWAVE 300 Anton Parr.

PRIMA PARTE

4-(4-metilbenzoil)-5-(p-toluil)isossazolo-3-etilcarbossilato **(7c)**

Ad una sospensione energicamente agitata di 2.41 g (0.062 moli) di sodio amide in 46.5 mL di etere etilico anidro vengono aggiunti goccia a goccia 8.3 ml (8.3 g, 0.062 moli) di 4-metilacetofenone sciolti in 8.3 ml di etere etilico anidro a temperatura ambiente seguiti dopo 15' da 19.8 ml (20 g, 0.12 moli) di 4-metilbenzoato d'etile sciolti in 31 ml di etere etilico anidro. La miscela è stata lasciata a reagire a refluxo in bagno ad acqua per 2h. Dopo

raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata rapidamente filtrata, dando 13.33 g (0.049 moli) di solido **5c**. Ad una sospensione del solido **5c** così ottenuto in 350 mL di etanolo anidro, si fa gocciolare lentamente una soluzione etanolica di 7.37 g (0.049 moli) del cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 5°C e 10°C. Si lascia una notte a temperatura ambiente, si distilla il solvente al rotavapor, si riprende il residuo con acqua e si estrae con etere etilico. La fase organica è stata seccata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco al rotavapor per dare 15 g di un olio. 6.36 g di quest'olio sono stati cromatografati seguendo la procedura per la cromatografia flash [35]: diametro esterno della colonna: 5.4 cm; eluente: acetato d'etile/etere di petrolio (p.e. 40-60°C) (1:9 v/v) (3.5L). Sono state raccolte 50 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune delle quali sono state utilizzate per l'isolamento dei composti:

Frazioni 1→14, 1.31 g di **15c**

Frazioni 28→38, 1.78 g di **7c**

Resa: 19.6%. P.f.: 123-125°C. MS (m/z) 350; IR (KBr) (cm⁻¹) 1668-1732 (2XCO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.15 (3H, t, CH₃); 2.34 (3H, s, CH₃); 2.39 (3H, s, CH₃); 4.20-4.27 (2H, q, CH₂); 7.16-7.77 (8H, un set di segnali, 2XC₆H₄).

4-(4-metilbenzoil)-5-fenilisossazolo-3-etilcarbossilato (7d)

Ad una sospensione di 1.06 g (4.08 mmoli) del sale sodico dell'1-fenil-3-(*p*-tolil)-propan-1,3-dione preparato secondo letteratura [11] in 28.5 mL di etanolo anidro, si fa gocciolare lentamente una soluzione etanolica di 0.62 g (4.09 mmoli) del cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 5°C e 10°C. Si lascia una notte a temperatura ambiente, si distilla il solvente al rotavapor, si riprende il residuo con acqua e si estrae con etere etilico. La fase organica è stata seccata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco al rotavapor per dare 1.31 g di un olio. Quest'ultimo è stato cromatografato seguendo la procedura per la cromatografia

flash [35]: diametro esterno della colonna: 5.4 cm; eluente: acetato d'etile/etere di petrolio (p.e. 40-60°C) (1:9 v/v) (3L). Sono state raccolte 43 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune delle quali sono state utilizzate per l'isolamento dei composti:

Frazioni 1→12, 0.35 g **15d**

Frazioni 23→31, 0.45 g **7d**

Resa: 33%. P.f.: 74-80°C (Etere etilico/Etere di petrolio 40-60°C. IR (KBr) (cm^{-1}) 1671-1731 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.13 (3H, t, CH_3); 2.34 (3H, s, CH_3); 4.20-4.25 (2H, q, CH_2); 7.17-7.84 (9H, un set di segnali, C_6H_5 e C_6H_4).

4-(Furan-2-carbonil)-5-fenilisossazolo-3-etilcarbossilato
(7e)

Ad una sospensione energicamente agitata di 1.7 g (0.04 moli) di sodio amide in 33 mL di etere etilico anidro vengono aggiunti goccia a goccia 5.2 ml (5.36 g, 0.04 moli) di acetofenone sciolti in 5.5 ml di etere etilico anidro a

temperatura ambiente seguiti dopo 15' da 3 g (0.02 moli) di 2-furoato d'etile sciolti in 10 ml di etere etilico anidro. La miscela è stata lasciata a reagire a refluxo in bagno ad acqua per 2h. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata rapidamente filtrata, dando 3.8 g (0.016 moli) di solido **5e**. Ad una sospensione del solido **5e** così ottenuto in 113 mL di etanolo anidro, si fa gocciolare lentamente una soluzione etanolica di 2.4 g (0.016 moli) del cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 5°C e 10°C. Si lascia una notte a temperatura ambiente, si distilla il solvente al rotavapor, si riprende il residuo con acqua e si estrae con etere etilico. La fase organica è stata seccata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco al rotavapor per dare 3.12 g di un olio. 2.15g di quest'olio sono stati cromatografati seguendo la procedura per la cromatografia flash [35]: diametro esterno della colonna: 5.4 cm; eluente: acetato d'etile/etere di petrolio (p.e. 40-60°C) (1:9 v/v) (2.5 L) e (2:8 v/v) (1L). Sono state raccolte 46 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune

delle quali sono state utilizzate per l'isolamento dei composti:

Frazione 5→6, 540 mg di **15e** unitario

Frazioni 22→31, 390 mg di **7e**

Resa: 4.3%. P.f.: 74-75°C. MS (m/z) 311. IR (KBr) (cm^{-1}) 1652-1728 (2XCO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.24 (3H, t, CH_3); 4.28-4.35 (2H, q, CH_2); 6.55-7.82 (8H, un set di segnali, C_6H_5 e $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}$).

4-(Furan-2-carbonil)-5-(p-tolil)isossazolo-3etilcarbossilato
(7f)

Ad una sospensione di 2.01 g (8 mmoli) del sale sodico dell'1-(Furan-2-il)-3-(p-tolil)-propan-1,3-dione **5f** preparato secondo letteratura [22] in 55 mL di etanolo anidro, si fa gocciolare lentamente una soluzione etanolica di 1.2 g (8 mmoli) del cloro(idrossimino)-acetato d'etile **4** sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 5°C e 10°C. Si lascia una notte a temperatura ambiente, si distilla

il solvente al rotavapor, si riprende il residuo con acqua e si estrae con etere etilico. La fase organica è stata seccata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco al rotavapor per dare 2.4 g di un olio. Quest'ultimo è stato cromatografato seguendo la procedura per la cromatografia flash [35]: diametro esterno della colonna: 5.4 cm; eluente: acetato d'etile/cicloesano (1:9 v/v) (2 L). Sono state raccolte 40 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune delle quali sono state utilizzate per l'isolamento dei composti:

Frazioni 1→8, 0.2 g di **15f**

Frazioni 28→33, 0.35 g **7f**

Resa: 13.5%. P.f.: 76-82°C. ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.23 (3H, t, CH₃); 2.37 (3H, s, CH₃); 4.26-4.34 (2H, q, CH₂); 6.54-7.71 (7H, un set di segnali, C₄H₃O e C₆H₄).

3,4-di-p-tolilisossazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one (8c)

A 0.2 g (0.57 mmoli) di 4-(4-metilbenzoil)-5-(p-toluil)isossazolo-3-etilcarbossilato **7c** sciolti in poco etanolo 95% vengono aggiunti 31.5 μL di idrazina idrata

80%. La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione e l'andamento di reazione è stato monitorato tramite TLC. Sono stati aggiunti ulteriori 16 μL e 31.5 μL di idrazina idrata 80% rispettivamente dopo 5h e 11h di riflusso. Dopo ulteriori 3h di riflusso la TLC della miscela di reazione evidenziava la scomparsa del composto di partenza. Dopo raffreddamento nella miscela di reazione sono stati filtrati 0.095 g di un solido bianco unitario alla TLC.

Resa: 52%. P.f.: 256-258°C (Etanolo). IR (KBr) (cm^{-1}) 1683 (CO), 3172 (NH); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 2.36 (6H, s, 2XCH₃); 7.03-7.20 (8H, un set di segnali, 2XC₆H₄); 10.30 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH). $^{13}\text{CNMR}$ (DMSO) (δ): 20.88 (CH₃); 21.11 (CH₃); 108.90 (C); 122.38 (C); 127.94 (2XCH); 128.51 (2XCH); 128.64 (2XCH); 129.04 (2XCH); 130.94 (C); 139.49 (C); 141.73 (C); 143.40 (C); 152.25 (C); 153.56 (C); 170.21 (CO).

3-Fenil-4-(p-tolil)isossazolo[3,4-d]piridazion-7(6H)-one

(8d)

A 0.25 g (0.75 mmoli) di 4-(4-metilbenzoil)-5-fenilisossazolo-3-etilcarbossilato **7d** sciolti in poco etanolo 95% vengono aggiunti 0.1 mL di idrazina idrata 80%. La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione e l'andamento di reazione è stato monitorato tramite TLC. Dopo 3h di riflusso la TLC della miscela di reazione ha evidenziato la scomparsa del composto di partenza. Dopo raffreddamento nella miscela di reazione sono stati filtrati 0.120 g di un solido bianco unitario alla TLC.

Resa: 52.8%. P.f.: 218-220°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm^{-1}) 1707 (CO), 3177 (NH); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) (δ) 2.28 (3H, s, CH_3); 7.02-7.49 (9H, un set di segnali, C_6H_5 e C_6H_4); 12.81 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH). $^{13}\text{CNMR}$ (DMSO) (δ): 20.73 (CH_3); 109.93 (C); 125.49 (C); 128.06 (CH); 128.14 (CH); 128.21 (CH); 128.31 (CH); 128.50

(CH); 128.74 (CH); 129.10 (CH); 129.27 (CH); 131.13 (CH); 138.78 (C); 141.49 (C); 142.16 (C); 152.71 (C); 152.33 (C); 169.47 (CO).

4-(furan-2-il)-3-fenilisossazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one
(8e)

A 0.3 g (0.97 mmoli) di 4-(Furan-2-carbonil)-5-fenilisossazolo-3-etilcarbossilato **7e** sciolti in poco etanolo 95% vengono aggiunti 53 µL di idrazina idrata 80%. La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione e l'andamento di reazione è stato monitorato tramite TLC. Sono stati aggiunti ulteriori 26.5 µL di idrazina idrata 80% dopo 5h di riflusso. Dopo ulteriori 6h di riflusso la TLC della miscela di reazione ha evidenziato la scomparsa del composto di reazione. La miscela di reazione portata a secco per distillazione a pressione ridotta è stata ricristallizzata da metanolo/acqua dando 0.036 g di un solido giallo.

Resa: 13.4%. P.f.: 198-200°C (Metanolo/acqua). IR (KBr) (cm⁻¹) 1686 (CO), 3172 (NH); ¹H-NMR (DMSO) (δ) 6.56-7.61 (8H, un set di segnali, C₆H₅ e C₄H₃O); 12.91 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH). ¹³CNMR (DMSO) (δ): 109.87 (C); 111.48 (CH); 112.30 (CH); 126.68 (C); 129.02 (2XCH); 129.37 (2XCH); 131.96 (C); 133.61 (CH); 144.43 (CH); 147.78 (C); 153.09 (C); 153.86 (C); 169.94 (CO).

4-(Furan-2-il)-3-(p-tolil)isossazolo[3,4-d]piridazion-7(6H)-one (8f)

A 0.3 g (0.92 mmoli) di 4-(Furan-2-carbonil)-5-(p-tolil)isossazolo-3-etilcarbossilato **7f** sciolti in poco etanolo 95% vengono aggiunti 50.7 μL di idrazina idrata 80%. La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione e l'andamento di reazione è stato monitorato tramite TLC. Sono stati aggiunti ulteriori 26 μL di idrazina idrata 80% dopo 5h. Dopo ulteriori 6h di riflusso la TLC della miscela di reazione evidenziava la scomparsa del composto di partenza. La miscela di reazione, dopo allontanamento del

solvente per distillazione a pressione ridotta, è stata cromatografata seguendo la procedura per la cromatografia flash [35]: diametro esterno della colonna: 3.5 cm; eluente: acetato d'etile/cicloesano (6:4 v/v) (1L). Sono state raccolte 13 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune delle quali sono state utilizzate per l'isolamento del composto **8f**:

Frazioni 4→6, 0.07 g **8f** come solido bianco unitario alla TLC

Resa: 25.9%. P.f.: 204-210°C (etanolo). IR (KBr) (cm^{-1}) 1690 (CO), 3113 (NH); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) (δ) 2.39 (3H, s, CH_3); 6.57-7.46 (7H, un set di segnali, C_6H_4 e $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}$); 12.88 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH). $^{13}\text{CNMR}$ (DMSO) (δ): 21.08 (CH_3); 108.98 (C); 111.01 (CH); 111.79 (CH); 123.34 (C); 128.73 (2XCH); 129.12 (2XCH); 133.18 (C); 141.68 (C); 144.01 (CH); 147.31 (C); 152.59 (C); 153.38 (C); 169.54 (CO).

N,3,4-trifenilisossazolo[3,4-d]piridazin-7-amina (17)

Una sospensione di 0.2 g (0.7 mmol) del 3,4-difenil-isossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 2.4 mL di ossicloruro di fosforo è stata posta a riflusso sotto agitazione per 17 ore. La miscela di reazione è stata distillata a pressione ridotta per allontanare l'ossicloruro di fosforo in eccesso; il residuo è stato sciolto in 4 mL di etanolo anidro e ad esso sono stati aggiunti 3.2 mL (3.27 g, 35 mmol) di anilina e 0.18 mL (0.132 g, 1.3 mmol) di trietilammina. La miscela così composta è stata messa a riflusso sotto agitazione per 20 h, poi portata a secco per distillazione a pressione ridotta [36]. Si ottiene un olio marrone dal quale si separano per cristallizzazione da etanolo 0.18 g di composto **17**.

Resa: 70%; P.f.: 185-188°C . IR (Nujol) (cm⁻¹) 3396 (NH); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 7.14-7.44 (15H, un set di segnali, 3XC₆H₅); 8.04 (1H, NH). ¹³CNMR (CDCl₃) (δ): 120.12 (2XCH); 121.18 (CH); 123.66 (2XCH); 126.10 (CH); 128.29 (C); 128.41 (2XCH); 129.07 (2XCH); 129.16

(2XCH); 129.47 (CH); 129.70 (2XCH); 131.55 (C); 132.52 (C); 138.71 (C); 144.58 (C); 147.12 (C); 149.73 (C); 169.54 (C).

*6-Metil-3,4-difenilisossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one*
(18a)

Alla soluzione di 0.1 g (0.35 mmol) del 3,4-difenilisossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 1.1 ml di N,N-dimetilformammide anidra sono stati aggiunti 0.1 g (0.7 mmol) di carbonato di potassio anidro. Dopo 20' di agitazione sono stati aggiunti alla miscela di reazione 0.044 ml (0.7 mmol) di Iodometano.

Dopo 24h di agitazione a temperatura ambiente, per aggiunta di acqua distillata si separa un solido bianco che viene isolato per filtrazione a pressione ridotta, con l'ottenimento di 0.061 g del **18a** unitario [37].

Resa: 57.1%. P.f.: 155-160°C. IR (KBr) (cm⁻¹) 1683 (CO);
¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 3.88 (3H, s, CH₃); 7.18-7.44 (10H, un

set di segnali, 2XC₆H₅). ¹³C-NMR (CDCl₃) (δ): 38.56 (CH₃); 109.84 (C); 125.65 (C); 128.32 (2XCH); 128.52 (2XCH); 129.45 (2XCH); 129.74 (2XCH); 131.43 (2XCH); 133.81 (C); 142.16 (C); 152.75 (C); 153.03 (C); 170.16 (CO).

6-Etil-3,4-difenilisossazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one
(18b)

Alla soluzione di 0.1 g (0.35 mmol) del 3,4-difenil-isossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 1.1 ml di N,N-dimetilformammide anidra sono stati aggiunti 0.1 g (0.7 mmol) di carbonato di potassio anidro. Dopo 20' di agitazione sono stati aggiunti alla miscela di reazione 0.05 ml (0.7 mmol) di Bromoetano.

Dopo 24h di agitazione a temperatura ambiente, per aggiunta di acqua distillata si separa un solido bianco che viene isolato per filtrazione a pressione ridotta, con l'ottenimento di 0.11 g del **18b** unitario.

Resa: 100%. P.f.: 158-160°C; IR (KBr) (cm⁻¹) 1671 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.46 (3H, t, CH₃); 4.29-4.36 (2H, q, CH₂); 7.20-7.41 (10H, un set di segnali, 2XC₆H₅). ¹³C-NMR (CDCl₃) (δ): 13.68 (CH₃); 45.55 (CH₂); 109.75 (C); 125.74 (C); 128.30 (CH); 128.47 (2XCH); 128.56 (2XCH); 129.46 (CH); 129.66 (2XCH); 131.37 (2XCH); 134.05 (C); 142.15 (C); 152.52 (C); 152.98 (C); 169.96 (CO).

6-Propil-3,4-difenilisossazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one
(18c)

Alla soluzione di 0.1 g (0.35 mmol) del 3,4-difenil-isossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 1.1 ml di N,N-dimetilformammide anidra sono stati aggiunti 0.1 g (0.7 mmol) di carbonato di potassio anidro. Dopo 20' di agitazione sono stati aggiunti alla miscela di reazione 0.07 ml (0.7 mmol) di Iodopropano.

Dopo 24h di agitazione a temperatura ambiente, per aggiunta di acqua distillata si separa un solido giallino che viene isolato per filtrazione a pressione ridotta, con l'ottenimento di 0.09 g del **18c** unitario [37].

Resa: 77%. P.f.: 148-150°C. IR (KBr) (cm^{-1}) 1671 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.02 (3H), t, CH_3); 1.86-1.98 (2H, sestetto, CH_2), 4.23 (2H, t, CH_2); 7.18-7.41 (10H, un set di segnali, $2\text{XC}_6\text{H}_5$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (δ): 11.20 (CH_3); 21.81 (CH_2); 51.85 (CH_2); 109.69 (C); 125.76 (C); 128.30 (2XCH); 128.47 (2XCH); 128.57 (2XCH); 129.47 (2XCH); 129.65 (CH); 131.36 (CH); 134.00 (C); 141.92 (C); 152.75 (C); 152.96 (C); 169.93 (CO).

*6-Butil-3,4-difenilisossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one*
(18d)

Alla soluzione di 0.1 g (0.35 mmol) del 3,4-difenilisossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 1.1 ml di N,N-dimetilformammide anidra sono stati aggiunti 0.1 g (0.7 mmol) di carbonato di potassio anidro. Dopo 20' di agitazione sono stati aggiunti alla miscela di reazione 0.08 ml (0.7 mmol) di Iodobutano.

Dopo 24h di agitazione a temperatura ambiente, per aggiunta di acqua distillata si separa un solido giallino che

viene isolato per filtrazione a pressione ridotta, con l'ottenimento di 0.105 g del **18d** unitario [37].

Resa: 86%. P.f.: 92-98°C. IR (KBr) (cm^{-1}) 1687 (CO); ^1H -NMR (CDCl_3) (δ) 0.98 (3H, t, CH_3); 1.39-1.51 (2H, m, CH_2); 1.82-1.92 (2H, m, CH_2); 4.27 (2H, t, CH_2); 7.20-7.41 (10H, un set di segnali, $2\text{XC}_6\text{H}_5$). ^{13}C -NMR (CDCl_3) (δ): 13.81 (CH_3); 19.96 (CH_2); 30.55 (CH_2); 50.12 (CH_2); 109.68 (C); 125.76 (C); 128.30 (CH); 128.47 (2XCH); 128.58 (2XCH); 129.47 (2XCH); 129.65 (CH); 131.37 (2XCH); 134.01 (C); 141.90 (C); 152.70 (C); 152.97 (C); 169.92 (CO).

6-Metil-3,4-di-p-tolilisossazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one (19) e *N-metil-4-(4-metilbenzoil)-5-(p-tolil)isossazolo-3-carboidrazide (20)*

A 0.3 g (0.57 mmoli) di **7c** sciolti in poco etanolo 95% vengono aggiunti 0.14 mL di metilidrazina. La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione e

l'andamento di reazione è stato monitorato tramite TLC. Sono stati aggiunti ulteriori 35 μ L di metilidrazina dopo 12h. Dopo ulteriori 3h di riflusso la TLC della miscela di reazione evidenziava la scomparsa del composto di partenza. La miscela di reazione, dopo allontanamento del solvente per distillazione a pressione ridotta, è stata cromatografata seguendo la procedura per la cromatografia flash [35]: diametro esterno della colonna: 4.5 cm; eluente: acetato d'etile/cicloesano (4:6 v/v) (2 L). Sono state raccolte 28 frazioni (ognuna di 50 mL) alcune delle quali sono state utilizzate per l'isolamento dei composti:

Frazioni 5→6, 0.07 g di **19**

Frazioni 8→10, 0.07 g di **20**

19

Resa: 37.1%. P.f.: 128-130°C (etanolo). IR (KBr) (cm^{-1}) 1683 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 2.36 (6H, s, 2XCH₃); 2.85 (3H, s, CH₃); 7.05-7.19 (8H, un set di segnali, 2XC₆H₄). $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) (δ): 21.33 (CH₃); 21.56 (CH₃);

38.48 (CH₃); 109.46 (C); 123.01 (C); 128.45 (2XCH);
128.97 (2XCH); 129.13 (2XCH); 129.45 (2XCH); 131.24
(C); 139.87 (C); 142.09 (C); 142.38 (C); 152.81 (C); 153.11
(C); 170.30 (CO).

20

Resa: 35.1%. P.f.: 145-147°C (etere dietilico). IR (KBr) (cm⁻¹) 3297-3416 (NH₂), 1635-1651 (2XCO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 2.17 (3H, s, CH₃); 2.24 (3H, s, CH₃); 3.89 (3H, s, CH₃); 6.45 (2H, s, scambiabile con D₂O, NH₂); 6.89-7.41 (8H, un set di segnali, 2XC₆H₄).

4-Ammino-5-benzoil-6-fenilpiridazin-3(2H)-one (22)

Ad una sospensione di 0.056 g di Raney Ni preparato secondo letteratura [38] in 2.8 ml di metanolo sono stati aggiunti 0.2 g (0.7 mmol) di 3,4-difenil-isossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** e 0.56 ml di idrazina idrata soluzione acquosa 80%. La miscela viene tenuta sotto agitazione per 24 ore. Dopo allontanamento del

catalizzatore per filtrazione, si distilla il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene ricristallizzato da etanolo [39].

Resa: 10%. P.f.: 210-213°C (etanolo). IR (Nujol) (cm^{-1}) 3423 (NH o NH_2 , segnale allargato), 3277 (NH o NH_2 , segnale allargato), 1633-1656 (2XCO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 6.74 (2H, s, NH_2 , scambiabile con D_2O); 7.07-7.46 (10H, un set di segnali, 2XC₆H₅); 11.65 (1H, s, NH, scambiabile con D_2O).

5-Benzoil-4-nitro-6-fenilpiridazin-3(2H)-one (23) e *3,4-difenil-2H-pirazolo[3,4-d]piridazin-7(6H)-one (24)*

Ad una sospensione di 0.2 g (0.7 mmol) di 3,4-difenil-isossazolo[3,4-*d*]piridazin-7(6*H*)-one **1** in 5.8 mL di acido acetico 50% e 1.2 mL di acido nitrico 14.4 M sono stati aggiunti in piccole porzioni 2.6 g di cerio ammonio nitrato nell'arco di 30' ad una temperatura compresa tra 65°-85°C [13]. Dopo 20 ore di agitazione alla stessa temperatura alla miscela è stato aggiunto ghiaccio ed estratto con acetato

d'etile ottenendo 0.16 g di un olio giallo (composto **23** grezzo). A questo vengono aggiunti 8 ml di etanolo e 0.09 mL (0.075 g, 1.5 mmol) di soluzione acquosa di idrazina idrata 80%. La miscela di reazione viene tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2h, il solvente viene allontanato per distillazione a pressione ridotta e il residuo ricristallizzato da etanolo dando 0.08g (0.28 mmol) del composto **24**.

23

P.f.: 153-154°C (etanolo) . ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 7.51-8.07 (10H, un set di segnali, 2XC₆H₅); 7.54 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH). ¹³CNMR (CDCl₃) (δ): 29.72 (C); 86.26 (C); 118.53 (C); 128.62 (4XCH); 128.94 (4XCH); 133.66 (2XCH); 133.92 (2XC); 193.56 (2XCO).

24

Resa: 40%. P.f.: 226-230°C (etanolo). IR (KBr) (cm⁻¹) 3190 (NH, segnale allargato), 1692 (CO). ¹H-NMR (DMSO) (δ)

7.23-7.36 (10H, un set di segnali, 2XC₆H₅); 7.47 (1H, s, NH); 12.83 (1H, s, NH, scambiabile con D₂O). ¹³CNMR (DMSO) (δ): 110.52 (C); 125.98 (C); 128.59 (CH); 128.75 (2XCH); 128.87 (2XCH); 129.74 (2XCH); 129.79 (2XCH); 131.84 (CH); 134.46 (C); 142.80 (C); 153.27 (C); 153.93 (C); 170.10 (CO).

SECONDA PARTE

Triazenil-indazolo-carbossamidi 34a-o e 45a-g

Ad una soluzione/sospensione del triazenil-indazolo **32a-g**, **33a-d** in THF (0,55 mmol in 1,5 ml) è stata aggiunta a temperatura ambiente, facendo gocciolare lentamente, la quantità equimolare dell'opportuno isocianato **46** sciolto in poco THF. La miscela è stata agitata alla stessa temperatura per 24 h, al termine delle quali l'andamento della reazione è stato monitorato tramite TLC. Qualora dopo tale tempo nella miscela è risultato ancora presente il triazenil-indazolo non reagito, è stato

aggiunto un ulteriore 25-50% di isocianato **51** lasciando la miscela di reazione ad agitare per altre 24 h. Il prodotto si separa dalla miscela di reazione per filtrazione (**34a-d,f,g,n**), per precipitazione con etere di petrolio 40-60°C (**34i,l; 45b,c**) o per distillazione del solvente a pressione ridotta (**34e,h,m,n,o; 45a,d-g**) e viene ricristallizzato con opportuno solvente.

N-(4-benzilfenil)-6-cloro-3-(3,3-dimetiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossammide (**34a**)

Resa: 35.8%. P.f.: 178-181°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm⁻¹) 3353 (NH), 1718 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 3.39 (3H, s, CH₃); 3.70 (3H, s, CH₃); 3.99 (2H, s, CH₂); 7.20-8.52 (12H, un set di segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo indazolico); 9.00 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-benzilfenil)-5-cloro-3-(3,3-dimetiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossammide (**34b**)

Resa: 46.2%. P.f.: 213-215°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm^{-1}) 3343 (NH), 1714 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 3.34 (3H, s, CH_3); 3.67 (3H, s, CH_3); 3.96 (2H, s, CH_2); 7.18-8.38 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 e nucleo indazolico); 8.98 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH).

N-(4-benzilfenil)-6-cloro-3-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossammide. (**36c**)

Resa: 42.7%. P.f.: 152-153°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm^{-1}) 3362 (NH), 1715 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.32 (3H, t, CH_3); 1.45 (3H, t, CH_3); 3.89-3.97 (6H, un set di segnali, 3XCH_2); 7.15-8.51 (12H, un set di segnali, C_6H_5 , C_6H_4 e nucleo indazolico); 8.98 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH).

N-(4-benzilfenil)-5-cloro-3-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossammide. (**34d**)

Resa: 42.7%. P.f.: 146-147°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm^{-1}) 3351 (NH), 1722 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.32

(3H, t, CH₃); 1.43 (3H, t, CH₃); 3.89-3.97 (6H, un set di segnali, 3XCH₂); 7.18-8.40 (12H, un set di segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.99 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-benzilfenil)-3-(3,3-dimetiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossamide (**34e**)

Resa: 79.9%. P.f.: 126-128°C (acetato d'etile). IR (Nujol) (cm⁻¹) 3375 (NH), 1704 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 3.35 (3H, s, CH₃); 3.66 (3H, s, CH₃); 3.97 (2H, s, CH₂); 7.18-8.46 (13H, un set di segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo indazolico); 9.05 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-benzilfenil)-6-cloro-3-(pirrolidin-1-il-diazenil)-1H-indazolo-1-carboxamide (**34f**)

Resa: 85%. P.f.: 188-190°C. IR (Nujol) (cm⁻¹) 3352 (NH), 1718 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 2.11 (6H, s, 3XCH₂); 3.97 (2H, s, CH₂); 4.03 (2H, s, CH₂); 7.18-8.47 (12H, un set di

segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.99 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-benzilfenil)-5-cloro-3-(pirrolidin-1-il-diazenil)-1*H*-indazolo-1-carbossammide (**34g**)

Resa: 60%. P.f.: 199-201°C. IR (Nujol) (cm⁻¹) 3340 (NH), 1710 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 2.07 (2H, s, CH₂); 2.11 (2H, s, CH₂); 3.78 (2H, s, CH₂); 4.05 (4H, 2XCH₂); 7.18-8.38 (12H, un set di segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo indazolico); 9.00 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-butossifenil)-6-cloro-3-(3,3-dimetiltriaz-1-en-1-il)-1*H*-indazolo-1-carbossammide (**34h**)

Resa: 80%. P.f.: 153-156°C (acetato d'etile). IR (KBr) (cm⁻¹) 3364 (NH), 1716 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 0.98 (3H, t, CH₃); 1.46-1.53 (2H, m, CH₂); 1.74-1.79 (2H, qt, CH₂); 3.37 (3H, s, CH₃); 3.68 (3H, s, CH₃); 3.96 (2H, t, CH₂); 6.90-8.50 (7H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.90 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-butossifenil)-6-cloro-3-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossamide (**34i**)

Resa: 50%. P.f.: 138-139°C . IR (Nujol) (cm⁻¹) 3369 (NH), 1714 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 0.98 (3H, t, CH₃); 1.32-1.55 (8H, m, 2XCH₃ e CH₂); 1.72-1.81 (2H, qt, CH₂); 3.88-3.98 (6H, m, 3XCH₂); 6.89-8.49 (7H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.91 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-butossifenil)-5-cloro-3-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-1-carbossamide (**34l**)

Resa: 55.7%. P.f.: 108-109°C . IR (Nujol) (cm⁻¹) 3368 (NH), 1718 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 0.98 (3H, t, CH₃); 1.32-1.53 (8H, m, 2XCH₃ e CH₂); 1.74-1.79 (2H, qt, CH₂); 3.92-3.98 (6H, m, 3XCH₂); 6.89-8.40 (7H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.92 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-butossifenil)-6-cloro-3-(pirrolidin-1-ildiazenil)-1*H*-indazolo-1-carbossamide (**34m**)

Resa: 61.3%. P.f.: 176-177°C (etanolo). IR (Nujol) (cm⁻¹) 3376 (NH), 1720 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 0.97 (3H, t, CH₃); 1.45-1.55 (2H, m, CH₂); 1.71-1.80 (2H, m, CH₂); 2.11 (4H, m, 2XCH₂); 3.78 (2H, segnale allargato, CH₂); 3.95 (2H, t, CH₂); 4.03 (2H, segnale allargato, CH₂); 6.88-8.46 (7H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.89 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-(*tert*-butil)fenil)-6-cloro-3-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1*H*-indazolo-1-carbossamide (**34n**)

Resa: 82.5%. P.f.: 98-107°C. IR (Nujol) (cm⁻¹) 3366 (NH), 1707 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.28-1.44 (15H, m, 5XCH₃); 3.92-3.95 (4H, m, 2XCH₂); 7.21-8.50 (7H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.98 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-(*tert*-butil)fenil)-6-cloro-3-(pirrolidin-1-il-diazenil)-
1*H*-indazolo-1-carbossamide (**34o**)

Resa: 66.7%. P.f.: 124-130°C. IR (Nujol) (cm⁻¹) 3364 (NH),
1715 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.31 (9H, s, 3XCH₃); 2.10
(4H, segnale allargato, 2XCH₂); 3.72-3.78 (2H, m, CH₂);
4.03-4.05 (2H, m, CH₂); 7.19-8.47 (7H, un set di segnali,
C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.99 (1H, s, scambiabile con
D₂O, NH).

N-(4-benzilfenil)-5-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1*H*-indazolo-
1-carbossamide (**45a**).

Resa: 46%. P.f.: 92-94°C (etanolo). IR (Nujol) (cm⁻¹) 3345
(NH), 1715 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.28 (6H, t,
2XCH₃); 3.74-3.81 (4H, q, 2XCH₂); 3.96 (2H, s, CH₂);
7.18-8.37 (13H, un set di segnali, C₆H₅, C₆H₄ e nucleo
indazolico); 9.02 (1H, s, scambiabile con D₂O, NH).

N-(4-butossifenil)-5-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1*H*-indazolo-
1-carbossamide (**45b**)

Resa: 38%. P.f.: 82°C (etanolo). IR (Nujol) (cm^{-1}) 3364 (NH), 1718 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 0.97 (3H, t, CH_3); 1.28 (6H, t, 2XCH_3); 1.43-1.55 (2H, m, CH_2); 1.72-1.81 (2H, m, CH_2); 3.74-3.81 (4H, q, 2XCH_2); 3.96 (2H, t, CH_2); 6.89-8.38 (8H, un set di segnali, C_6H_4 e nucleo indazolico); 8.93 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH).

N-(4-(*tert*-butil)fenil)-5-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1*H*-indazolo-1-carbossammide (**45c**)

Resa: 56%. P.f.: 144-145°C (etanolo). IR (Nujol) (cm^{-1}) 3283 (NH), 1694 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 1.26-1.38 (15H, m, 5XCH_3); 3.75-3.82 (4H, q, 2XCH_2); 7.39-8.39 (8H, un set di segnali, C_6H_4 e nucleo indazolico); 9.03 (1H, s, scambiabile con D_2O , NH).

N-(4-benzilfenil)-5-(3,3-dimetiltriaz-1-en-il)-1*H*-indazolo-1-carbossamide (**45d**)

Resa: 38%. P.f.: 138-140°C (etanolo). IR (Nujol) (cm^{-1}) 3376 (NH), 1724 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ) 3.36 (6H, s,

2XCH₃); 3.97 (2H, s, CH₂); 7.19-8.39 (13H, un set di segnali, C₆H₄, C₆H₅ e nucleo indazolico); 9.02 (1H, s, NH).

N-(4-butossifenil)-5-(3,3-dimetiltriaz-1-en-il)-1H-indazolo-1-carbossamide (**45e**)

Resa: 51.8%. P.f.: 99-102°C (etanolo). IR (Nujol) (cm⁻¹) 3373 (NH), 1716 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 0.98 (3H, t, CH₃); 1.46-1.53 (2H, m, CH₂); 1.74-1.79 (2H, m, CH₂); 3.37 (6H, s, 2XCH₃); 3.96 (2H, t, CH₂); 6.90-8.39 (8H, un set di segnali, C₆H₄ e nucleo indazolico); 8.93 (1H, s, NH).

N-(4-benzilfenil)-6-(3,3-dimetiltriaz-1-en-il)-1H-indazolo-1-carbossamide (**45f**)

Resa: 54%. P.f.: 100-102°C (etanolo). IR (Nujol) (cm⁻¹) 3376 (NH), 1719 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 3.41 (6H, segnale allargato, 2XCH₃); 3.98 (2H, s, CH₂); 7.19-8.44 (13H, un set di segnali, C₆H₄, C₆H₅ e nucleo indazolico); 9.04 (1H, s, NH).

N-(4-benzilfenil)-6-(3,3-dietiltriaz-1-en-1-il)-1H-indazolo-
1-carbossammide (**45g**)

Resa: 42.5%. P.f.: 79-81°C (etanolo). IR (Nujol) (cm⁻¹)
3298 (NH), 1715 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) (δ) 1.30 (6H,
segnale non risolto, 2XCH₃); 3.82 (4H, segnale non risolto,
2CH₂); 3.98 (2H, s, CH₂) 7.22-8.43 (13H, un set di segnali,
C₆H₄, C₆H₅ e nucleo indazolico); 9.05 (1H, s, NH).

Parte Biologica

Materiali e Metodi

Colture cellulari

La linea cellulare K562 di leucemia umana è stata fornita dall'ISMETT di Palermo. Le linee cellulari NCI-H460 (tumore solido al polmone), MCF-7 (tumore al seno) e 16HBE (epitelio bronchiale umano) sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia.

Il Siero Bovino Fetale (FBS), streptomina, ampicillina, penicillina e 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) sono prodotti SIGMA-Aldrich. L-glutammina 200mM è un prodotto Biochrom KG.

Le cellule K562 sono state cresciute in fiasche da 75cm² con terreno RPM11640 supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomina - ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.

Le cellule NCI-H460, MCF-7, e 16HBE sono state cresciute su monostrato in fiasche da 75cm² con terreno Minimum

Essential Medium-Eagle (MEM) supplementato con 10% FBS, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomicina-ampicillina a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.

Le sostanze sintetizzate da saggiare sono state disciolte in DMSO per avere una concentrazione finale 10mM.

Saggi di proliferazione cellulare

Le cellule K562 sono state cresciute in micropiastre da 24 pozzetti aggiungendo 1 ml di terreno completo contenente 2×10^5 cellule in assenza e in presenza di inibitori. Gli effetti delle sostanze sulla crescita e vitalità delle cellule sono saggiati su una porzione della sospensione cellulare (100 µl). Il numero delle cellule è stato determinato con un emocitometro (camera di Bürker) e la vitalità è stata stimata, in tempi diversi, mediante esclusione del trypan blu.

I saggi sulla proliferazione delle cellule NCI-H460, MCF-7, e 16HBE invece, sono stati condotti su piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C ad una

concentrazione 2×10^4 cell/pozzetto (in 100 μ l). Dopo 2 giorni il terreno viene sostituito da MEM privo di rosso fenolo (che potrebbe alterare la lettura dello spettrofotometro) e vengono aggiunti i presunti inibitori (a varie concentrazioni, solitamente 10-50-100 μ M). Dopo 24, 48 o 72 h di incubazione a 37°C si aggiunge l'MTT (5mg/ml) a ciascun pozzetto; 4h dopo il formazano prodotto dalle cellule vive viene risospeso in una soluzione di isopropanolo, tritonX-100, HCl 37% (4,5ml- 0,5ml- 150 μ l rispettivamente); la densità ottica (OD570-690) viene quindi paragonata ai pozzetti controllo per saggiare la vitalità cellulare.

Condizioni di coltura delle cellule MDA-MB231

Le cellule di carcinoma mammario umano MDA-MB231 sono state ottenute dall'Istituto Scientifico Tumori (Genova, Italia) e sono coltivate in fiasche da 75 cm² in presenza di terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), addizionato con siero bovino fetale

(FBS) al 10% inattivato al calore (56°C per 30 min), amminoacidi non essenziali (NEA) all'1%, glutamina 2 mM e antibiotico anti-micotico (1%) (miscela di penicillina-streptomina e amfotericina B 0.5%). Le cellule vengono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C in atmosfera umidificata costituita dal 95% di aria e dal 5% di CO₂. Le cellule MDA-MB231 sono una popolazione cellulare molto eterogenea, che cresce adesa al substrato di plastica delle fiasche disponendosi in monostrato.

Per studiare gli effetti dei composti, le cellule sono state staccate dal substrato utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA) e seminate in piastre da 6 pozzetti (2x10⁵ cellule/2 ml di terreno di coltura) o da 96 pozzetti (8 x 10³ cellule/200 µl di terreno di coltura in ogni pozzetto). Le cellule sono state quindi poste in incubatore a 37 °C tutta la notte per favorirne l'adesione al supporto ed in seguito sono state trattate con i composti. Per ogni esperimento sono state condotte delle prove controllo, in cui le cellule sono state

incubate in presenza del solo veicolo in cui sono stati solubilizzati i composti esaminati.

Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT.

La vitalità cellulare è stata studiata mediante saggio colorimetrico impiegando l'MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un sale tetrazolico di colore giallo, che nelle cellule vitali viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali a Formazan, un composto di colore violetto. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali e può essere misurata mediante uno spettrofotometro.

Per valutare la vitalità le cellule MDA-MB231 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ l di terreno di coltura). Dopo 24 ore sono stati effettuati i trattamenti; al termine dell'incubazione con i composti, sono stati aggiunti 20 μ l di MTT (11 mg/ml di PBS) a ciascun pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C,

la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti e sono stati allontanati 190 μ l di terreno. Successivamente sono stati aggiunti 100 μ l di buffer di lisi (20% sodio dodicil solfato in 50% N,N-dimetillformammide, pH 4,7). La piastra è stata posta ad agitare per 10 minuti a 37°C ed è stata eseguita una lettura spettrofotometrica mediante lettore ELISA per piastre da 96 pozzetti (Opsys MR; Dynex technologies, Chantilly, VA), valutando l'assorbanza a 540 nm e 630 nm (lunghezza d'onda di riferimento); come prova di riferimento è stato impiegato il solo buffer di lisi.

Valutazione della vitalità cellulare mediante colorazione con ioduro di propidio (PI).

Lo ioduro di propidio è un colorante fluorescente che penetra esclusivamente nelle cellule che presentano un danno di membrana, come cellule necrotiche o cellule in apoptosi tardiva; viene invece escluso dalle cellule vitali. Quando penetra nella cellula, questo colorante lega il DNA emettendo fluorescenza rossa.

8 x 10³ cellule MDA-MB231 sono state seminate nei pozzetti di una piastra da 96. In seguito al trattamento è stato aggiunto il PI (2 µg/ml di terreno) e le cellule sono state incubate per circa 15 minuti al buio. Infine si è proceduto all'osservazione delle cellule mediante microscopio a fluorescenza Leica DMR, dotato di telecamera DC300F (Wetzlar, Germany), utilizzando un filtro per la rodamina (eccitazione: 596 nm – emissione: 620 nm). Le immagini sono state visualizzate ed acquisite mediante il software Leica Q Fluoro.

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

La distribuzione delle cellule lungo le diverse fasi del ciclo cellulare è stata accertata mediante analisi citofluorimetrica. L'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare consente, oltre alla evidenziazione delle diverse fasi del ciclo, di valutare la frammentazione del DNA. Questo acido nucleico viene marcato con il fluorocromo ioduro di propidio (PI), il quale si intercala nel DNA.

Questa molecola assorbe radiazioni luminose alla lunghezza d'onda di 488 nm, ed emette a 575 nm. Per consentire allo ioduro di propidio di penetrare nel nucleo, le cellule vengono trattate con una soluzione ipotonica, questo trattamento mantiene intatta la membrana nucleare. In una popolazione cellulare eterogenea si ritrovano cellule in diverse fasi del ciclo cellulare e che quindi differiscono per il contenuto di DNA. Le cellule in fase G_0/G_1 possiedono un corredo cromosomico diploide ($2N$). Alla fase G_1 segue la fase S, durante la quale avviene la duplicazione del DNA, quindi le cellule entrano in fase G_2/M . Queste cellule, prima della citodieresi, presentano un quantitativo doppio di DNA (fase tetraploide $4N$). L'intensità della fluorescenza emessa e rilevata al citofluorimetro è proporzionale alla quantità di ioduro di propidio che si intercala nel DNA, la quale a sua volta è correlata alla quantità di acido nucleico presente nelle cellule. Le cellule in fase G_2/M pertanto emettono maggiore fluorescenza rispetto a quelle in fase G_0/G_1 . Le cellule contenenti DNA

frammentato e cromatina condensata, le quali probabilmente sono andate incontro ad un processo apoptotico, incorporano una minore quantità di ioduro di propidio, e quindi emettono meno fluorescenza. Questa frazione di cellule prende il nome di sub-G₀/G₁. Per effettuare l'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare le cellule MDA-MB231 sono state seminate su piastre da sei pozzetti (10⁵/pozzetto in 2 ml di terreno di coltura) e sono state trattate con i composti. Alla fine del trattamento, le cellule sono staccate dalla piastra con una soluzione di tripsina allo 0.5% in PBS e risospese in una soluzione ipotonica di fluorocromo (ioduro di propidio 50 µg/ml, sodio citrato 0.1%, Nonidet P-40 0.1% ed RNasi 100 µg/ml) e incubate al buio, alla temperatura di 4°C per circa due ore. L'analisi citofluorimetrica è stata condotta mediante un citofluorimetro FACSscan (Beckman Coulter Epics XL; Brea, CA, USA) e i dati sono stati elaborati usando il software Expo32. La fluorescenza emessa dalle cellule è

stata analizzata come frequenza di istogrammi di parametri singoli.

Preparazione degli estratti cellulari e separazione mediante SDS-PAGE.

Per preparare gli estratti cellulari le cellule sono state seminate su piastre da sei pozzetti ($2 \times 10^5/2$ ml di terreno di coltura). Dopo il trattamento con i composti, le cellule sono state lavate in PBS, staccate dalla piastra adoperando una soluzione di Tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), prelevate e centrifugate a 120g per 10 min. Successivamente sono state lisate in RIPA buffer (150 μ l/ 10^6 cellule), ed incubate in ghiaccio per 30 min. Il RIPA è un tampone dissociante costituito da NP-40 all'1%, sodio deossicolato allo 0.5% e SDS allo 0.1%. Prima di effettuare la lisi cellulare al RIPA buffer è stata aggiunta una miscela di inibitori delle proteasi, per evitare la degradazione delle proteine (aprotinina 25 μ g/ml, PMSF 1mM, sodio ortovanadato 10mM, fluoruro di sodio 10mM, leupeptina

25µg/ml e pirofosfato di sodio 0.2mM). La completa lisi cellulare è stata quindi ottenuta mediante sonicazione (tre cicli di 10 sec, con intervalli di 5 sec) adoperando un'intensità di 10 REV (Soniprep 150). Successivamente è stato dosato il contenuto proteico, tramite il metodo di Lowry, e sono stati preparati campioni contenenti 60 µg di proteine da sottoporre ad elettroforesi SDS-page. I campioni sono stati quindi trattati con sample buffer 2X (Tris-HCl 50mM, β-mercaptoetanololo 100mM, SDS al 2%, blu di bromofenolo allo 0.1%, glicerolo al 10%, pH finale 6.8) secondo un rapporto di 1:1. Le proteine sono state denaturate per 5 min a 90°C, ed i campioni sono stati caricati nei pozzetti di un gel di poliacrilamide al 10%, accanto ad uno standard costituito da proteine di peso molecolare noto. Infine è stata effettuata una corsa elettroforetica verticale a 150 V per circa 2 h.

Western blotting

Terminato lo scorrimento elettroforetico, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa mediante “elettroblotting” (20V “overnight”), in presenza di transfer buffer (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS allo 0.037%, metanolo al 20%). Per controllare l’avvenuto trasferimento e l’uniformità della quantità di proteine caricate nei pozzetti, il filtro è stato colorato con rosso Ponceau, un colorante che lega reversibilmente le proteine. Dopo avere effettuato una serie di lavaggi con TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.005%, pH 7.5), è stata aggiunta al filtro una soluzione di “blocking” (latte all’1% in TBST), in modo da schermare il filtro e ridurre i legami aspecifici tra le proteine presenti nel filtro e l’anticorpo da impiegare nella successiva fase di “detection”. E’ stata quindi aggiunta una soluzione contenente l’anticorpo primario specifico (1 µg/ml di TBST) ed il filtro è stato mantenuto in incubazione “overnight”.

Gli anticorpi primari adoperati per identificare la forma fosforilata di ATM, la forma fosforilata dell'istone H2AX e la caspasi-2, sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology. Dopo l'incubazione il filtro è stato sottoposto a tre lavaggi in TBST di 10 minuti ciascuno, ed è stato incubato per un'ora in TBST contenente l'anticorpo secondario (diluizione 1:3000) coniugato con la fosfatasi alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Le bande sono state evidenziate mediante l'aggiunta dei substrati della fosfatasi alcalina: BCIP o 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (16.5 μ l) ed NBT o nitroblue di tetrazolio (33 μ l) in 5 ml di AP buffer, costituito da Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8.9. La fosfatasi agisce sui substrati, causando la formazione di colore blue-viola in corrispondenza della banda in cui è localizzata la proteina bersaglio.

L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stato accertato mediante colorazione del filtro con rosso Ponceau.

Analisi di dicroismo circolare

Sono stati registrati spettri di dicroismo circolare (CD) di DNA nativo di timo di vitello 50 μM in soluzione acquosa tamponata a pH neutro con Tris-HCl 1 mM, utilizzando uno spettropolarimetro JASCO J-715 e cuvette in quarzo dal cammino ottico di 1 cm. I composti **1** e **8c** sono stati inizialmente sciolti in DMSO ed aggiunti in quantità crescenti direttamente nelle cuvette contenenti il DNA in soluzione. La percentuale di DMSO aggiunta non ha mai superato il 3% [40].

Bibliografia

- [1] T.H. Keller, A. Pichota, Z. Yin, A practical view of “druggability,” *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 357–361.
- [2] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 3–26.
- [3] G. Renzi, V. Dal Piaz, Ricerche su alcuni 3-carbetossi-isossazoli-4,5-disostituiti, *Gazz. Chim. It.* 95 (1965) 1478–1491.
- [4] G. Renzi, S. Pinzauti, Nuovi derivati del sistema isossazolo-[3,4-d]-piridazin-7-one, *Farm. Ed Sci.* 24 (1969) 885–892.
- [5] H. Marchueta, M. Serra, New Process for Preparing 3-Methyl-4-Phenylisoxazolo[3,4-D]pyridazin-7(6h)-One, WO2008107064 (A1), 2008.
- [6] V. Dal Piaz, G. Ciciani, M. Paola Giovannoni, Reductive Cleavage of Isoxazolo[3,4-d]pyridazinones: A Synthetic Approach to Various 4,5-Functionalized 3(2H)-Pyridazinones, *Heterocycles.* 32 (1991) 1173–1179.
- [7] V. Sprio, E. Aiello, D. Mazza, Studi sugli eterocicli azotati. Idrogenazione di isossazol-[3,4-d]piridazin-7-oni, di isossiazol-[3,4-d]piridazin-7-oni e di isossiazol-[3,4-d]piridazin-4-7-dioni, *Ann. Chim.* 57 (1967) 836–845.
- [8] M.P. Giovannoni, C. Vergelli, C. Ghelardini, N. Galeotti, A. Bartolini, V. Dal Piaz, [(3-Chlorophenyl)piperazinylpropyl]pyridazinones and analogues as potent antinociceptive agents, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1055–1059.
- [9] L. Zhou, J. Haorah, S.C. Chen, X. Wang, C. Kolar, T.A. Lawson, et al., Nitrosation of glycine ethyl ester and ethyl diazoacetate to give the alkylating agent and mutagen ethyl

- chloro(hydroximino)acetate, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 416–423.
- [10] S.R. Harris, R. Levine, The Synthesis of Certain β -Diketones Containing a Furan Nucleus, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 1120–1121.
- [11] S.R. Harris, R. Levine, The Synthesis of Acyl-2-thenoylmethanes by the Alkali Amides, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 3360–3361.
- [12] J.M. Sprague, L.J. Beckham, H. Adkins, Preparation of 1,3-Diketones by the Claisen Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 2665–2668.
- [13] V. Dal Piaz, M.P. Giovannoni, C. Castellana, J.M. Palacios, J. Beleta, T. Doménech, et al., Novel Heterocyclic-Fused Pyridazinones as Potent and Selective Phosphodiesterase IV Inhibitors, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1417–1421.
- [14] R.T. Abraham, Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases, *Genes Dev.* 15 (2001) 2177–2196.
- [15] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42462–42467.
- [16] M. Kurokawa, S. Kornbluth, Caspases and Kinases in a Death Grip, *Cell.* 138 (2009) 838–854.
- [17] L. Bouchier-Hayes, D.R. Green, Caspase-2: the orphan caspase, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 51–57.
- [18] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renciuk, M. Vorlícková, Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1713–1725.
- [19] L.-J. Huang, M.-L. Shih, H.-S. Chen, S.-L. Pan, C.-M. Teng, F.-Y. Lee, et al., Synthesis of N²-(substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl)indazoles as novel anti-angiogenic agents, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 528–536.

- [20] L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Léonce, B. Pfeiffer, E.M. Rakib, M. Khouili, et al., Synthesis and biological evaluation of N-(7-indazolyl)benzenesulfonamide derivatives as potent cell cycle inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1078–1088.
- [21] Y. Dai, K. Hartandi, Z. Ji, A.A. Ahmed, D.H. Albert, J.L. Bauch, et al., Discovery of N-(4-(3-Amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-Aminoindazole-Based Orally Active Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 1584–1597.
- [22] T. Yakaiah, B.P.V. Lingaiah, B. Narsaiah, B. Shireesha, B. Ashok Kumar, S. Gururaj, et al., Synthesis and structure–activity relationships of novel pyrimido[1,2-b]indazoles as potential anticancer agents against A-549 cell lines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 3445–3453.
- [23] M. Fanciulli, A. Valentini, T. Bruno, G. Citro, G. Zupi, A. Floridi, Effect of the antitumor drug lonidamine on glucose metabolism of adriamycin-sensitive and -resistant human breast cancer cells, *Oncol. Res.* 8 (1996) 111–120.
- [24] G. Daidone, S. Plescia, D. Raffa, D. Schillaci, B. Maggio, F. Benetollo, et al., Synthesis, Crystallographic Studies and Biological Evaluation of Some 2-Substituted 3-Indazolyl-4(3H)-quinazolinones and 3-Indazolyl-4(3H)-benzotriazinones, *Heterocycles.* 43 (1996) 2385–2396.
- [25] D. Raffa, G. Daidone, B. Maggio, D. Schillaci, F. Plescia, Synthesis and antiproliferative activity of novel 3-(indazol-3-yl)-quinazolin-4(3H)-one and 3-(indazol-3-yl)-benzotriazin-4(3H)-one derivatives, *Arch. Pharm. (Weinheim).* 332 (1999) 317–320.
- [26] G. Daidone, D. Raffa, B. Maggio, M. Valeria Raimondi, F. Plescia, D. Schillaci, Synthesis and antiproliferative activity of triazenoindazoles and triazenopyrazoles: a comparative study, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 219–224.

- [27] D. Raffa, B. Maggio, S. Cascioferro, M.V. Raimondi, D. Schillaci, G. Gallo, et al., Synthesis and antiproliferative activity of 3-amino-N-phenyl-1H-indazole-1-carboxamides, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 165–178.
- [28] E. Carvalho, A.P. Francisco, J. Iley, E. Rosa, Triazene drug metabolites. Part 17: Synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumour triazenes, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 1719–1725.
- [29] V.G. Gadjeva, Two spin labeled triazenes: relationship between biochemical and biological activities, *Int. J. Pharm.* 247 (2002) 39–45.
- [30] G. Cirrincione, A.M. Almerico, P. Barraja, P. Diana, A. Lauria, A. Passannanti, et al., Derivatives of the new ring system indolo[1,2-c]benzo[1,2,3]triazine with potent antitumor and antimicrobial activity, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2561–2568.
- [31] R.B. Silverman, Classes of drugs that interact with DNA, in: *Org. Chem. Drug Des. Drug Action*, Second edition, Elsevier, n.d. p. 365.
- [32] G.E. Housholder, T.L. Loo, Elevated urinary excretion of 4-aminoimidazole-5-carboxamide in patients after intravenous injection of 4-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5-carboxamide, *Life Sci.* 8 (1969) 533–536.
- [33] G.E. Housholder, T.L. Loo, Disposition of 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide, a new antitumor agent, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179 (1971) 386–395.
- [34] 3-Aminoindazole derivatives, USRE28939 (E), 1976.
- [35] W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2923–2925.
- [36] M.P. Giovannoni, C. Vergelli, C. Biancalani, N. Cesari, A. Graziano, P. Biagini, et al., Novel

pyrazolopyrimidopyridazinones with potent and selective phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitory activity as potential agents for treatment of erectile dysfunction, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5363–5371.

- [37] F. Gracia, A. Buil, M. Moreno, S. Pages, R. Roberts, G. Sevilla, et al., (3-Oxo)pyridin-4-ylurea Derivatives as Pde4 Inhibitors, WO2010069504 (A1), 2010.
- [38] A.A. Pavlic, H. Adkins, Preparation of a Raney Nickel Catalyst, *J. Am. Chem. Soc.* 68 (1946) 1471.
- [39] S.I. Sviridov, A.A. Vasil'ev, S.V. Shorshnev, Straightforward transformation of isoxazoles into pyrazoles: renewed and improved, *Tetrahedron.* 63 (2007) 12195–12201.
- [40] F. Bisceglie, S. Pinelli, R. Alinovi, P. Tarasconi, A. Buschini, F. Mussi, et al., Copper(II) thiosemicarbazone molecular modifications modulate apoptotic and oxidative effects on U937 cell line, *J. Inorg. Biochem.* 116 (2012) 195–203.