

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
SCIENZE CHIMICHE

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: CHIM/06 CHIMICA ORGANICA

TITOLO TESI

**MESSA A PUNTO DI PROCEDURE PER LA SEMI-SINTESI DI
COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE PARTENDO DA
PRODOTTI NATURALI. STUDI DI STRUTTURA–ATTIVITÀ**

Presentata da: **CRISTIAN SAMORI'**

Coordinatore Dottorato

Prof. Vincenzo Balzani

Relatore

Prof. Alfredo Ricci

Co-Relatore

Dr.ssa Greta Varchi

Esame finale anno 2008

**MESSA A PUNTO DI PROCEDURE PER LA SEMI-SINTESI
DI COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE
PARTENDO DA PRODOTTI NATURALI. STUDI DI
STRUTTURA-ATTIVITÀ.**

CRISTIAN SAMORI' Ph. D.

Lo scopo del mio dottorato di ricerca in scienze chimiche è stato quello di modificare il nucleo strutturale della camptotecina per via semi-sintetica creando una nuova serie di composti con aumentata citotossicità e minor tendenza ad indurre effetti collaterali indesiderati.

La camptotecina è un alcaloide pentaciclico d'origine naturale che ha mostrato possedere un'elevata attività antitumorale.

Le modifiche semi-sintetiche da me sviluppate nell'ambito del dottorato di ricerca, hanno riguardato principalmente variazioni strutturali agli anelli C, D ed E. Sino ad oggi gli studi di struttura-attività (SAR) relativi a nuovi analoghi della camptotecina si sono essenzialmente incentrati su modifiche agli anelli A e B, poiché è stato dimostrato che opportune trasformazioni di queste porzioni molecolari favoriscono un aumento dell'attività citotossica, nonché consentono l'ottenimento di derivati maggiormente bio-disponibili. Al contrario, una dettagliata analisi dei dati di letteratura rivela che pochi sono gli studi riguardanti modifiche strutturali agli anelli C, D ed E, probabilmente a causa della bassa attività antineoplastica mostrata dai primi derivati sintetizzati.

La presente dissertazione pertanto affronterà lo studio approfondito degli effetti di tali modifiche sull'attività biologica, presentando una vasta e nuova gamma di camptotecina-analoghi. Sarà inoltre descritto lo sviluppo di alcune metodologie semi-sintetiche di applicabilità generale.

LISTA DEI CONTENUTI

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

| | |
|---|----|
| 1.1 Cancro e Chemioterapia | 1 |
| 1.2 Camptotecina | 2 |
| 1.3 Meccanismo d'Azione | 3 |
| 1.4 Relazione tra Struttura e Attività (SAR) | 7 |
| 1.5 Camptotecina: Sintesi Totali e Semi-Sintesi | 11 |

CAPITOLO 2. MODIFICHE ALL'ANELLO E

| | |
|--|----|
| 2.1 Introduzione | 15 |
| 2.2 Sintesi di Coniugati Tripartati | 17 |
| 2.3 Risultati e Discussione | 20 |
| 2.4 Valutazioni Biologiche e Biochimiche | 23 |
| 2.5 Conclusioni | 25 |

CAPITOLO 3. MODIFICHE ALL'ANELLO C

| | |
|--|----|
| 3.1 Introduzione | 26 |
| 3.2 Risultati e Discussione | 27 |
| 3.2.1. Alchilazione | 29 |
| 3.2.2. Idrossilazione | 30 |
| 3.2.3. Fluorurazione | 30 |
| 3.2.4. Amminazione | 31 |
| 3.3 Valutazioni Biologiche e Biochimiche | 34 |
| 3.3.1. Attività Antiproliferativa | 34 |
| 3.3.2. Esperimenti di Danno al DNA | 36 |
| 3.4 Conclusioni | 37 |

| | | |
|---------------------------|--------------------------------------|----|
| CAPITOLO 4. | MODIFICHE ALL'ANELLO D | |
| 4.1 | Introduzione | 38 |
| 4.2 | Risultati e Discussione | 39 |
| 4.3 | Valutazioni Biologiche e Biochimiche | 43 |
| 4.4 | Conclusioni | 45 |
| | | |
| CAPITOLO 5. | MODIFICHE ALL'ANELLO D | |
| 5.1 | Risultati e Discussione | 46 |
| 5.2 | Valutazioni Biologiche e Biochimiche | 48 |
| 5.3 | Conclusioni | 50 |
| | | |
| CAPITOLO 6. | CONCLUSIONI GENERALI | |
| 6.1 | Conclusioni | 51 |
| | | |
| PARTE SPERIMENTALE | | 52 |
| | | |
| Capitolo 2 | | 53 |
| Capitolo 3 | | 59 |
| Capitolo 4 | | 73 |
| Capitolo 5 | | 77 |
| | | |
| BIBLIOGRAFIA | | 87 |

LISTA DELLE FIGURE

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 1. | Struttura della 20(<i>S</i>)-Camptotecina. | 2 |
| FIGURA 2. | Rilassamento del DNA superavvolto mediante Topoisomerasi I. | 4 |
| FIGURA 3. | Reazione di transesterificazione catalizzata dalla Topoisomerasi I. | 5 |
| FIGURA 4. | Meccanismo dell'apoptosi cellulare indotta dalla CPT. | 6 |
| FIGURA 5. | Idrolisi della CPT a pH fisiologico. | 7 |
| FIGURA 6. | Relazione tra Struttura-Attività (SAR) dei vari analoghi della CPT. | 8 |
| FIGURA 7. | Strutture di analoghi della CPT. Topotecan 2 , e Irinotecan 3 . | 9 |
| FIGURA 8. | Raggi X del complesso ternario (Topoisomerasi I-DNA-Topotecan). | 10 |
| FIGURA 9. | Analoghi della CPT clinicamente rilevanti. | 11 |
| FIGURA 10. | Struttura generale di un Tripartato Coniugato. | 18 |
| FIGURA 11. | PEG-Tripartati 33 e 34 . | 19 |
| FIGURA 12. | Struttura di Tripartati solubili in acqua. | 19 |
| FIGURA 13. | Strutture delle poliammine 37-41 e i loro derivati N-Boc 42-46 . | 20 |
| FIGURA 14. | A) Saggi di cleavage dei coniugati tripartati con il complesso binario. B) Persistenza del danno indotto dai vari tripartati. | 24 |
| FIGURA 15. | Analoghi della CPT modificati al C ₅ | 26 |
| FIGURA 16. | Strutture di derivati al C ₅ con un attività farmacologica superiore alla CPT. | 26 |
| FIGURA 17. | Saggi di cleavage di Topo I-DNA relativi ai composti 5-analoghi-CPT. | 36 |
| FIGURA 18. | Analoghi della CPT modificati all'anello D. | 38 |
| FIGURA 19. | Rappresentazione spaziale di 88 . | 41 |
| FIGURA 20. | Rappresentazione spaziale di 88 . | 41 |
| FIGURA 21. | Saggi di cleavage di Topo I-DNA relativi ai composti 1 e 88 . | 44 |
| FIGURA 22. | Saggi di cleavage di Topo I-DNA | 50 |

LISTA DEGLI SCHEMI

| | | |
|-------------------|---|----|
| SCHEMA 1. | Sintesi totale proposta da Nagao. | 12 |
| SCHEMA 2. | Sintesi totale proposta da Bennasar. | 13 |
| SCHEMA 3. | Sintesi totale proposta da Curran. | 13 |
| SCHEMA 4. | Semi-sintesi dell'Irinotecan 2 proposta da Sawada. | 14 |
| SCHEMA 5. | Semi-sintesi del Topotecan 3 proposta da Kingsbury. | 14 |
| SCHEMA 6. | Semi-sintesi della Homocamptotecina 32 proposta da Bigg. | 16 |
| SCHEMA 7. | Reazione della CPT con poliammine 42-45 . | 21 |
| SCHEMA 8. | Sintesi dell'acido 17- <i>O</i> -Acetil Camptotecinico (49). | 22 |
| SCHEMA 9. | Reazione dell'acido 17- <i>O</i> -Acetil camptotecinico con poliammine 44-46 . | 22 |
| SCHEMA 10. | Tautomeria Cheto-enolica della CPT indotta da base. | 28 |
| SCHEMA 11. | Protocollo sintetico di derivatizzazione al C ₅ Attraverso la via enolato. | 29 |
| SCHEMA 12. | Sintesi delle 5-alchil Camptotecine | 30 |
| SCHEMA 13. | Sintesi di 5-OH-CPT (65) e di 5-F-CPT (67a e 67b). | 31 |
| SCHEMA 14. | Amminazione elettrofila della CPT. | 32 |
| SCHEMA 15. | Semi-sintesi del derivato 78 . | 33 |
| SCHEMA 16. | Ipotesi di epimerizzazione di (75a , 75b) durante riduzione. | 34 |
| SCHEMA 17. | Reazione della CPT con il reagente di Lawesson. (Hecht) | 39 |
| SCHEMA 18. | Reazione della CPT con il reagente di Lawesson. (Samorì) | 39 |
| SCHEMA 19. | Sintesi della 16a-Tio-CPT (88). | 40 |
| SCHEMA 20. | Struttura molecolare della CPT (X=O) e della TioCPT (X=S): a) Forma cheto; b) Forma enolica. | 42 |
| SCHEMA 21. | S-Alchilazione della TioCPT 88 con MeI e sua Idrolisi. | 43 |
| SCHEMA 22. | Sintesi degli analoghi Tionati. | 47 |

LISTA DELLE TABELLE

| | | |
|-------------------|--|----|
| TABELLA 1. | Stabilità dell'anello lattonico nel plasma umano e nel plasma del topo | 15 |
| TABELLA 2. | Attività antiproliferativa dei coniugati tripartati in cellule H460 IC ₅₀ (μM) | 23 |
| TABELLA 3. | Attività antiproliferativa delle CPT-5-analoghe sulle cellule NCI-H460. | 35 |
| TABELLA 4. | Attività citotossica (IC ₅₀ , μM) di CPT 1 e tiocamptotecina 88 contro linee cellulari di tumore umani. | 43 |
| TABELLA 5. | Attività citotossica (IC ₅₀ , μM) dei Tio-analoghi vs i parentali in diverse linee cellulari di tumore umani | 49 |

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

| | |
|-------------------|---|
| Ac | Acetile |
| Ac ₂ O | Anidride Acetica |
| Bn | Benzile |
| Boc | <i>t</i> -Butossicarbonile |
| <i>t</i> BuOK | potassio <i>tert</i> -butossido |
| CPT | Camptotecina |
| DBAD | Dibenzilazodicarbossilato |
| DTBAD | Di- <i>t</i> -Butilazodicarbossilato |
| DMAP | Dimetilamminopiridina |
| DCE | Dicloroetano |
| DMF | Dimetilformammide |
| DMSO | Dimetilsolfossido |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| EDCI | 1-Etil-3-[3-(dimetilammino)propil]-carbodiimmide cloro idrato |
| eq. | equivalenti |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HSA | Human serum albumin |
| IC ₅₀ | Inhibitory concentration 50% |
| LiHMDS | Litio bis(trimetilsilil)ammide |
| LR | Lawesson's Reagent |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| SAR | Structure-Activity Relationship |
| TBS | <i>t</i> -Butildimetilsilile |
| TFA | Acido Trifluoroacetico |
| TES | Trietilsilile |
| THF | Tetraidrofurano |
| TLC | Thin Layer Chromatography |

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 CANCRO E CHEMIOTERAPIA

Una delle cause primarie di morte nel mondo industrializzato è il cancro.¹ “*Cancro*” è il nome generale e generico di una patologia in cui cellule anormali crescono in maniera incontrollata. Il cancro può invadere e distruggere tessuti sani, spargersi attraverso il flusso sanguigno e colpire il sistema linfatico e da qui propagarsi in altre parti del corpo. La crescita della massa tumorale può essere controllata mediante rimozione chirurgica, radiazione ionizzante (radioterapia), o chemioterapia. I primi due metodi hanno un elevato grado di successo nel caso in cui la lesione sia localizzata, risultano tuttavia quasi completamente inefficaci nei casi in cui il tumore sia allo stadio terminale. Trattamenti chimici possono al contrario essere impiegati sia per patologie tumorali localizzate, che in caso di metastasi diffuse, poiché i farmaci anti-neoplastici agiscono interferendo sulla replicazione cellulare, portando quindi ad una riduzione della massa tumorale, o nella migliore delle ipotesi, ad una regressione del tumore stesso.

Dalla scoperta del gas mostarda (iprite o solfuro di 2,2'-diclorodietile), per primo impiegato come agente anti-tumorale, innumerevoli altri derivati sono stati scoperti e studiati. In base al loro meccanismo d'azione, i farmaci anti-tumorali possono essere genericamente suddivisi come segue:²

i) Agenti alchilanti. Questa classe di composti forma legami covalenti con molecole attive a livello biologico formando, ad esempio, legami incrociati nel DNA, bloccando così la mitosi cellulare. Un esempio di tale classe di composti è l'azoto mostarda (aza iprite).

ii) Antimetaboliti. Questa classe di composti ha una struttura chimica simile ad alcuni metaboliti essenziali. Essi agiscono legandosi in maniera irreversibile al materiale nucleare od a certi enzimi vitali, inibendo in tal modo ogni loro ulteriore attività biologica. Esempi di questa classe di derivati sono il 5-fluorouracile, la citosina arabinosio e la 6-tioguanina.

iii) Agenti antimitotici. Questi composti interagiscono con il sistema del microtubolo cellulare stabilizzandolo, come avviene nel caso del tassolo, oppure destabilizzandolo, come accade per la vinblastina. Questa famiglia d'agenti antimitotici può interrompere

l'equilibrio che esiste tra tubulina e microtubolo, prevenendo così la divisione cellulare.

iv) Antibiotici antitumorali. Oltre alla loro capacità di inibire la moltiplicazione dei batteri, alcuni antibiotici hanno mostrato un effetto inibitorio sulle cellule tumorali. Gli antibiotici antitumorali possono essere divisi in due gruppi, antibiotici antraciclinici e antibiotici non-antraciclinici.

v) Agenti vari. Alcuni composti non possono essere classificati in modo univoco come le sostanze sopra riportate. Questa famiglia di composti include alcuni agenti alchilanti non-classici quali: l'antracenedione, l'epipodefillotossina, l'idrossiurea, l'amsacrina e vari agenti terapeutici enzimatici.

Oltre agli agenti antitumorali sopra descritti, studi relativi alla biochimica del tumore, hanno evidenziato nuovi possibili target biologici, il che ha condotto allo studio di farmaci con un nuovo meccanismo d'azione. Un esempio di questa, relativamente nuova classe di molecole è la camptotecina, un inibitore della topoisomerasi I, il cui peculiare meccanismo d'azione, la rende uno dei farmaci leader nella cura delle neoplasie.

1.2 CAMPTOTECINA

La camptotecina (CPT) (**1**) (Figura 1) fu scoperta negli anni '50, quando migliaia di piante furono analizzate per scoprire nuove sorgenti naturali di steroidi da utilizzare nella sintesi del cortisone. Nel 1958 gli estratti dell'albero cinese Xi Shu, (*Camptotheca acuminata* che fa parte della famiglia delle *Nyssaceae*), furono testati in un programma di chemioterapia del NCI, che dimostrò l'attività *in vivo* della camptotecina verso le leucemie L1210 e P388 e verso il carcinosarcoma di Walker.^{3a,b}

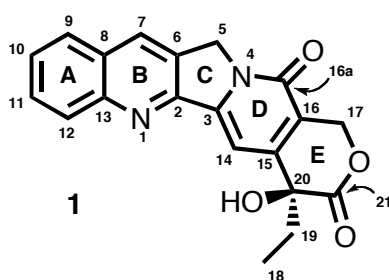


Figura 1. Struttura della 20(S)-Camptotecina

Nel 1966 Monroe E. Wall e Mansukh C. Wani determinarono la struttura della CPT; un alcaloide pentaciclico costituito da un'unità pirrolo[3,4-*b*]chinolinica (anelli A, B e C),

un gruppo piridone coniugato (anello D) e un anello lattonico a 6-membri (anello E), con in α un gruppo ossidrilico con configurazione assoluta (S).⁴ Durante la ricerca Wall e Wani scoprirono che la camptotecina ed i suoi analoghi erano presenti in diverse parti della pianta, tra le quali le radici, i semi, i frutti e la corteccia, ma erano particolarmente abbondanti nelle foglie giovani dell'albero. Inoltre, questa pianta era già utilizzata nella medicina tradizionale cinese nel trattamento di varie malattie incluso il tumore.⁵

La CPT risulta essere praticamente insolubile in acqua e ciò ha fortemente influenzato il suo lento sviluppo clinico. Nel tentativo di superare tale ostacolo fu quindi preparato il corrispondente sale sodico, ottenuto trattando la CPT con sodio idrossido. Sfortunatamente questa formulazione clinica procurava gravi effetti collaterali ai pazienti trattati, quali cistiti emorragiche, mielotossicità, neutropenia, trombocitopenia e diarrea, concause associate al dosaggio e che determinarono l'interruzione del suo utilizzo in fase clinica II. A causa di questo fallimento terapeutico, l'uso della CPT fu a solo scopo scientifico fino a quando nel 1985, si scoprì che la CPT era un inibitore della Topoisomerasi I, ossia aveva la capacità di bloccare la replicazione cellulare.⁶ Questa scoperta diede nuovo impulso alla ricerca e gli sforzi per farne un potente antitumorale si moltiplicarono.

1.3 MECCANISMO D'AZIONE

Il DNA può essere considerato alla stregua di un polimero, lungo approssimativamente 2 metri, il quale è inserito in un volume di circa 10^{-17} m³, che corrisponde al volume cellulare. Per poter occupare uno spazio così ridotto è quindi necessario che il DNA si compatti, ripiegandosi su stesso. Tale fenomeno dà origine a numerosi punti di contatto ed interazioni fra i vari domini del DNA stesso. Inoltre, il metabolismo del DNA (trascrizione, replicazione ricombinazione e riparazione), richiede che i due filamenti della doppia elica siano separati tra loro per consentire al RNA messaggero e al RNA polimerasi la duplicazione del DNA. A causa di questa enorme massa, (DNA-mRNA-pRNA) il complesso cellulare non può ruotare liberamente, dando così origine a superavvolgimenti positivi e negativi sulla doppia elica (Figura 2a).⁷ E' esattamente a questo punto che interviene l'enzima topoisomerasi I, eliminando la tensione che si crea nel DNA.

Le DNA topoisomerasi sono enzimi nucleari che svolgono un ruolo essenziale in diverse funzioni del DNA, che includono: la replicazione, la trascrizione, la ricombinazione

e la riparazione.⁸ Questi enzimi eucariotici sono conosciuti come: topoisomerasi di tipo I (Topo I) e topoisomerasi di tipo II (Topo II) e sono distinti dalla particolare azione catalitica che svolgono sul DNA. La Topo I agisce mediante la rottura di un unico filamento della doppia elica del DNA; durante la reazione l'enzima rimane covalentemente legato alla estremità 3' del DNA; questo intermedio è conosciuto come **COMPLESSO BINARIO** (Figura 2b). La Topo II, invece, genera la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica, rimanendo covalentemente legata ad entrambe le estremità 5' fosforilate del DNA tagliato. Sia la Topo I che la Topo II sono targets cellulari di diversi farmaci antitumorali⁷

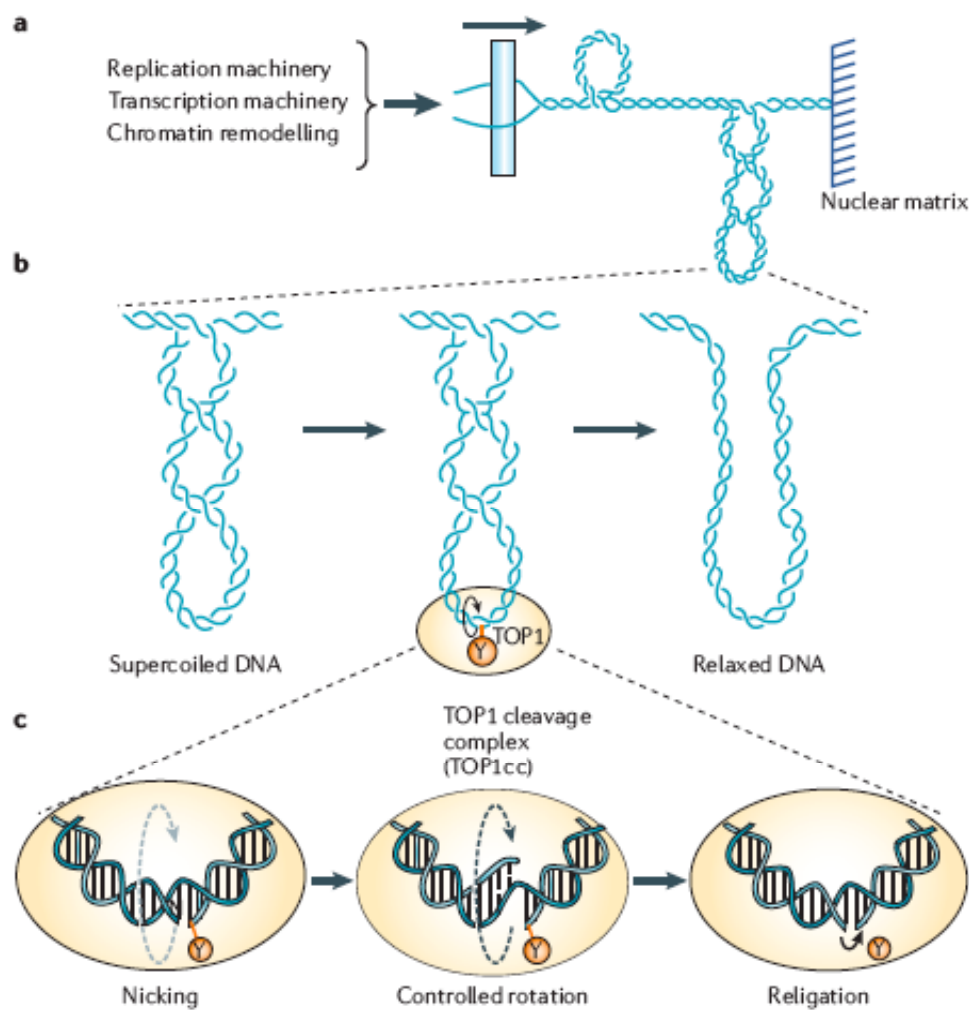


Figura 2. Rilassamento del DNA superavvolto mediante Topoisomerasi I.

Come detto in precedenza, la Topo I causa la rottura di un solo filamento della doppia elica (Figura 2c), consentendo al filamento intatto di ruotare attorno al **COMPLESSO**

BINARIO (Topo I-DNA) e di eliminare la tensione nell'elica durante la fase di replicazione-trascrizione. Una volta che il DNA si è rilassato, la topo I ricongiunge il filamento scisso e si distacca. In condizioni normali lo stadio di ricongiungimento è favorito rispetto lo stadio di scissione mantenendo bassa la concentrazione dello stadio intermedio.^{3b}

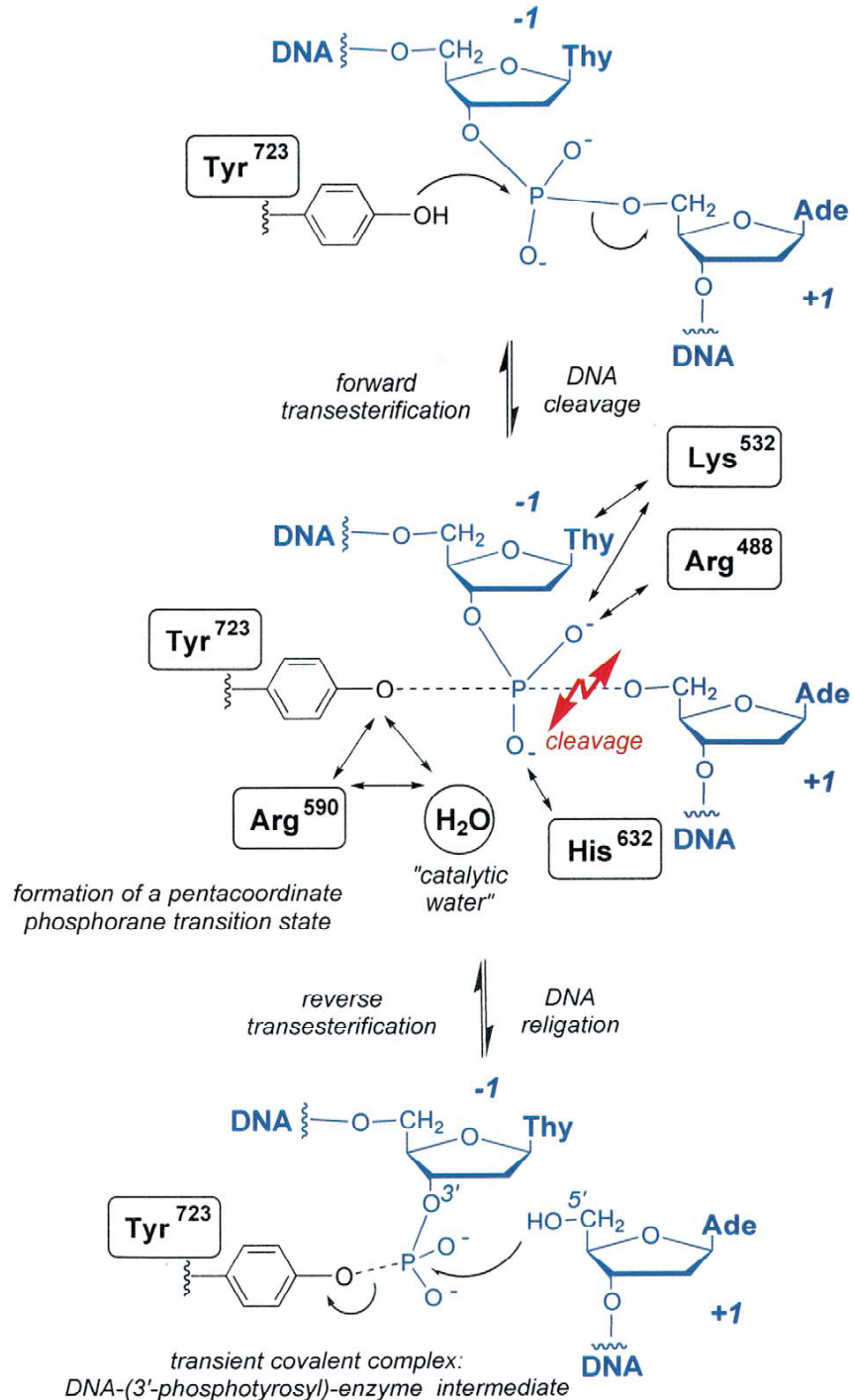


Figura 3. Reazione di transesterificazione catalizzata dalla Topoisomerasi I.

Il dettaglio chimico è mostrato in Figura 3 ed evidenzia la reazione di transesterificazione in cui il sito attivo della topoisomerasi umana, ossia il residuo tirosinico #723 (Tyr⁷²³), attacca il legame fosfodiesterico del filamento scissile del DNA, producendo un intermedio covalente chiamato complesso binario, con la concomitante espulsione del filamento 5' idrossi polinucleotide. Attraverso un meccanismo di rotazione controllato, si ha il rilassamento della tensione dell'elica superavvolta, seguito dal ricongiungimento del filamento che avviene mediante attacco del residuo 5' idrossi polinucleotide al complesso binario che espelle l'enzima dal DNA.⁹

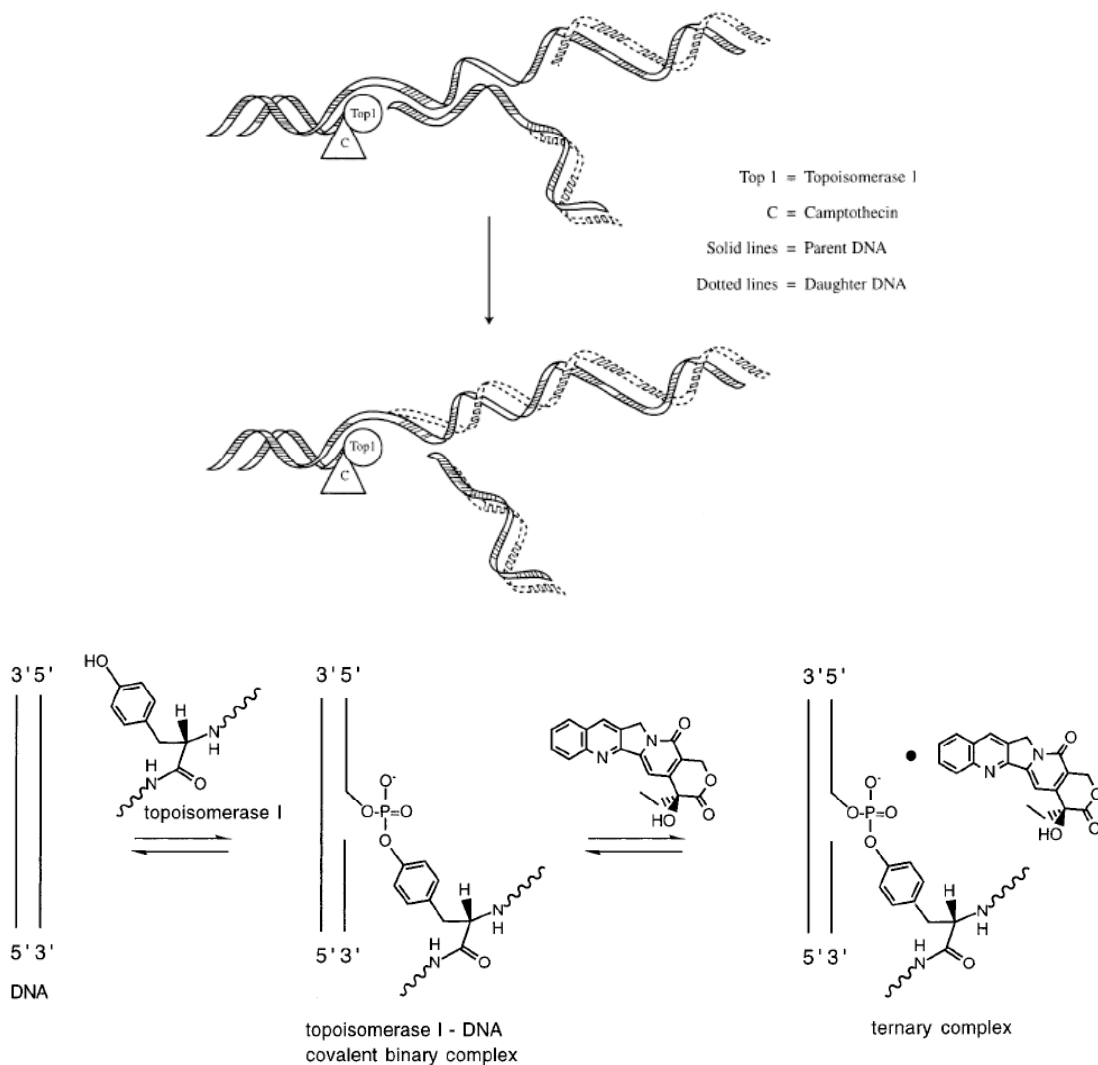


Figura 4. Meccanismo dell'apoptosi cellulare indotta dalla CPT.

Studi biochimici hanno mostrato che la CPT si inserisce all'interfaccia del complesso

binario costituito dal DNA e dall'enzima, inibendo specificamente lo stadio di riformazione del filamento del DNA tagliato. Inoltre, si è dimostrato che la CPT non lega esclusivamente con il DNA o con la topo I,¹⁰ ma interagisce unicamente con il complesso binario costituito da DNA-topo I, attraverso la formazione di legami ad idrogeno e forze di Van der Waals, generando un **COMPLESSO TERNARIO** reversibile detto “*complesso scissile*”. Gli studi effettuati da Liu e Hsiang¹¹ sulle cellule di replicazione SV40, giustificano la citotossicità della CPT adottando come modello la collisione della forca di replicazione (Figura 4).

Il complesso ternario è un complesso reversibile e non letale, ma quando avviene la collisione tra il complesso ternario (DNA-Topo I-CPT) e la forca di replicazione si ha apoptosi cellulare (Figura 4). In seguito alla collisione tre eventi biochimici hanno luogo: (a) la formazione di tagli anche sul filamento non scisso, (b) l'arresto irreversibile della forca di replicazione ed infine (c) la formazione, nel sito di collisione, di un ulteriore taglio sul complesso binario. Inoltre, è stato dimostrato, che questa collisione è potenzialmente letale solo se il complesso ternario si è formato.¹²

1.4 RELAZIONE TRA STRUTTURA E ATTIVITÀ (SAR)

Numerosi studi sono stati effettuati per comprendere il meccanismo d'azione della CPT,¹¹ e molti altri per investigare quali interazioni siano coinvolte nella formazione del complesso ternario, nel tentativo di far luce sui meccanismi dell'attività citotossica.¹³ Molti sforzi inoltre sono stati dedicati all'interpretazione delle varie relazioni struttura-attività.

Come detto in precedenza la CPT non può essere usata come farmaco tal quale a causa della sua bassa solubilità ed instabilità a pH fisiologico (pH~7.4).

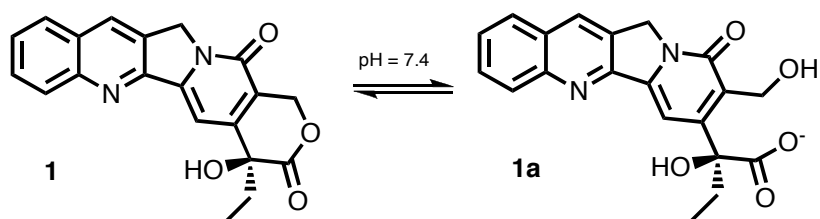


Figura 5. Idrolisi della CPT a pH fisiologico.

Nel sangue umano l'equilibrio tra la forma lattonica **1** (attiva) e la forma carbossilica **1a** (inattiva) (Figura 5) è spostata verso la forma aperta, la quale si lega con la siero albumina umana (HSA), che è la proteina di trasporto predominante nel sangue.¹⁴ L'affinità

di **1a** per la siero albumina umana è stimata essere 100 volte superiore a quella della forma lattonica **1**,¹⁵ perciò quando la CPT è somministrata per via intravenosa, più del 95% del farmaco si trasforma nella forma inattiva e di conseguenza solo una piccola quantità risulta effettivamente disponibile ad esercitare l'effetto terapeutico.

Queste considerazioni hanno spinto i ricercatori a sintetizzare nuovi analoghi della CPT, ed in particolare sono state studiate modifiche strutturali in grado di aumentare la stabilità dell'anello lattonico verso il plasma umano. A tale scopo è stato determinante stabilire quali sostituenti introdurre, se idrofili o lipofili, ed in quale posizione introdurli. Gli studi di struttura-attività sino ad oggi compiuti hanno condotto alle seguenti considerazioni:

- L' α idrossi lattone al carbonio in posizione 20 dell'anello E è assolutamente indispensabile per l'attività biologica della CPT e dei suoi analoghi sia *in vitro* che *in vivo*.
- Solo l'isomero (20S) è attivo. L'isomero (R) è inattivo e la miscela racema è attiva solo al 50%.
- L'introduzione di gruppi ammino o di gruppi nitro in posizione 9 e 10 generano prodotti con aumentata attività *in vivo*.^{10c, 16}
- Sostituzioni al carbonio 11 e 12 diminuiscono l'attività degli analoghi.^{10c, 16, 17}
- Modifiche dell'anello E, come ad esempio la sostituzione dell'anello lattonico con l'anello lattamico o lo scambio del gruppo ossidrilico con altri atomi, porta ad una diminuzione, o completa perdita, dell'attività nei confronti della topo I.¹⁸

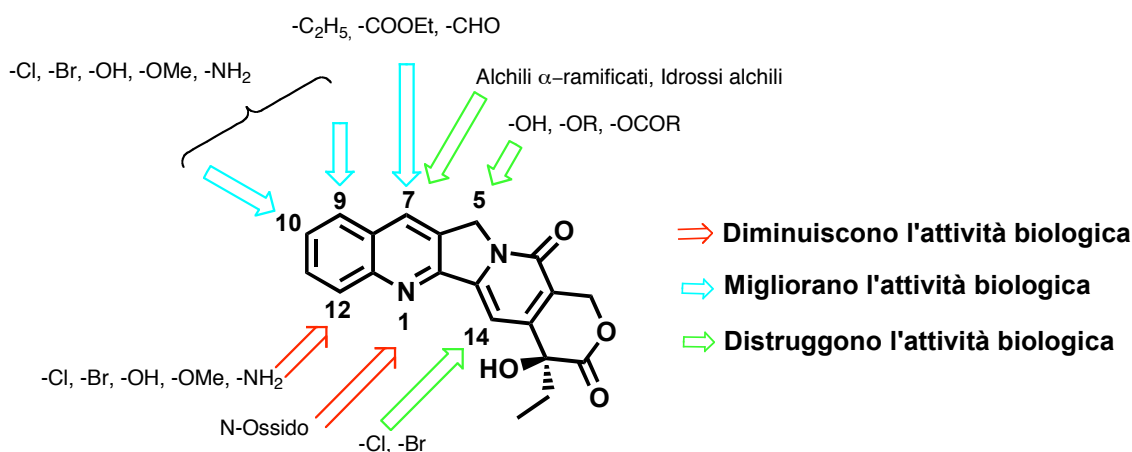


Figura 6. Relazione tra Struttura-Attività (SAR) dei vari analoghi della CPT.

Lo schema proposto da Sawada, riassume la relazione generale tra struttura ed attività (Figura 6).¹⁹ Attualmente solo due analoghi della CPT sono stati approvati dall'ente americano FDA (Food and Drug Administration) per l'uso clinico sia negli USA che in Europa, e sono il Topotecan **2** (nome commerciale Hycamtin, della SmithKline Beecham)⁴ e l'Irinotecan **3** (nome commerciale Camptosar della Pharmacia-Upjohn)²⁰ (Figura 7).

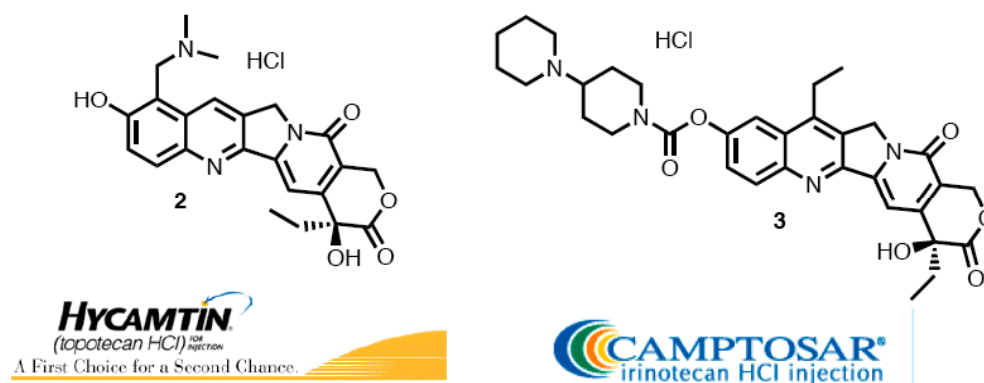


Figura 7. Strutture di analoghi della CPT. Topotecan **2**, e Irinotecan **3**.

Recentemente Stewart e collaboratori²¹ hanno riportato la struttura ai raggi-X del complesso ternario (DNA-Topo I-Topotecan) (Figura 8). Questa struttura cristallina rende conto di un elevato numero di relazioni tra struttura ed attività osservate per gli analoghi della CPT. L'analisi del complesso ternario mostra che il topotecan (**2**) si inserisce nel punto in cui è avvenuto il taglio al DNA da parte dell'enzima e stabilizza il complesso binario mediante interazioni base-stacking sia con le coppie di basi sopra il taglio (+1) che con quelle sotto il taglio (-1). In effetti, il topotecan mima perfettamente una coppia di basi del DNA e ne occupa lo stesso spazio in una ipotetica struttura senza farmaco (Figura 8C).²²

Dai dati cristallografici del topotecan si è osservato che per le modifiche alle posizioni 7, 9 e 10 vi è un elevato grado di tolleranza. E' stato riportato che, in alcuni casi, variazioni strutturali effettuate in tali posizioni possono indurre un incremento dell'attività *in vivo*, lasciando inalterata quella *in vitro*.

Il modello, infatti, dimostra che sostituenti introdotti in tali posizioni sono proiettati all'interno del solco maggiore del DNA, contribuendo a stabilizzare il complesso ternario. Inoltre, i gruppi introdotti migliorano la solubilità, la stabilità e non interferiscono

stericamente con il binding del farmaco. Dal modello mostrato in Figura 8A e Figura 8B, si può notare che si ha la formazione di un ponte ad idrogeno tra il gruppo ossidrilico del farmaco ed il residuo dell'enzima (20S-OH-----Asp 533). Sempre da questo modello si può comprendere perché l'enantiomero (20)-*R* risulti inattivo. Tale configurazione, infatti, impedirebbe la formazione di un ponte ad idrogeno con il residuo Asp 533 dell'enzima, inoltre il gruppo 20(*R*)-etile potrebbe creare impedimento sterico rendendo vana la stabilizzazione del complesso ternario. Da queste considerazioni appare evidente che la sostituzione del gruppo ossidrilico con un atomo di idrogeno (20-deossi analogo) eliminerebbe completamente la possibilità di creare legami idrogeno, spiegando pertanto la totale inattività di questo analogo.²³

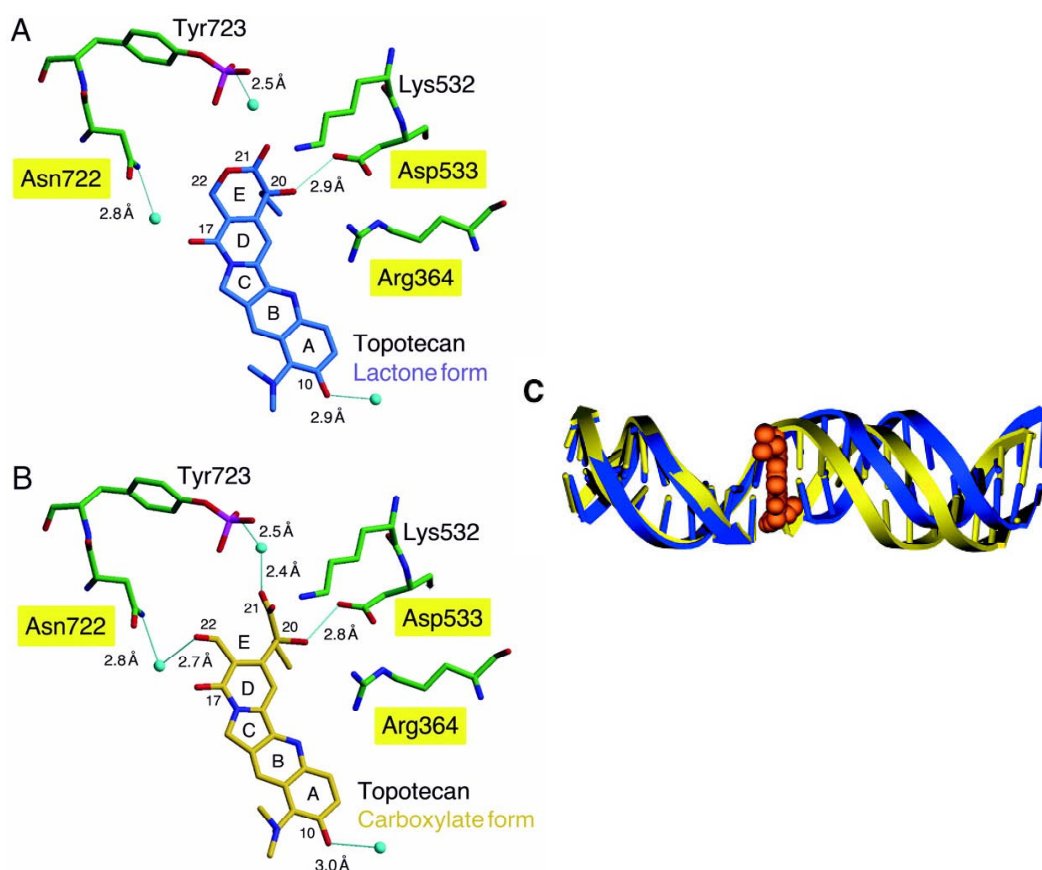


Figura 8. Raggi X del complesso ternario (Topoisomerasi I-DNA-Topotecan).

Sempre sulla base di quanto osservato, si desume che l'introduzione di un alogeno sul C₂₀ porterebbe ad una parziale diminuzione dell'attività, poiché l'alogeno derivato conserverebbe la capacità di aprire l'anello lattonico (Figura 8B) e quindi di stabilizzare il

complesso binario mediante ponte idrogeno con molecole d'acqua.

Ad oggi più di 6000 pubblicazioni tra articoli, brevetti e monografie contribuiscono a riassumere il meccanismo d'azione, la relazione tra struttura/attività e le proprietà farmacologiche (formulazioni, studi preclinici e prove cliniche) della camptotecina e dei suoi derivati.²⁴ Come già accennato in precedenza tale ricerca ha condotto all'approvazione del FDA di due molecole antitumorali a base camptotecinica: topotecan **2** ed irinotecan **3**. (Figura 7) Il Topotecan è usato per il trattamento del tumore ovarico resistente al *cis*-platino e come seconda linea per la cura del tumore polmonare, mentre l'Irinotecan è usato per il trattamento del tumore del colon retto in associazione con il 5-FU (5-FluoroUracile).²⁵ Numerosi altri analoghi sono in fase di registrazione o di commercializzazione, fra questi citiamo il Belotecan **4**,²⁶ il Gimatecan **5**,²⁷ il GG-211 (lurtotecan) **6**,²⁸ il DX-8951f (exatecan) **7**,²⁹ la 9-nitrocampptothecin **8**,³⁰ e la karenitecin **9**³¹ (Figura 9).

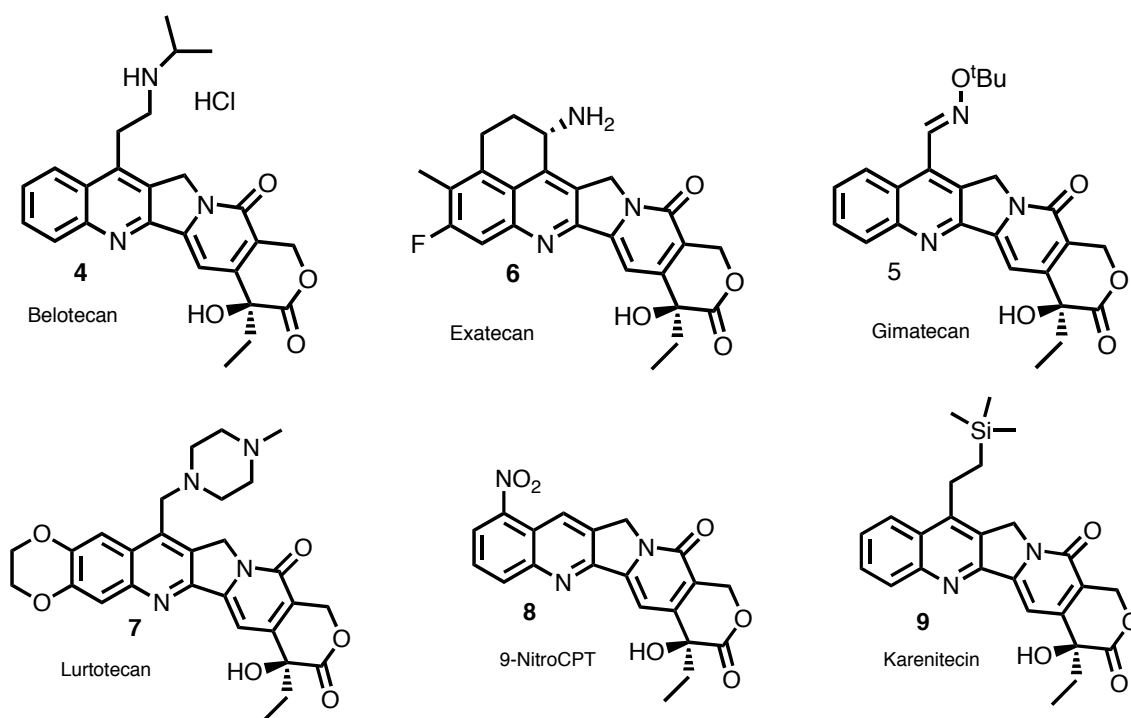
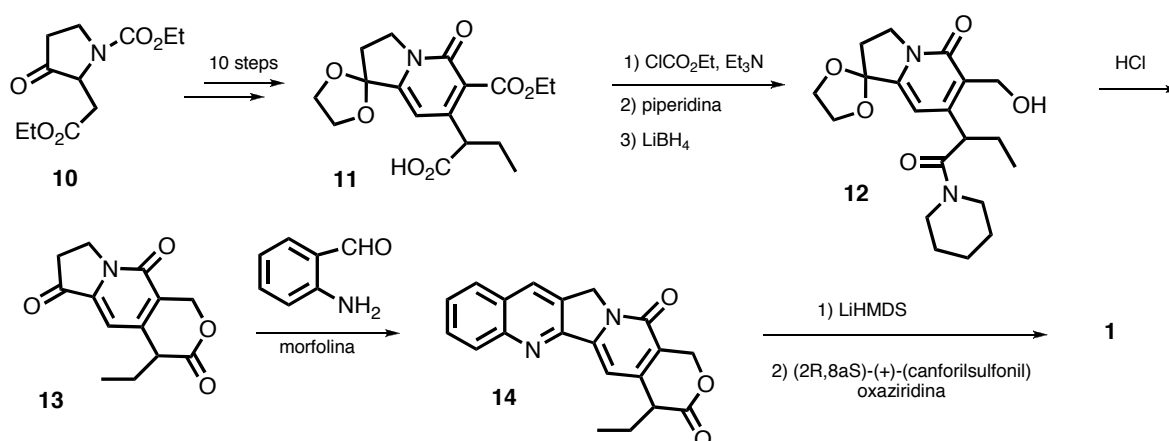


Figura 9. Analoghi della CPT clinicamente rilevanti.

1.5 CAMPTOTECINA: SINTESI TOTALI E SEMI-SINTESI

La prima sintesi totale della CPT racema è del 1971 ad opera di Stork e Schultz;³² questo primo tentativo fu seguito da numerosi altri approcci sintetici.³³ Corey fu il primo a

riportare la sintesi della 20(*S*)-CPT **1** sfruttando la risoluzione dell'intermedio racemo con chinina.³⁴ La prima vera sintesi asimmetrica della CPT fu riportata da Tagawa e collaboratori³⁵ nel 1989 ed utilizzava come intermedio di partenza la *N*-Tosil (*R*)-prolina per controllare la stereochimica del carbonio in posizione 20. Fang et al. e Jew et al. usarono il (DHQD)₂-PYR come catalizzatore chirale per l'ossidazione stereocontrollata del carbonio in 20 ottenendo un eccesso enantiomerico superiore al 94%. Nagao ha descritto una nuova strategia sintetica partendo dal composto racemo **10**, etil 1-etossicarbonil-3-oxopirrolidinil-2-acetato (Schema 1).³⁶

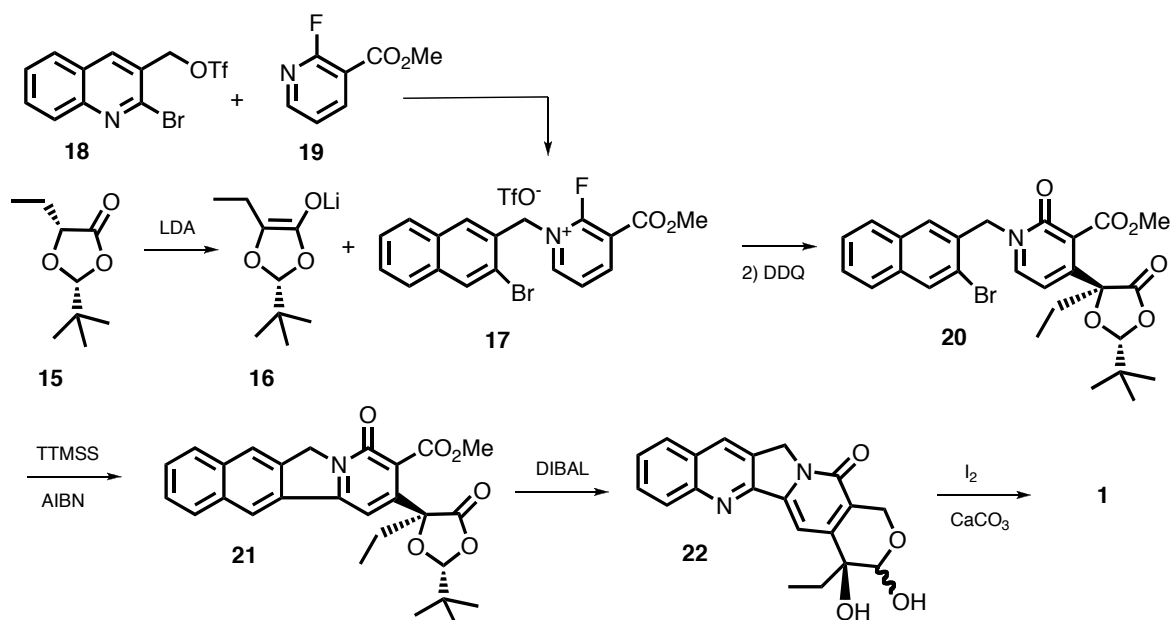


Schema 1. Sintesi totale proposta da Nagao.

Il chetale **11**, fu sintetizzato in 10 stadi attraverso una sequenza di protezione/condensazione/deprotezione con una resa complessiva del 28%. Il trattamento di **11** con etil cloroformiato, in presenza di Et₃N, seguito da aggiunta di piperidina e riduzione con LiBH₄, genera l'alcol **12** con una resa del 39%. La successiva lattonizzazione, effettuata con HCl 6N, genera il composto **13**. Infine, la condensazione di **13** con 2-ammino benzaldeide, in presenza di morfolina, genera la 20-deossi CPT racema (**14**). La sintesi è completata da un'idrossilazione asimmetrica sul carbonio 20 che utilizza come reagente chirale il reattivo di Davis ovvero la (2*R*,8*aS*)-(+)-(camforilsulfonyl)oxaziridina.

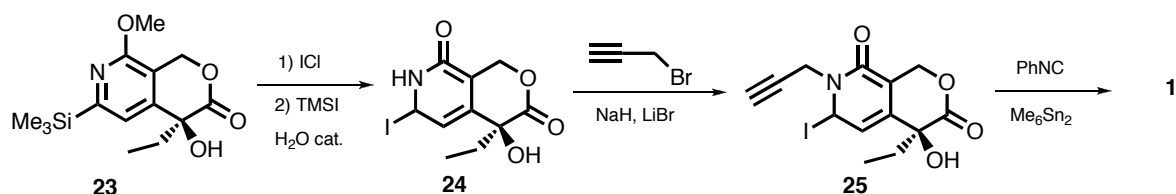
Una strategia più recente impiegata da Bannasar et al. utilizza il diossolanone (2*R*,5*R*)-2-'Butil-5-etil-1,3-diossolan-4-one **15** come intermedio chiave per la creazione dello stereo centro in posizione 20. Un passaggio decisivo è la sintesi del piridinio triflato **17**, ottenuto dall'alchilazione della 2-fluoropiridina **19** con la chinolina triflato **18** (Schema 2). Lo stereocentro C₂₀ si forma dalla reazione dell'enolato **16** con il piridinio triflato **17**, seguita

da ossidazione con DDQ per generare il piridone **20** come unico diastereoisomero ed una resa totale del 20%. La reazione di arilazione intramolecolare con (TTMSS)-AIBN genera l'intermedio tetraciclico **21**, che per trattamento con DIBAL porta alla formazione dell' α -idrossilattolo **22** con resa del 45%. Il lattolo **22** è convertito nella (20)*S*-CPT mediante ossidazione con I₂ e CaCO₃.³⁷



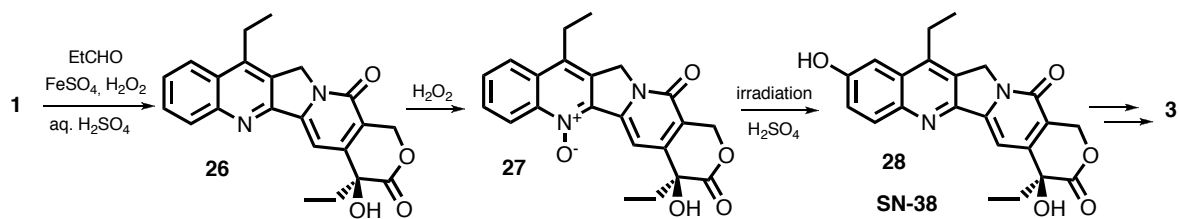
Schema 2. Sintesi totale proposta da Bennasar.

Curran et. al. hanno riportato una sintesi della (*S*)-CPT che sfrutta un'interessante reazione di annulazione [4+1] a cascata radicalica (Schema 3).³⁸ Il lattone **23** è stato sintetizzato in maniera simile alla sintesi di Fang. Lo scambio del gruppo TMS con iodio, seguito da demetilazione genera **24** con una resa del 33%. La N-propargilazione di **24** genera l'alchino derivato **25**, che per reazione con fenil isonitrile in presenza di esametil distannano porta alla formazione della 20(*S*)-CPT con una resa del 63%. La metodologia riportata da Curran si è dimostrata molto versatile, pertanto, sfruttando la reazione di annulazione radicalica è possibile sintetizzare una vasta gamma di nuovi analoghi della CPT modificati all'anello A.³⁹



Schema 3. Sintesi totale proposta da Curran.

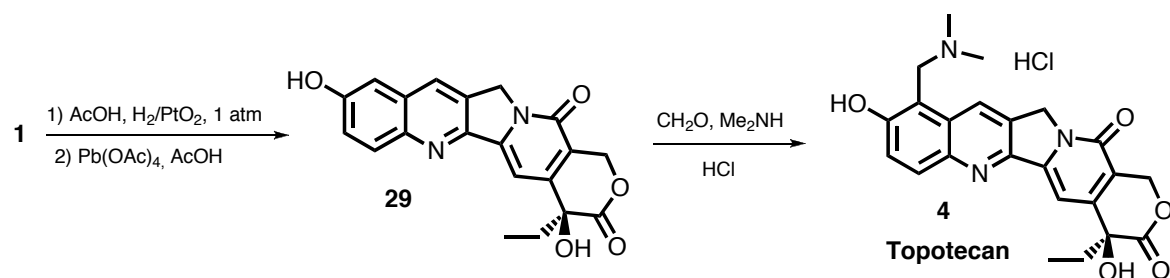
Metodologie semi-sintetiche furono sviluppate per sintetizzare analoghi della CPT partendo dalla molecola naturale. Nel 1991 Sawada et.al. riportarono la semi-sintesi dell'irinotecan.⁴⁰



Schema 4. Semi-sintesi dell'Irinotecan **2** proposta da Sawada.

L'aggiunta di acqua ossigenata ad una soluzione di 20(S)-CPT in H₂SO₄ in presenza di FeSO₄ e propionaldeide (formazione dell'etil radicale) genera la 7-etil-CPT (**26**) con resa del 77% (Schema 4). Il derivato **26** è convertito nel corrispondente N-ossido **27** usando H₂O₂ in AcOH. Mediante l'irraggiamento di **27** in ambiente acido si genera **28** (definito SN-38), il quale risulta essere il metabolita attivo dell'irinotecan.

La semi-sintesi del topotecan è stata riportata da Kingsbury⁴¹ in due stadi partendo dalla molecola naturale **1** (Schema 5).



Schema 5. Semi-sintesi del Topotecan **3** proposta da Kingsbury.

La conversione della 20(S)-CPT nella 10-idrossi-CPT (**29**) avviene attraverso una sequenza di riduzione/ossidazione con una resa del 71%; trattando **29** con dimetilammina in formaldeide acquosa ed acido acetico si genera il topotecan con una resa globale del 62%.

CAPITOLO 2

MODIFICHE ANELLO E

2.1 INTRODUZIONE

Dagli studi riguardanti le relazioni struttura-attività eseguiti sulla CPT ed i suoi analoghi (Capitolo 1), si evince che modifiche strutturali effettuate sull'anello E generalmente diminuiscono l'attività dei derivati. La causa di tale andamento sarebbe legata alla facilità di idrolisi dell'anello E in condizioni fisiologiche, (pH~7.4), dovuta sia all'effetto induttivo dell' α -idrossi gruppo, che alla formazione di un legame idrogeno intramolecolare tra il gruppo carbonilico del lattone e l' α -idrossi gruppo. La forma attiva **1** (Figura 5) predomina solo in condizioni acide.⁴²

Alcuni studi hanno mostrato che l'equilibrio d'apertura dell'anello E è pH-dipendente, ed è spostato verso la struttura **1a** nel plasma in maniera dipendente dalla specie (Tabella 1).

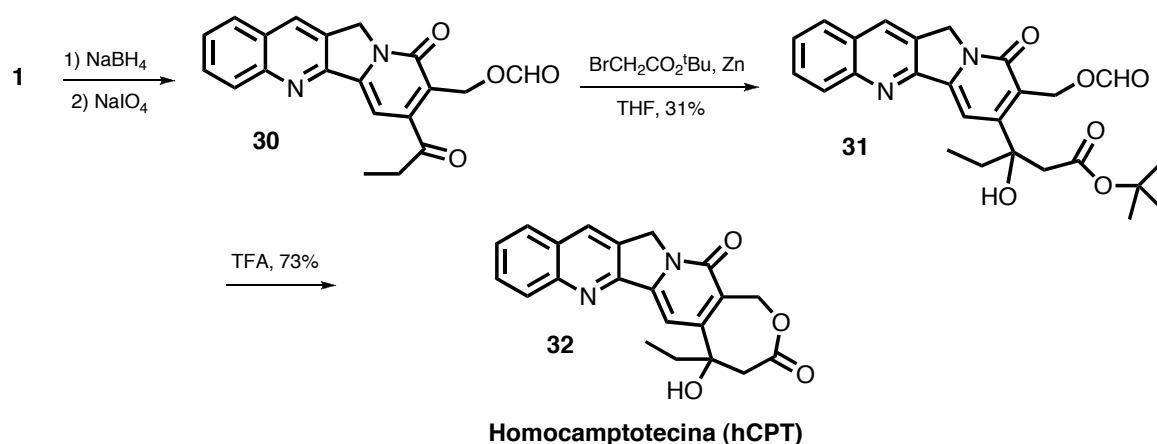
Tabella 1. Stabilità dell'anello lattonico nel plasma umano e nel plasma del topo

| | time (h) | | | | |
|-------------------|----------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 6 |
| human plasma | | | | | |
| % lactone for CPT | 100.0 | 12.0 | 0.50 | 00.0 | 00.0 |
| mouse plasma | | | | | |
| % lactone for CPT | 100.0 | 42.0 | 35.0 | 18.0 | 18.0 |

Come si desume dalla Tabella 1, nell'uomo tale equilibrio è spostato verso la forma **1a**, mentre nei roditori (comuni cavie da test) è spostato verso la struttura lattonica.⁴³ Ciò spiegherebbe perché, un certo numero analoghi della CPT, risultano estremamente attivi nei modelli animali, mentre falliscono nelle prove cliniche. La stabilità verso il plasma umano quindi è una delle caratteristiche principali da considerare per lo sviluppo di nuovi analoghi.

I derivati che recano modifiche all'anello E mostrano solitamente una diminuzione della citotossicità e dell'attività inibitoria verso la Topo I, giungendo alla conclusione

generale che l' α -idrossi lattone in forma chiusa è essenziale per la realizzazione dell'attività antitumorale.⁴⁴ La homo-camptotecina **32** (hCPT) un β -idrossi lattone in cui si ha introduzione di un gruppo metilenico tra le posizioni C₂₀ e C₂₁, ha mostrato la stessa capacità inibitoria della CPT verso il complesso binario, ma soprattutto ha evidenziato una maggiore stabilità, in tampone fisiologico, rispetto alla molecola naturale. Questo incremento di stabilità è legato alla ridotta elettrofilicità del gruppo lattone, causata dall'assenza di legami idrogeno. La semisintesi della homo-camptotecina è riportata in Schema 6.⁴⁵ Per trattamento con NaBH₄, la CPT genera il corrispondente lattolo, il quale viene ossidato con NaIO₄ per formare il corrispondente formil chetone **30**. L'omologazione della CPT avviene mediante reazione di Reformatsky con ^tButil bromoacetato e zinco che origina il corrispondente β -idrossi estere **31**, il quale, mediante trattamento con TFA ciclizza, formando la corrispondente hCPT **32** racema. I buoni risultati di attività esibiti da questo CPT-analogo ne hanno fatto un nuovo lead come antitumorale ed attualmente analoghi della hCPT sono in studio estensivo.⁴⁶



Schema 6. Semi-sintesi della Homo-camptotecina **32** proposta da Bigg.

Un'altra metodologia studiata per migliorare la stabilità della CPT verso il plasma umano è quella di sintetizzare delle pro-drugs sfruttando il gruppo 20-OH come sito d'attacco.

La "targeted drug delivery" costituisce ad oggi uno dei settori trainanti della ricerca.⁴⁷ Gli studi a tal riguardo sono indirizzati alla scoperta di nuovi e più efficienti metodi per rilasciare selettivamente il principio attivo nel sito d'azione. Le metodologie di rilascio

selettivo sono numerose. Un esempio è la coniugazione del principio attivo con scaffolds molecolari studiati “ad hoc”, quali peptidi, proteine ed acidi nucleici. Queste unità molecolari sono studiate in modo tale da essere selettivamente separate dal core farmacologico solo ed esclusivamente nel sito molecolare attivo. Un'altra metodologia ampiamente sfruttata è la veicolazione selettiva a mezzo di liposomi, emulsioni, polimeri cationici e micro/nano particelle.⁴⁸ Un sistema di drug delivery è costruito con lo scopo di migliorare il profilo farmacologico e terapeutico di un farmaco, questo perché in genere il farmaco “libero” ha una limitata solubilità acquosa, una bassa distribuzione, una scarsa selettività ed un profilo farmaco-cinetico sfavorevole che contribuisce al danneggiamento anche dei tessuti e degli organi sani.

L'uso di coniugati della CPT sta emergendo come una strategia interessante per migliorare ed ottimizzare gli effetti terapeutici della CPT stessa, sia per ciò che riguarda la stabilità dell'anello lattonico, che per il miglioramento della solubilità/lipofilia e della selettività. Attualmente due sono le metodologie impiegate per la preparazione sintetica di questi derivati: la prima sfrutta come sito reattivo il gruppo OH in posizione 20, mentre la seconda implica una funzionalizzazione “ad hoc” della molecola, ed in particolare degli anelli A e B.⁴⁹ Come accennato precedentemente il gruppo ossidrilico è stato utilizzato per generare una serie di derivati quali 20-*O*-acil esteri,⁵⁰ 20-*O*-carbonati,⁵¹ 20-*O*-carbammati. Tali analoghi hanno portato ad un aumento della stabilità dell'anello lattonico e ad una diminuzione della tossicità rispetto alla molecola parentale, ma soprattutto hanno evidenziato una prolungata attività *in vivo*.⁵² L'introduzione di sostituenti sul gruppo ossidrilico interferisce sul binding tra il farmaco e l'albumina a causa di un effetto sterico, inibendo così l'equilibrio di apertura/chiusura dell'anello E. Inoltre, si è visto che questi pro-drugs rilasciano nel tempo la molecola naturale CPT, questo a causa della presenza dell'enzima esterase, in grado di ripristinare la molecola nella sua forma parentale. Tale fenomeno è molto più frequente nel fegato e nelle cellule tumorali dove la velocità di degradazione è dipendente dal tipo di tumore.⁵³

2.2 SINTESI DI CONIUGATI TRIPARTATI

Un'altra metodologia, fino ad oggi poco studiata, per evitare la formazione di **1a**, è basata sulla creazione di coniugati della CPT con l'anello E aperto. Un simile sistema può

essere considerato come un nuovo ed efficace metodo di delivery. Questi derivati possono essere considerati come sistemi tripartati (costituiti da 3 unità; Figura 10), in quanto composti da i) un “carrier” legato in posizione 21 e studiato in modo tale da essere selettivamente idrolizzato all’interno del tumore; ii) un gruppo acile sul residuo 17-OH ed infine iii) il “core” camptotecinico.

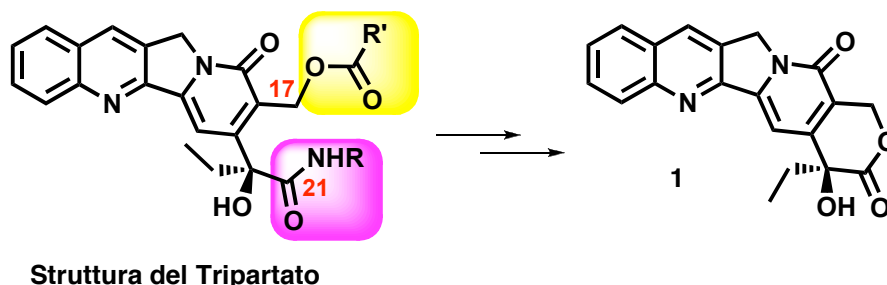


Figura 10. Struttura generale di un Tripartato Coniugato.

La sintesi di questi coniugati implica che le 21-ammidi-CPT (dipartati) siano sufficientemente stabili da poter essere isolate e consentire la successiva reazione di esterificazione sul residuo carbinolico in posizione 17, generando un derivato estere-ammidico stabile.⁵⁴ La caratteristica comune di questi sistemi è la loro stabilità in condizioni fisiologiche per diverse ore.

Il meccanismo di rilascio del farmaco è il seguente: il residuo acilico in posizione 17 subisce idrolisi enzimatica generando il corrispondente dipartato 17-CH₂OH-21-Ammido-CPT; il gruppo alcolico libero assiste anchimericamente l'idrolisi spontanea del gruppo ammidico, rigenerando il gruppo lattonico.⁵⁵ Questi coniugati tripartati sono potenzialmente delle pro-drugs altamente versatili, in quanto sia il residuo acilico che quello ammidico possono essere opportunamente modificati, così da ottenere derivati più selettivi. In letteratura sono riportati pochi esempi di coniugati tripartati della CPT, ed i relativi risultati biologici suggeriscono che la loro attività dipende fortemente dalla struttura sia dell'estere che dell'ammido.

Due efficienti sistemi basati sull'utilizzo del PEG, come CPT-tripartati **33** e **34** (Figura 11) mostrano una bassa attività *in vitro*.

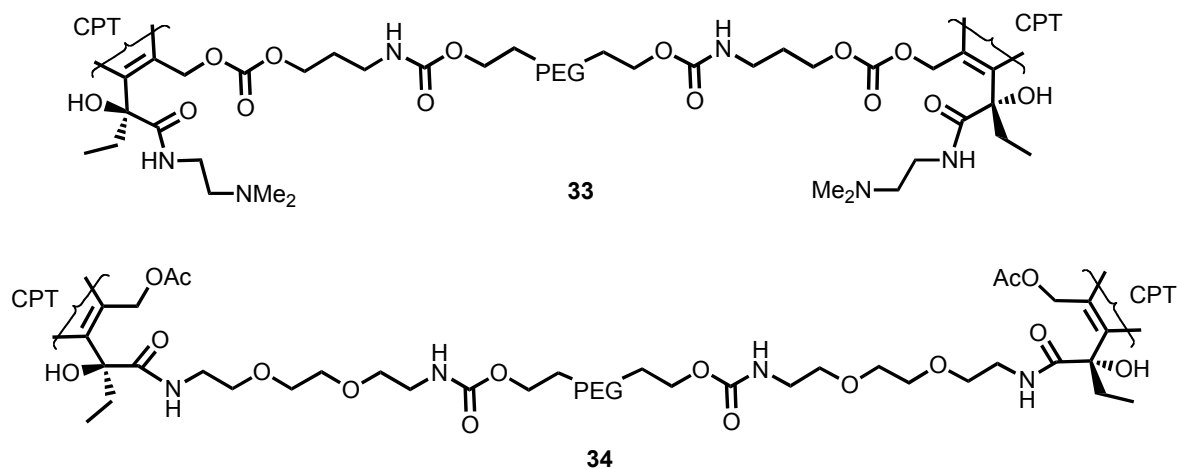


Figura 11. PEG-Tripartati **33** e **34**.

L'idrolisi iniziale genera il corrispondente dipartato non attivo e relativamente stabile, perciò la ciclizzazione, che teoricamente avviene all'interno della cellula tumorale, è lo stadio determinante nel rigenerare il lattone (secondo stadio del sistema dipartato).⁵⁶

Lo scenario è ulteriormente complicato quando composti sintetizzati per agire come pro-drugs, esibiscono un'attività antitumorale intrinseca. CPT tripartata **35** (Figura 12) ed altri analoghi che portano un residuo poliamminico come carriers in posizione 21, mostrano una citotossicità *in vivo* paragonabile alla molecola parentale CPT, nonostante l'anello E sia aperto.⁵⁷

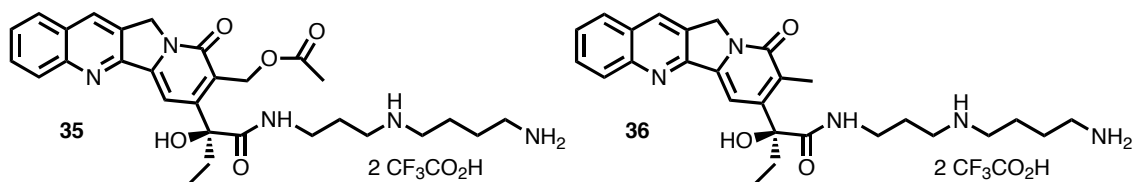


Figura 12. Struttura di Tripartati solubili in acqua.

Tale risultato non può essere legato alla lattonizzazione *in situ* del derivato, poiché nei saggi di cleavage del DNA, non si riscontra una quantità sufficiente di CPT a giustificare l'elevata attività del composto, pertanto, questi 17-*O*-Acetil-21-spermidinammide derivati potrebbero rappresentare i primi esempi di camptotecine attive con l'anello lattonico aperto. Una plausibile interpretazione dei dati biologici potrebbe essere che il residuo poliamminico consente un'interazione favorevole con il complesso ternario; quest'intuizione è supportata dall'analisi dei saggi di cleavage di **36** (Figura 12), il quale,

nonostante l'assenza del gruppo ossidrilico in 17 e quindi della possibilità di ripristinare la CPT, induce un danno al DNA paragonabile alla molecola parentale.⁵⁷

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Col fine di ottenere una nuova e più efficace classe di CPT con anello E aperto, abbiamo esplorato l'influenza dell'architettura del residuo poliamminico sull'attività dei derivati ottenuti.

Le poliammine (cadaverina, spermidina e spermina), sono biosintetizzate nel corpo umano e giocano un ruolo essenziale come regolatori della crescita delle cellule e della loro differenziazione.⁵⁸ Molti tipi di tumore contengono un elevato livello di poliammine ed una proteina di trasporto attivata (PAT), capace di importare poliammine dall'esterno.⁵⁹ Le poliammine a pH fisiologico sono protonate e possono interagire elettrostaticamente con il DNA.⁶⁰ Svariati tentativi di sfruttare le poliammine come carriers di farmaci sono riportati in letteratura.^{62b,c} Le ricerche effettuate hanno tentato di spiegare quale sequenza poliamminica sia la più adatta per facilitare il trasporto del farmaco all'interno della cellula tumorale.⁶¹ Tali studi, comunque, hanno evidenziato che piccoli cambiamenti strutturali nello scheletro poliamminico, influenzano fortemente la loro capacità di veicolazione.

Da un'analisi più dettagliata emerge che l'efficacia del sistema di trasporto è dipendente dal numero d'atomi di azoto presenti e dalla loro distanza relativa, ovvero dal numero di gruppi metilenici che intercorrono fra un gruppo amminico e l'altro.⁶²

Per il nostro scopo abbiamo usato le seguenti poliammine: etan-1,2-diammina **37**, spermidina **38**, homo-spermidina **39**, spermina **40** e 4,8,13,17-tetraza-icosan-1,20-diammina **41**. (Figura 13)

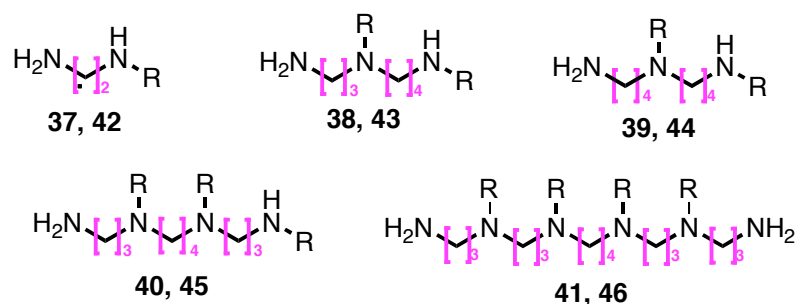
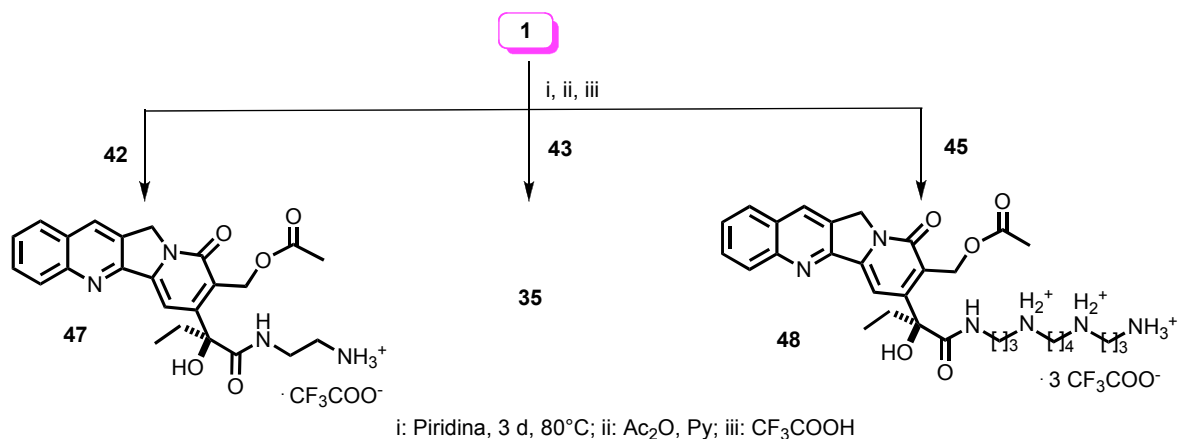


Figura 13. Strutture delle poliammine **37-41** e i loro derivati N-Boc **42-46**.

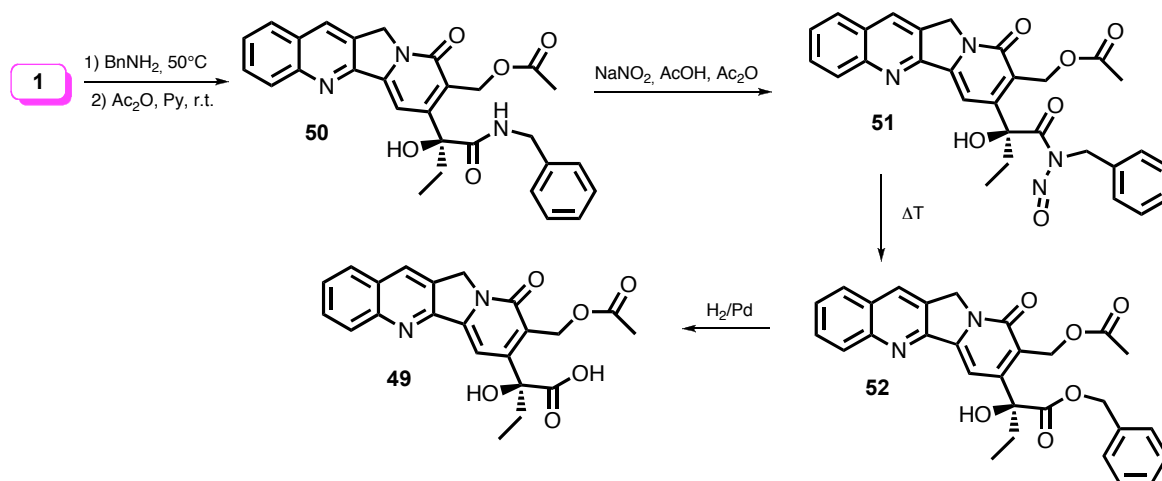
La reazione di ammidazione diretta della camptotecina **1** con le poliammine **42**, **43** e

45, è stata realizzata in piridina a 80°C, secondo una procedura modificata ed inizialmente messa a punto da Adamovics⁵⁴ (Schema 7). La successiva esterificazione della posizione 17-OH con Ac₂O genera i coniugati tripartati protetti, i quali vengono deprotetti con acido trifluoroacetico per generare i corrispondenti coniugati tripartati idrosolubili **47**, **35**, e **48**.



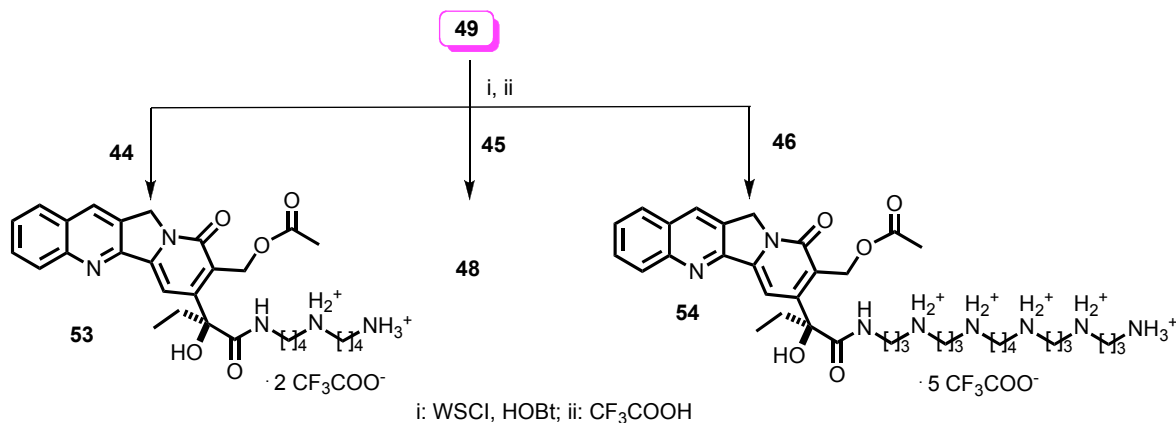
Schema 7. Reazione della CPT con poliammine **42-45**.

Sperimentalmente si osserva che la resa chimica della reazione fra la CPT e le poliammine **42**, **43** e **45** diminuisce con l'aumentare della lunghezza della catena poliamminica; infatti, passando da **42** a **45** la resa va dall'88 al 10%. Nessuno fra i vari tentativi di coupling con la poliammina **46** ha condotto all'isolamento del prodotto desiderato. Questo insuccesso, unito alla bassa resa di formazione del tripartato **48**, ci ha spinto ad esplorare un protocollo più efficiente per la reazione di ammidazione. A tale scopo abbiamo pensato che l'acido 17-*O*-acil camptotecinico **49** potesse essere un ottimo precursore. L'acido camptotecinico **49** viene estratto ed isolato dalla pianta *Nothapodytes foetida*, ma può anche essere ottenuto per via sintetica mediante acilazione del corrispondente sale sodico con Ac₂O in DMF.⁶³ Tentativi di riprodurre tale approccio semi-sintetico ci ha condotto alla sintesi di **49**, ma con una resa non superiore al 10%, pertanto è stato necessario sviluppare una semi-sintesi alternativa. In particolare, la metodologia da noi messa a punto prevede la reazione di **1** con benzilammina, seguita da acetilazione dell'idrossi gruppo libero con Ac₂O per generare il derivato **50** (Schema 8).



Schema 8. Sintesi dell'acido 17-*O*-Acetil Camptotecinico (**49**).

La nitrosazione di **50** con NaNO_2 , in presenza di una miscela di AcOH e Ac_2O genera la corrispondente *N*-nitroso amide **51**, la quale riarrangia termicamente per dare il corrispondente benzil estere **52**. La successiva riduzione del gruppo benzilico con H_2/Pd fornisce l'acido camptotecinico **49** con una resa complessiva su 4 passaggi superiore all'80%. La successiva reazione di amidazione con le poliammine **44**, **45**, e **46** in presenza di WSCI (Water Soluble CarbodiImide) ed 1-idrossi benzotriazolo (HOBT) (Schema 9), ha portato all'isolamento dei corrispondenti coniugati tripartati protetti. Per trattamento con TFA si ottengono i prodotti target **53**, **48**, e **54**.



Schema 9. Reazione dell'acido 17-*O*-Acetil camptotecinico con poliammine **44-46**.

2.4 VALUTAZIONI BIOLOGICHE E BIOCHIMICHE

L'attività citotossica di questi nuovi derivati tripartati è stata valutata sulla linea cellulare NCI-H460, (tumore polmonare), (Tabella 2).⁶⁴ La diminuzione di potenza di tutti i derivati poliamminici rispetto al topotecan, al SN-38 e alla CPT è probabilmente dovuta ad un limitato assorbimento del coniugato come sale idrosolubile.

Tabella 2. Attività antiproliferativa dei coniugati tripartati in cellule H460 IC₅₀ (mM)

| | 1h exposure | 72h exposure | F.I. |
|------------------|-------------|---------------|------|
| Topotecan | 1.18±0.24 | 0.015±0.0027 | 79 |
| SN38 | 0.22±0.013 | 0.012±0.001 | 18 |
| CPT | 0.18±0.01 | 0.0059±0.0024 | 30 |
| 47 | 6.04±1.97 | 0.0023±0.0004 | 2600 |
| 35 | 3.66±0.34 | 0.048±0.0075 | 76 |
| 48 | 2.1±1.85 | 0.077±0.019 | 28 |
| 53 | 7.7±3.6 | 0.12±0.03 | 64 |
| 54 | 1.44±0.38 | 0.17±0.027 | 8.5 |

Sebbene tutti i coniugati mostrino un'attività molto scarsa dopo 1 h di esposizione al tumore, l'effetto antiproliferativo aumenta nel controllo eseguito dopo 72 h. In particolare, il composto **47**, dopo le 72 h, mostra un'attività superiore ai composti di riferimento. Oltre i test di citotossicità, i vari coniugati sono stati analizzati nei saggi di cleavage Topoisomerasi I-DNA, per investigare la loro abilità nel conferire un danno sostanziale al DNA. La topoisomerasi I umana purificata è stata usata insieme al SN38 come composto di riferimento (Figura. 14A). Il composto **47** esibisce un danno al DNA simile al farmaco di riferimento, mentre i composti **35** e **48** mostrano un danno al DNA leggermente inferiore ad SN38. Invece, i derivati **53** e **54** sono sostanzialmente poco efficaci.

Oltre ai saggi di cleavage, si è valutata la capacità dei coniugati tripartati a stabilizzare il complesso ternario. Dopo l'aggiunta di un'alta concentrazione salina (0.6M NaCl), la quale favorisce la dissociazione del complesso ternario Topo I-DNA-Drug, è stato possibile estrapolare il dato di persistenza del danno (Figura 14B). Come evidenziato in Figura 14B

tutti i coniugati rivelano una persistenza del danno al DNA simile al SN38. La migliore attività è stata ottenuta con il tripartato **35**. L'introduzione della homo-spermidina produce una riduzione nella persistenza del danno sul DNA rispetto alla spermidina (**53 vs 35**); anche la spermina si è dimostrata meno capace di indurre danno al DNA rispetto la spermidina (**48 vs 35**).

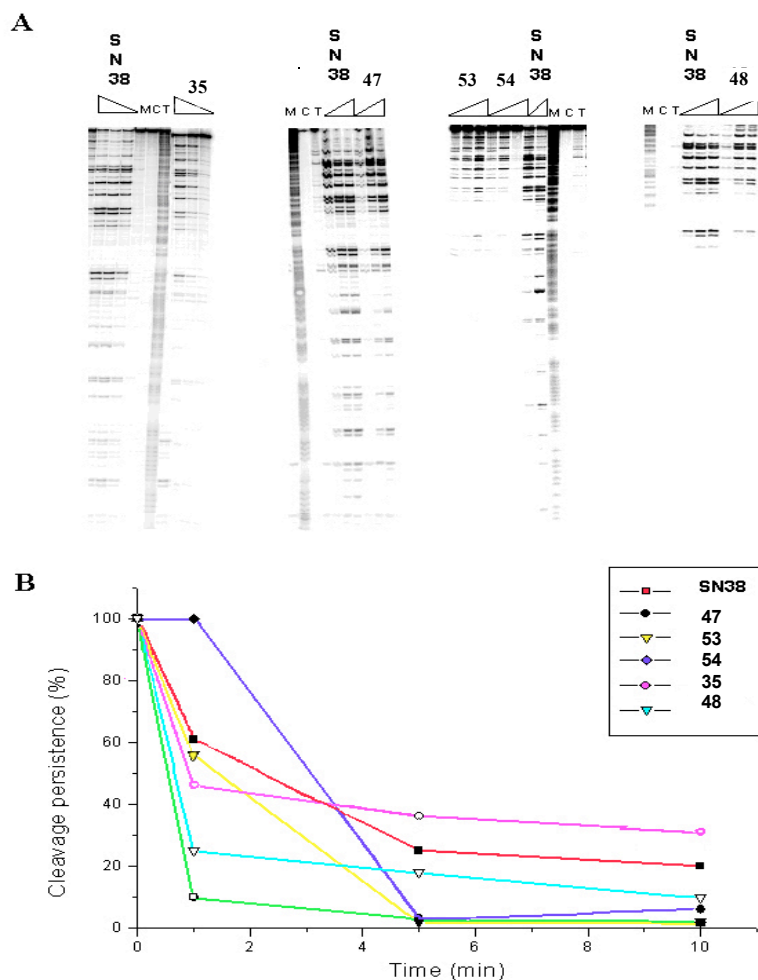


Figura 14. A) Saggi di cleavage dei coniugati tripartati con il complesso binario.

B) Persistenza del danno indotto dai vari tripartati.

Il composto **47**, invece, si è mostrato il meno efficiente nello stabilizzare il danno al DNA. Da un'analisi completa dei risultati raccolti si osserva che, dopo 72 ore, **47** è il più attivo tra i derivati sintetizzati, mentre **35**, **48**, **53**, e **54**, ossia i derivati con maggiore carica, sono meno efficaci. Al contrario, dopo 1 h di esposizione, i dati di attività mostrano un

andamento opposto e la molecola più attiva risulta essere il tripartato con catena poliamminica più lunga **54**.

L'alta attività antiproliferativa osservata per **47** dopo esposizione a tempi lunghi, suggerisce una maggiore capacità di questo coniugato nel promuovere la chiusura dell'anello E, rigenerando la molecola naturale. Questa caratteristica è supportata dai dati riportati in Tabella 2, dove si può osservare la stessa attività sia per **47** che per CPT.

2.5 CONCLUSIONI

I risultati presentati in questo studio evidenziano che analoghi della CPT con anello E aperto, possono manifestare una discreta attività antitumorale. Tuttavia, questa risulta essere marcatamente dipendente dalla tipologia del sostituente poliamminico. L'introduzione di un residuo poliamminico adatto genera un derivato con la capacità di inibire la crescita del tumore, superiore ai farmaci di riferimento, ed intrinsecamente possiede l'abilità di stabilizzare il complesso ternario. Inoltre, la natura del sostituente gioca un ruolo cruciale nel promuovere un rapido accumulo intracellulare del farmaco, generando un effetto citotossico ottimale. Questo comportamento farmaco-cinetico è determinate per avere un'attività antitumorale efficace, poiché, per ottenere un effetto apoptotico sulla cellula malata, è necessaria un'adeguata concentrazione intracellulare del farmaco. L'architettura del residuo poliamminico è importante per avere attività antitumorale, mentre il bilanciamento delle proprietà lipofile/idrofile delle poliammine è cruciale per la potenza del coniugato tripartato.

CAPITOLO 3

MODIFICHE ANELLO C

3.1 INTRODUZIONE

Sino ad oggi gli studi di struttura-attività (SAR) relativi a nuovi analoghi della camptotecina si sono essenzialmente incentrati su due punti chiave: le modifiche agli anelli A e B, per favorire un aumento dell'attività citotossica e le modifiche all'anello E per aumentare la stabilità dei derivati in condizioni fisiologiche. Al contrario, una dettagliata analisi dei dati di letteratura, rivela che pochi sono gli studi relativi alle modifiche strutturali all'anello C, probabilmente a causa della bassa attività antineoplastica mostrata dai primi derivati riportati (Figura 15).^{65a,b}

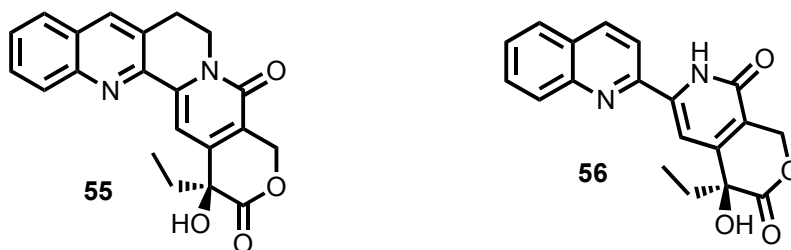


Figura 15. Analoghi della CPT modificati al C₅

L'incapacità di **55** e **56** di stabilizzare il complesso binario covalente è attribuibile alla perdita di planarità del sistema ABCD, caratteristica che pare essere fondamentale per l'efficacia farmacologia dei CPT analoghi. Le prime modifiche semi-sintetiche effettuate da Sawada portarono all'isolamento di una nuova serie di camptotecine modificate in posizione 5, ossia, 5-idrossi-, 5-alcossi- e 5-acetossi-CPT.⁶⁶

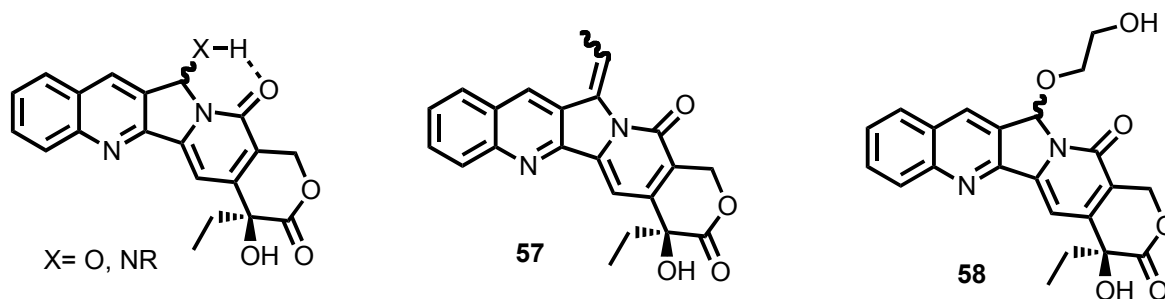


Figura 16. Strutture di derivati al C5 con un attività farmacologica superiore alla CPT.

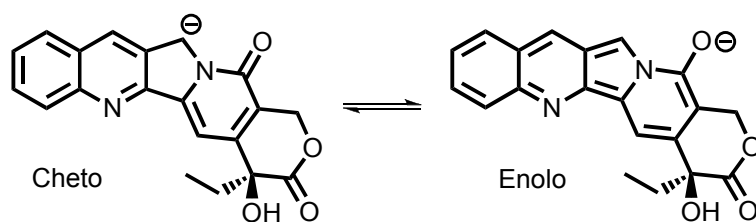
Tests *in vitro* di tali derivati, eseguiti sulla linea cellulare L1210, mostrarono una diminuzione dell'attività rispetto la molecola naturale. Un analogo comportamento è stato osservato per i 5-ammino derivati, che hanno evidenziato una diminuzione di attività antitumorale rispetto alla camptotecina, ad eccezione della metil ammina e dell'idrossil ammina derivati che hanno manifestato una buona attività biologica ed una discreta solubilità.⁶⁷

La bassa attività evidenziata dagli analoghi modificati al carbonio in posizione 5 potrebbe essere legata o all'inibizione del docking nella formazione del complesso ternario, oppure alla formazione di un legame intramolecolare a idrogeno, tra il sostituito al C₅ ed il doppietto elettronico del gruppo piridonico (Figura 16).⁶⁸ A supporto di tali considerazioni, è il comportamento del derivato 5-etilene-CPT **57** (Figura 16), il quale ha mostrato un'attività biologica superiore a quella della molecola naturale.⁶⁹ L'introduzione di un gruppo etilenico in posizione 5, infatti, non altera la planarità della molecola. Inoltre, la natura del sostituito non consente la formazione di alcun ponte ad idrogeno intramolecolari con il farmacoforo (gruppo piridonico).

Altre modifiche della posizione 5 della camptotecina hanno fornito risultati contraddittori: ad esempio alcuni 5-alcossi derivati⁷⁰ recanti o il residuo 2,2,2-trifluoroetossi o 2-idrossietossi (**58**), hanno evidenziato una attività antineoplastica interessante ed attualmente **58** è in fase clinica II.⁷¹ Alcuni derivati 5-ammino-camptotecinici hanno capacità inibitoria verso il fattore HIF-1 α dell'ipossia. L'ipossia è una caratteristica comune di molti tumori solidi e contribuisce allo sviluppo dei fenomeni di resistenza al trattamento chemioterapico, contribuendo così alla progressione del tumore.⁷²

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

La facile rimozione del protone in posizione 5 è stata dimostrata dallo scambio idrogeno/deuterio ed idrogeno/trizio,⁷³ oltre che dalla sintesi di un limitato numero di derivati 5-alchilici ottenuti in condizioni basiche.⁷⁴ Le modifiche strutturali all'anello C sono possibili grazie alla formazione di un enolato, che è reso particolarmente stabile dalla delocalizzazione della carica negativa sugli anelli ABCD (Schema 10).



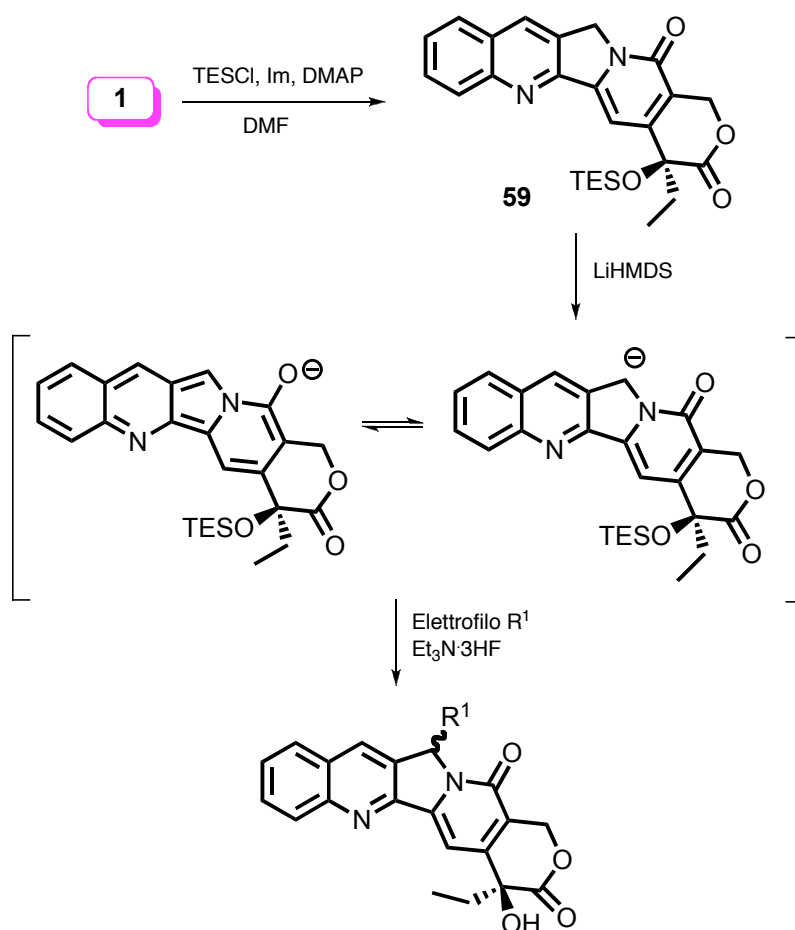
Schema 10. Tautomeria Cheto-enolica della CPT indotta da base.

Tuttavia, tale peculiare reattività è stata sfruttata solo per la sintesi di alcuni alchil derivati,⁷⁵ mentre tutti gli altri analoghi 5-idrossi⁷¹ e 5-ammino CPT⁶⁸ sono stati ottenuti in condizioni ossidative ed altri alchil analoghi sono stati preparati mediante reazione di Wittig, effettuata sulla 5-idrossi CPT, sfruttando la reattività del gruppo emi-amminale.⁷⁵

Al contrario, noi abbiamo sviluppato un protocollo sintetico estremamente versatile, basato sulla chimica dell'enolato in posizione 5, che consente di ottenere una più diversificata gamma di C5-analoghi. In particolare abbiamo approfondito le seguenti reazioni elettrofile: alchilazione, amminazione, ossidrilazione e fluorurazione.

Il primo passaggio della sequenza sintetica da noi proposta (Schema 11), prevede un'iniziale adeguata protezione del gruppo 20-OH. In letteratura sono riportate diverse protezioni della funzionalità ossidrilica, quali la formazione del 20(*S*)-*O*-estere, o del 20(*S*)-*O*-etere. Tuttavia, questi gruppi protettori hanno lo svantaggio di essere difficilmente rimovibili, richiedendo condizioni acide o basiche alquanto spinte.

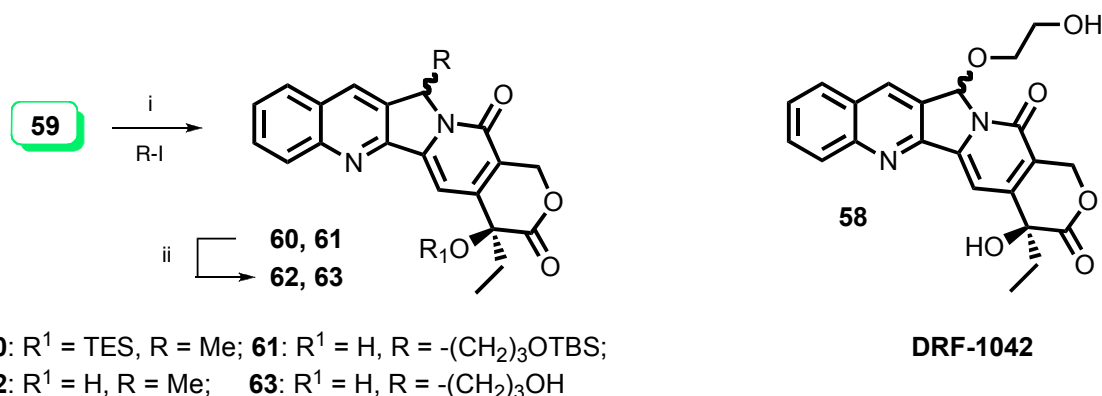
Pertanto, abbiamo pensato di utilizzare un gruppo protettore sililato poiché è noto che tali sistemi, possono essere introdotti e rimossi con notevole facilità. Trattando la CPT con TESCl in DMF, in presenza di un eccesso di imidazolo e DMAP, si è ottenuta la 20-OTES-CPT in resa quantitativa. La formazione del sililetere **59** ne favorisce notevolmente la solubilità in solventi eterei rispetto ad **1**, consentendo di eseguire le successive funzionalizzazioni in condizioni blande. Per trattamento di **59** con LHMDS -80°C in THF anidro, si ottiene il corrispondente litio enolato **59a** il quale per reazione con un elettrofilo, genera il corrispondente C5-CPT-analogo come miscela di epimeri α/β , i quali, nella maggior parte dei casi, possono essere separati. La successiva rimozione del gruppo silicio origina i targets desiderati (Schema 11).



Schema 11. Protocollo sintetico di derivatizzazione al C₅ attraverso la via enolato.

3.2.1. ALCILAZIONE: Nel caso delle reazioni di alchilazione, gli elettrofili da noi selezionati sono stati il MeI ed il *ter*-butil (3-iodopropossi)dimetilsilano (Schema 12). Le condizioni di reazione per l'introduzione del gruppo alchilico sono diverse da quelle precedentemente riportate. In questo caso infatti, è stato necessario utilizzare un solvente più polare, quale la DMF, ed il potassio *ter*-butossido come base.⁷⁶ I composti **60** e **61** sono stati ottenuti con una resa modesta (40 e 41 % rispettivamente) e come miscela diastereomerica inseparabile in rapporto 1:1. La rimozione quantitativa sia del trietil silile che del *tert*-butil dimetil silile, genera i corrispondenti analoghi **62** e **63** come miscela α/β -epimerica in rapporto 1:1. E' da sottolineare che il prodotto 5(*RS*)-(3-idrossipropil)-20(*S*)-CPT (**63**), è il carbo-isostere del composto DRF-1042 (**58**), il quale, come già precedentemente riportato, è un agente antitumorale in fase clinica II e sviluppato per la

cura dei tumori solidi resistenti.⁷⁷ L'analogo **63** ha quindi le potenzialità per essere citotossico ed allo stesso tempo più resistente alla degradazione enzimatica, dell'analogo **58**.



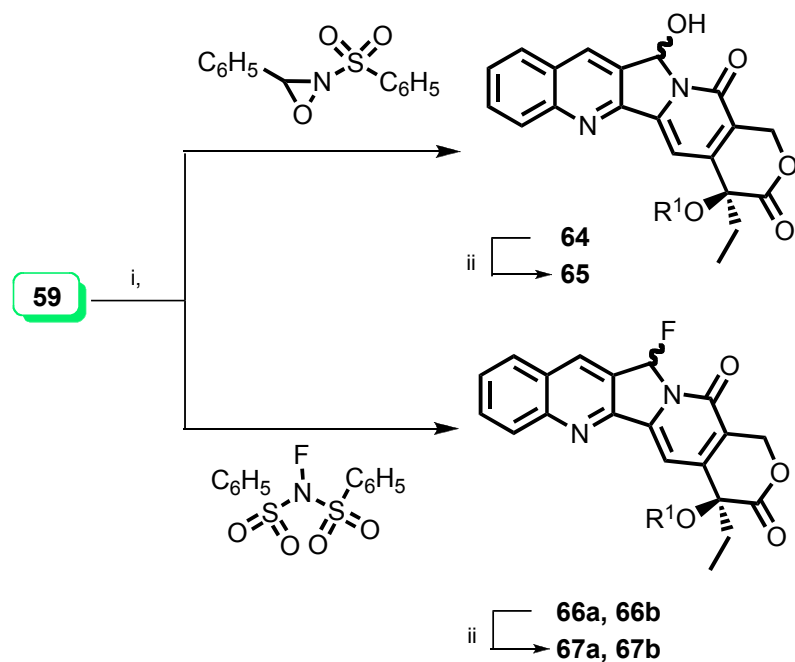
i.: ^tBuOK, DMF, 0°C, **R-I**; ii: Et₃N·3HF, THF, 20 °C, 35-40 h.

Schema 12. Sintesi delle 5-alkil Camptotecine.

3.2.2. IDROSSILAZIONE: La 5-OH-CPT è già stata riportata in letteratura ed è stata ottenuta mediante una reazione di ossidazione diretta della CPT eseguita o con cerio ammonio nitrato (CAN),⁷⁸ o FeCl₃,⁷¹ oppure I₂⁷⁷ in soluzione alcolica ed in presenza di H₂SO₄. La 5-OH-CPT è intermedio chiave per la sintesi di una serie di analoghi derivatizzati in posizione 5 quali: 5-ammino, 5-alcossi, 5-acilossi e 5-alchilderivati.^{68,71,76} Sfruttando la metodologia dell'enolato da noi messa a punto, è stato possibile introdurre la funzionalità ossidrilica in modo diretto, utilizzando come fonte elettrofila un'ossaziridina.⁷⁹ Come riportato in Schema 13 infatti, il derivato **64** viene ottenuto con resa quantitativa. La successiva rimozione del gruppo silile genera il derivato eterosostituito **65** come miscela epimerica (1:1) non separabile (Schema 13).

3.2.3. FLUORURAZIONE. E' noto che, in molti casi, la sostituzione di un atomo di idrogeno con uno di fluoro in molecole organiche, porta a considerevoli variazioni delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche dei composti stessi.⁸⁰ Generalmente questa sostituzione porta alla formazione di molecole biologicamente più attive, e il derivato più interessante è l'antimetabolita 5-Fluoro Uracile (5-FU) usato attualmente nel trattamento del tumore al colon; pertanto la sintesi di derivati fluorurati è una metodologia ampiamente esplorata in campo accademico,⁸¹ nonché sfruttata a livello industriale.⁸² Per ottenere la 5-fluoro

camptotecina abbiamo utilizzato *N*-Fluorobenzenesulfonimide (NFSI), quale elettrofilo da far reagire con l'enolato **59**. La reazione genera il prodotto in resa quantitativa e come miscela 1/1 di diastereoisomeri, i quali sono stati separati mediante colonna cromatografia di gel di silice (Schema 13). A nostra conoscenza questo è il primo esempio di camptotecina modificata in posizione 5 con un gruppo alogeno. La deprotezione del sililetere precursore genera i due diastereoisomeri 5-F-CPT (**67a** e **67b**) con resa quantitativa (Schema 13).



64, 66a, 66b: $R^1 = \text{TES}$, **65, 67a, 67b:** $R^1 = \text{H}$

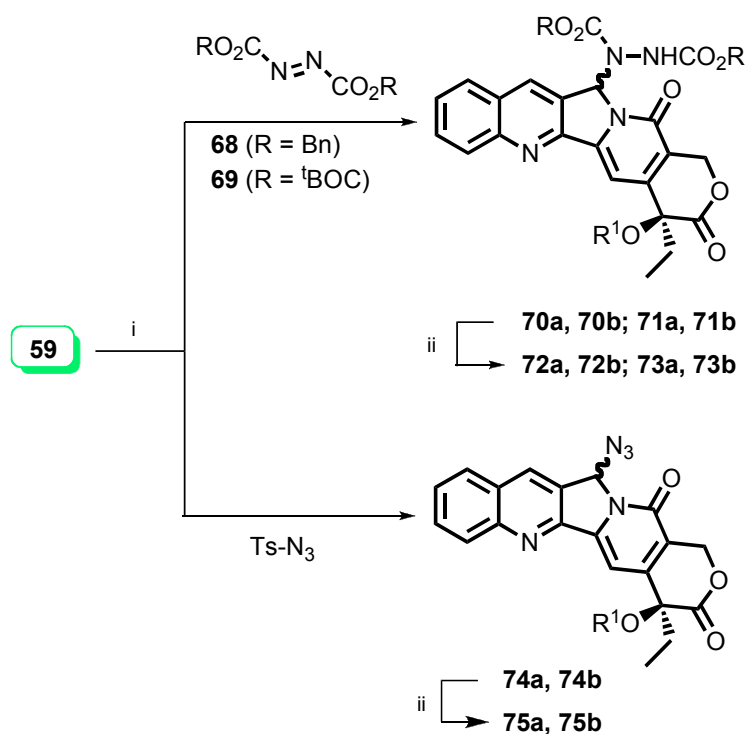
i.: LiHMDS, THF, -78°C ; ii: $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$, THF, 20°C , 35-40 h.

Schema 13. Sintesi di 5-OH-CPT (**65**) e di 5-F-CPT (**67a** e **67b**).

3.2.4. AMMINAZIONE. Come già descritto in precedenza, analoghi della camptotecina modificati in posizione 5 con un ammino gruppo sono già stati riportati.^{68,73} La procedura che conduce al loro ottenimento prevede l'attacco nucleofilo alla funzionalità emi-amminale della corrispondente 5-OH-CPT, con concomitante sostituzione del gruppo OH ed inserimento della funzionalità amminica.

Al contrario, la metodologia da noi applicata prevede l'uso di reattivi di amminazione elettrofila da far reagire con l'enolato **59a**. In particolare abbiamo selezionato, quali

reagenti elettrofilici, il dibenzil-azadicarbossilato **68** ed il di-*tert*-butil-azadicarbossilato **69** (Schema 14).



$\text{R}^1 = \text{TES}$: **70a, 70b** (R = Bz), **71a, 71b** (R = *t*BOC), **74a, 74b**
 $\text{R}^1 = \text{H}$: **72a, 72b** (R = Bz), **73a, 73b** (R = *t*BOC), **75a, 75b**

(i): LiHMDS, THF, -78°C ; (ii): $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$, THF, 20°C , 35-40 h.

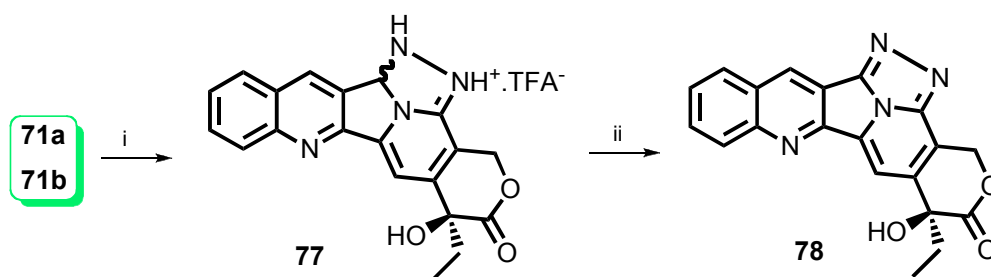
Schema 14. Amminazione elettrofila della CPT

La reazione genera i corrispondenti 5-idrazino derivati **70** e **71**, entrambi ottenuti come miscela epimerica in rapporto 1:1; la separazione dei diastereoisomeri è stata effettuata mediante cromatografia su silice, consentendo di isolare le seguenti coppie di epimeri, **70a, 70b**, e **71a, 71b**. Sebbene gli idrazino derivati possano essere considerati come precursori della funzionalità amminica, la loro conversione non è mai stata tentata. La rimozione del gruppo sililico ha fornito i rispettivi 5-idrazo-CPT **72a, 72b** e **73a, 73b**.

Sempre in ambito di funzionalizzazione amminica della posizione 5, abbiamo considerato la possibilità di inserire l'azido gruppo. Fra i vari reattivi di tipo elettrofilico utilizzati per l'introduzione di tale funzionalità, abbiamo selezionato la tosil azide, in quanto stericamente poco ingombrata. Un'attenta analisi delle condizioni di reazione, al fine di

evitare l'inserzione del diazo piuttosto che dell'azide,⁸³ ha consentito l'ottenimento dei 5-azido derivati, come miscela diastereomerica in rapporto 1:1. Accanto ad essi sono state isolate tracce di bis-azido derivato **76** (Tabella 3). Gli epimeri **74a**, **74b** sono stati separati mediante cromatografia; la successiva rimozione del gruppo silile ha fornito i corrispondenti derivati 5-azido-CPT **75a** e **75b**.

La natura degli epimeri **71a** e **71b** ci ha fatto riflettere sulla possibilità di sintetizzare un nuovo analogo della camptotecina recante 6 anelli condensati, anziché 5. Considerando la natura di **71**, infatti, è possibile immaginare che il gruppo amminico del diazo derivato condensi con il piridone dell'anello D, generando un sesto anello di tipo triazolinico. Tale obiettivo è stato raggiunto facendo reagire la miscela di epimeri **71a/71b** con acido trifluoroacetico, il quale induce la rimozione del gruppo BOC e la concomitante ciclizzazione sull'anello D, originando una miscela diastereomerica di 5,17-diidro-4,17,18-triazolo **77**. L'ossidazione di **77** con DDQ fornisce l'analogo esaciclico **78** in resa quantitativa. (Schema 15)



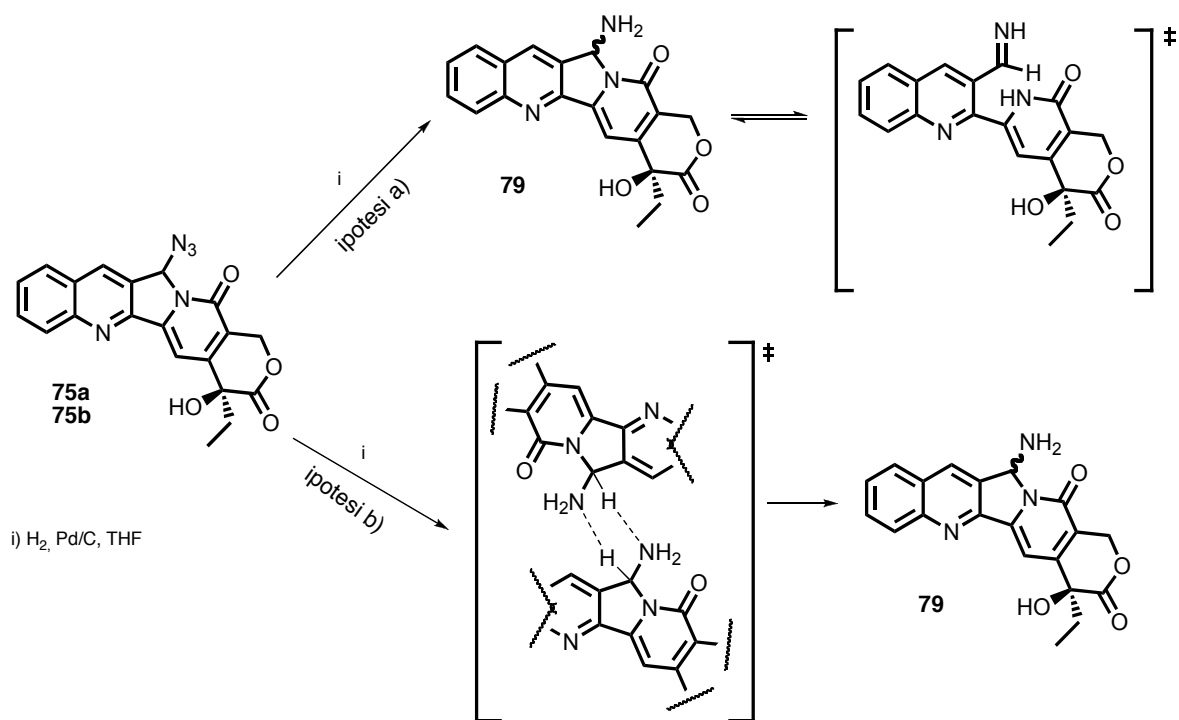
i: TFA, 20 °C, 20 h, 80%; ii: DDQ, THF, 60 °C, 3 h, 95%

Schema 15. Semi-sintesi del derivato **78**.

Il composto **78** risulta essere il primo fra i composti camptotecinici noti, che presenta una modifica strutturale all'anello D ed ottenuto per via semi-sintetica; inoltre la molecola è completamente planare, e proietta fuori dallo scheletro camptotecinico un atomo di azoto, che potrebbe rivelarsi utile nello stabilizzare il complesso ternario.

Quale ultima modifica strutturale alla posizione 5, abbiamo, infine, sintetizzato la 5-ammino-CPT (**79**), per trattamento di **75** con H₂ su Pd/C. (Schema 16) La reazione eseguita sugli epimeri **75a** e **75b** separatamente, ha in ogni caso condotto all'isolamento di **79** come miscela 1/1 di epimeri. Nello Schema 16 sono riportati due possibili meccanismi che potrebbero rendere conto dell'epimerizzazione in posizione 5. Il primo (a) si basa sul

possibile equilibrio fra la 5-NH₂-CPT e la corrispondente forma imminica (meccanismo simile a quello dell'emi-amminale); mentre la seconda ipotesi (b) si basa su un meccanismo intermolecolare secondo il quale, il doppietto presente sull'azoto dell'ammina libera sarebbe in grado di strappare il protone in posizione 5 con conseguente riequilibrio del derivato in forma epimerica. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per far luce sulla natura di questo meccanismo.



Schema 16. Ipotesi di epimerizzazione di (75a, 75b) durante riduzione.

3.3 VALUTAZIONI BIOLOGICHE E BIOCHIMICHE

3.3.1. ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA. L'attività antiproliferativa dei nuovi derivati funzionalizzati in posizione 5 è stata valutata sulla linea tumorale NCI-H460. Come mostrato in Tabella 3, tutti i composti sintetizzati hanno una potenza citotossica inferiore a quella dei due farmaci di riferimento utilizzati negli esperimenti, ossia SN38 e topotecan. Inoltre, dai dati riportati appare evidente che, ad eccezione della coppia **67a/67b**, uno dei due diastereoisomeri risulta essere sempre più attivo dell'altro (**75a vs 75b**, **73a vs 73b**, **72a vs 72b**). I composti più attivi della serie sono risultati essere gli azido derivati **75a** e **75b**, mentre la presenza di 2 azido gruppi non produce alcuna sostanziale differenza sull'attività

biologica (**76** vs **75a** e **75b**), al contrario il valore di IC₅₀ mostrato risulta essere un media dei due composti presi separatamente.

Tabella 3. Attività antiproliferativa delle CPT-5-analoghe sulle cellule NCI-H460.

| | IC ₅₀ (µg/mL) | |
|------------------|-------------------------------------|---------------------|
| | 1 h exposure | 72 h exposure |
| Topotecan | 0.28±0.16 | 0.0040±0.001 |
| SN38 | 0.051±0.0018 | |
| 62 | 2.15 | 0.2 |
| 63 | 6.5 | 0.65 |
| 65 | già riportato in letteratura | |
| 67a | 20.6 | 0.37 |
| 67b | 20.6 | 0.62 |
| 72a | 55 | |
| 72b | 39 | |
| 73a | >100 | |
| 73b | 50 | |
| 75a | 4.48 | |
| 75b | 2.59 | |
| 76 | 4.0 | |
| 77 | 17 | |
| 78 | 3.8 | |
| 79 | 11 | |

La presenza del metile in posizione 5 (**62**) produce un parziale guadagno in potenza citotossica, mentre gruppi di natura idrofila, come ad esempio l'amino gruppo e l'idrossi gruppo, **79** e **63** rispettivamente, inducono un peggioramento dell'attività.

Inaspettatamente, i composti più idrofobi (**72a**, **72b**, **73a** e **73b**) si sono rivelati i meno attivi. Tale comportamento risulta essere particolarmente anomalo, dal momento che la capacità di superare la membrana plasmatica e' favorevolmente influenzata dalla lipofilia. Probabilmente gruppi stericamente ingombranti in posizione 5 interferiscono

negativamente sull'interazione con il complesso binario (Topo I-DNA).

Confrontando i dati relativi ad i composti **77** e **78** si osserva che, la presenza di un sesto anello "triazolinico" aromatico genera un incremento dell'attività citotossica di circa 5 volte, rispetto al corrispondente sostituente non aromatico.

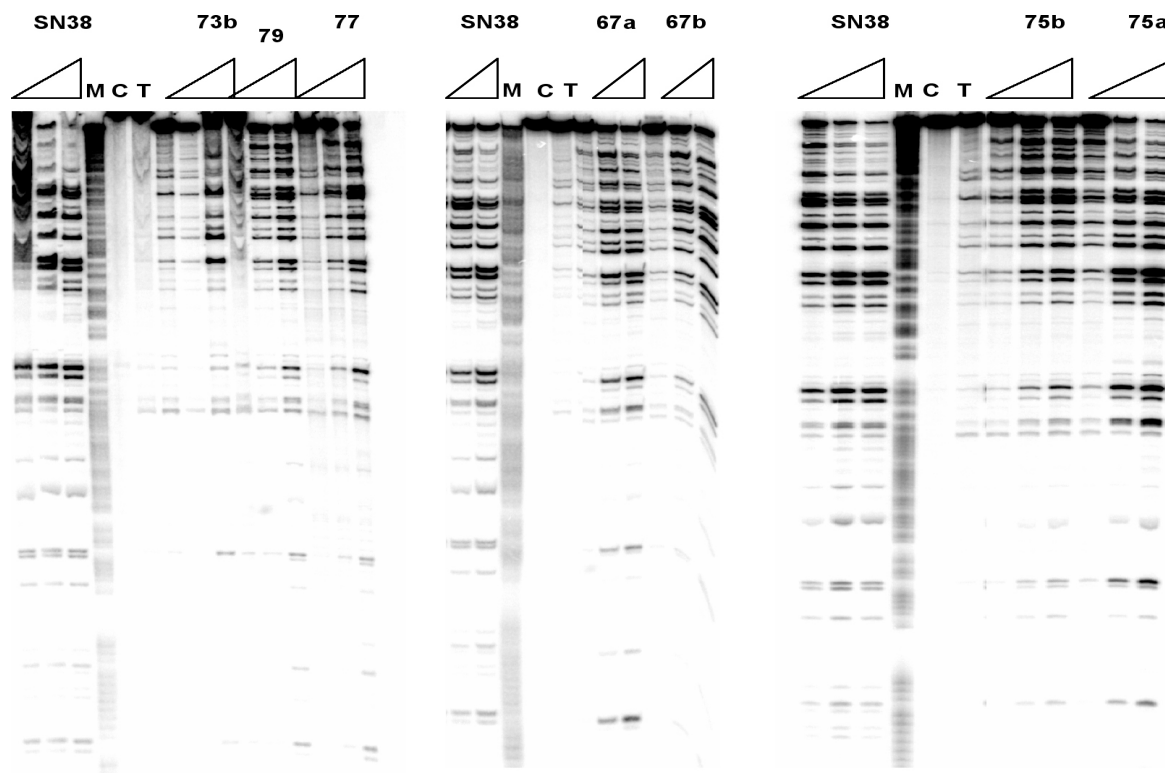


Figura 17. Saggi di cleavage di Topo I-DNA relativi ai composti 5-analoghi-CPT.

La non elevata citossicità del derivato **78**, tuttavia potrebbe essere causata o dalla sostituzione dell'atomo di ossigeno del residuo piridonico farmacoforo con l'atomo di azoto, la quale comporterebbe ad una ridotta capacità di **78** di stabilizzare il complesso binario; oppure dalla presenza dell'atomo di azoto in posizione 5, proiettato fuori dalla struttura camptotecinica, il quale potrebbe inibire la stabilizzazione del complesso Topo I-DNA.

3.3.2. ESPERIMENTI DI DANNO AL DNA. La topoisomerasi IB umana purificata è stata utilizzata per valutare la capacità dei C5-CPT analoghi nel danneggiare il DNA. Questi esperimenti hanno mostrato che l'intensità del danno prodotto ha un andamento paragonabile alla potenza citotossica (Figura 17). Sebbene i composti **67a** e **67b** abbiano

esibito una scarsa attività antiproliferativa, hanno evidenziato una buona abilità nel danneggiare il complesso binario. Attività citotossica ed intensità di danno prodotto sono invece paragonabili per il derivato **73b** che, infatti, risulta essere poco attivo sia nell'inibire la proliferazione cellulare che nel danneggiare il DNA. E' possibile che l'ingombro sterico al C₅ sia tale da impedirne il corretto inserimento a livello di sito attivo. E' importante osservare che la presenza di un gruppo amminico (**79**) o di un gruppo triazolico non aromatico (**77**) produce effetti molto simili sia per quanto riguarda la citotossicità che per l'intensità del danno prodotto.

3.4 CONCLUSIONI

I risultati presentati in questo studio evidenziano che analoghi della CPT modificati nell'anello C, possono manifestare una buona attività antitumorale. Tuttavia, questa risulta essere marcatamente dipendente dalla tipologia del sostituente. Pertanto, l'introduzione di gruppi voluminosi in posizione 5 come per gli analoghi **72a**, **72b**, **73a** e **73b**, produce un elevato ingombro sterico tale da compromettere la corretta interazione con il complesso binario, come si può notare dai dati di IC₅₀ presentati in tabella 3. Anomalo è il comportamento del derivato 5-F-CPT (**67a** e **67b**), per il quale nonostante l'isosteria tra atomo di fluoro e di idrogeno, si ha una riduzione dell'attività biologica di circa 50 volte. Probabilmente l'effetto elettronegativo del sostituente è tale da destabilizzare il complesso ternario. L'introduzione del residuo azido **75a** e **75b** genera dei derivati molto attivi, presumibilmente il comportamento dipolare dell'azide è capace di interferire con il complesso binario generando ponti idrogeno intermolecolari. L'introduzione di un anello aggiuntivo "triazolico" (derivato **78**) produce un analogo con potenza 10 volte inferiore all'SN38. In conclusione abbiamo sviluppato e messo a punto un protocollo di reazione generale per l'addizione elettrofila (amminazione, ossidrilazione, alchilazione, fluorurazione) alla posizione 5. Gli analoghi ottenuti mostrano un'attività antitumorale buona, ed il composto **78** è il primo fino ad oggi riportato, recante una modifica semi-sintetica all'anello D.

CAPITOLO 4

MODIFICHE ANELLO D

4.1 INTRODUZIONE

La SAR ha fatto enormi progressi nella delucidazione degli elementi strutturali necessari al fine di creare un analogo con una più alta potenza citotossica. A tutt'oggi solo pochi studi riportano modifiche strutturali all'anello D, e la maggior parte di essi interessa le posizioni 14 e 4. Tali molecole sono state ottenute mediante sintesi totale, ed in particolare si fa riferimento agli analoghi 14-cloro- (**80**),⁸⁴ 14-aza- (**81**),⁸⁵ 4-deaza- (**82**)⁸⁶ e 14-nitro- (**83**)⁸⁷ camptotecine (Figura 18).

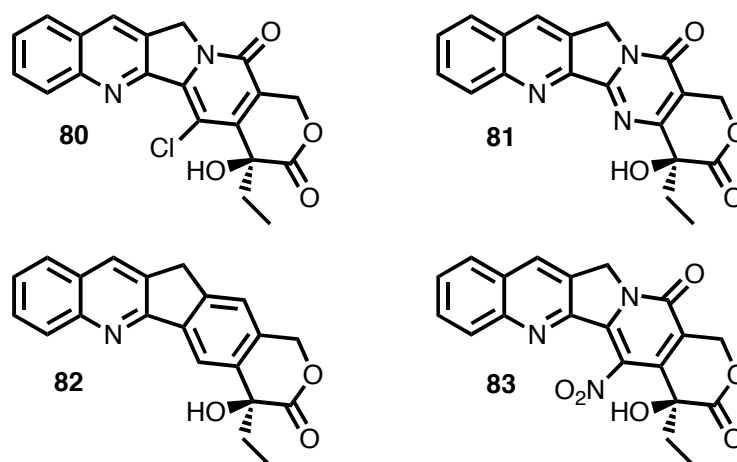


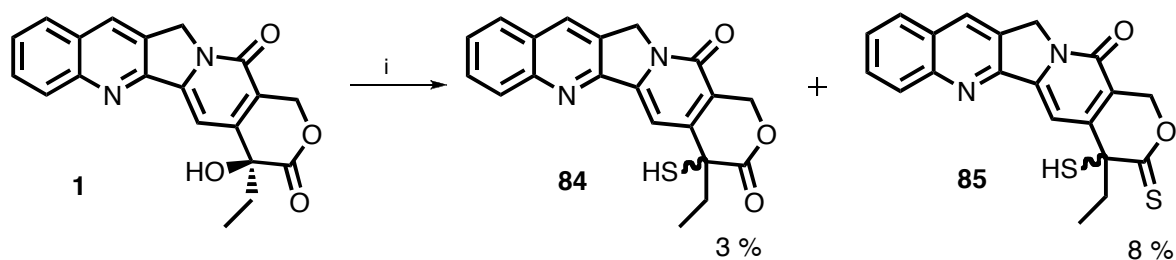
Figura 18. Analoghi della CPT modificati all'anello D.

Tuttavia, la bassa attività antitumorale mostrata da tali derivati, associata a studi di molecular modeling, hanno indotto alla conclusione che anche piccole modifiche dell'anello piridonico D influenzano negativamente le caratteristiche della camptotecina stessa, e di conseguenza le sue proprietà di binding con il complesso binario DNA-Topoisomerasi I. Questi studi chiaramente mostrano che l'anello piridonico non modificato è un elemento necessario per tutti gli analoghi della CPT.⁸⁶

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti e riportati nel precedente capitolo, unitamente ad una vasta letteratura in merito, appare abbastanza chiaro che modifiche strutturali all'anello D non favorisco, ma al contrario peggiorano l'attività citotossica degli analoghi. Ciononostante, abbiamo voluto esplorare la possibilità di generare una nuova molecola camptotecinica modificata proprio nella posizione piridonica. A tale proposito abbiamo pensato di generare un isostere della CPT, recante un gruppo tio-piridonico. I benefici sull'attività biologica derivanti dalla sostituzione isosterica dell'ossigeno con lo zolfo, sono, infatti, ampiamente documentati in letteratura per svariati composti.⁸⁸

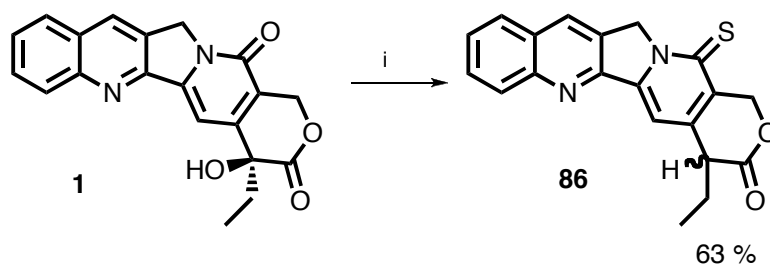
Per la sintesi della 16a-Tio-CPT, abbiamo considerato che il reagente di Lawesson (LR) avrebbe potuto fornire il risultato desiderato. La reazione fra la CPT ed il LR, nota in letteratura,⁸⁹ genera una piccola quantità di 20-mercapto-CPT **84** accanto al 20,21-bis-mercapto-CPT **85** (Schema 17).



i) LR (5 eq), Pyridine Reflux 30 h

Schema 17. Reazione della CPT con il reagente di Lawesson. (Hecht)

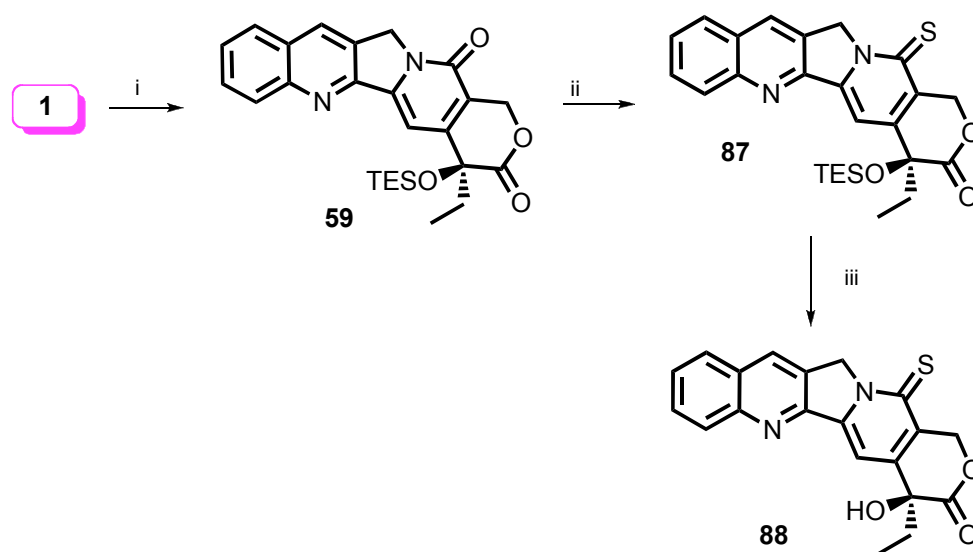
Tuttavia, la reazione di tionazione da noi ripetuta in diverse condizioni di solvente e temperatura ha portato all'ottenimento del solo derivato 20-deoxy-16a-tiocamptotecina (**86**) con una resa del 63% (Schema 18).



i) LR (1.4 eq), Xylene Reflux 3 h

Schema 18. Reazione della CPT con il reagente di Lawesson. (Samorì)

L'isolamento di **86**, è stato in ogni caso valutato come un buon punto di partenza, poiché dimostrava che la tionazione in posizione 16a era possibile, e l'ottenimento della 16a-tio-CPT era fattibile una volta adeguatamente protetto il gruppo ossidrilico in posizione 20. A tal proposito abbiamo ripetuto la protezione riportata nello Schema 11 (Capitolo 3), che genera la 20(*S*)-*O*-trietilsilil-camptotecina **59**. La successiva tionazione di **59** con il reagente di Lawesson porta all'ottenimento della corrispondente 20(*S*)-*O*-Trietilsilil-16-a-TioCamptotecina **87** con una resa pari all'84%. Infine, la desililazione di **87** con Et₃N·3HF genera l'analogo desiderato **88** con resa quantitativa (Schema 19).



i) DMF, TESCOI, imidazolo, DMAP; ii) LR (0.9 eq), xilene; c) Et₃N·3HF (2.6 eq); THF.

Schema 19. Sintesi della 16a-Tio-CPT (**88**).

La struttura della tiocamptotecina **88** è stata determinata attraverso analisi cristallografica del singolo cristallo.⁹⁰ Pur essendo molto simile alla struttura della molecola naturale, il cristallo di tiocamptotecina mostra alcune peculiarità che meritano un ulteriore commento. La differenza principale fra la struttura cristallografica della camptotecina e della tio-camptotecina risiede nella diversa tipologia d'interazioni che si vengono a creare all'interno della cella. Tali differenze sono legate alla diversa natura degli atomi coinvolti. Nel caso della Tio-CPT si è osservato che il tipo e l'intensità di tali interazioni inducono la molecola a cristallizzare come due diversi conformeri all'interno della stessa unità di cella.

In un set di molecole, rappresentato in Figura 19, la connessione tra una molecola e l'altra avviene attraverso la formazione di legami ad idrogeno intermolecolari tra la

posizione 20-OH ed il gruppo carbonilico dell'anello E, con una distanza intramolecolare O....O di 2.908 Å.

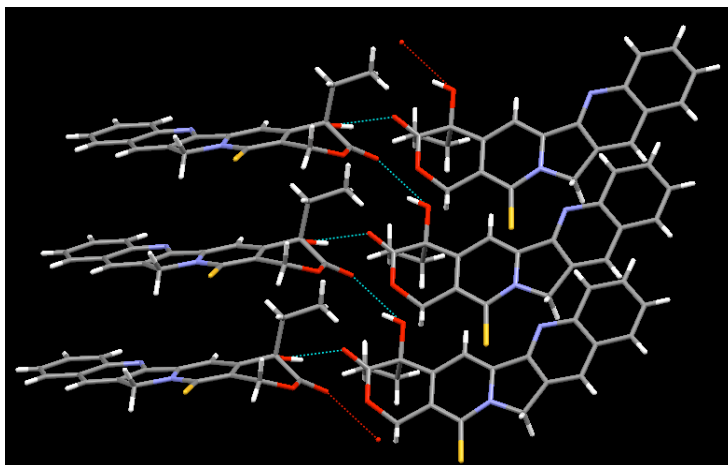


Figura 19. Rappresentazione spaziale di **88**. Le linee tratteggiate rappresentano i legami intermolecolari ad idrogeno.

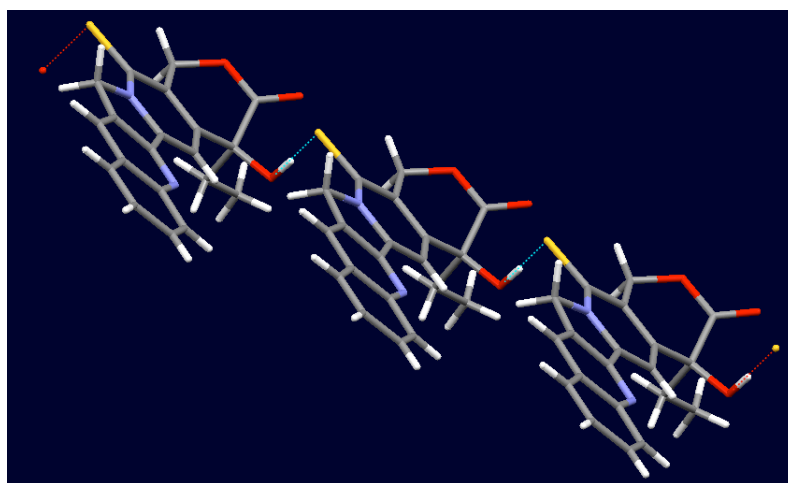
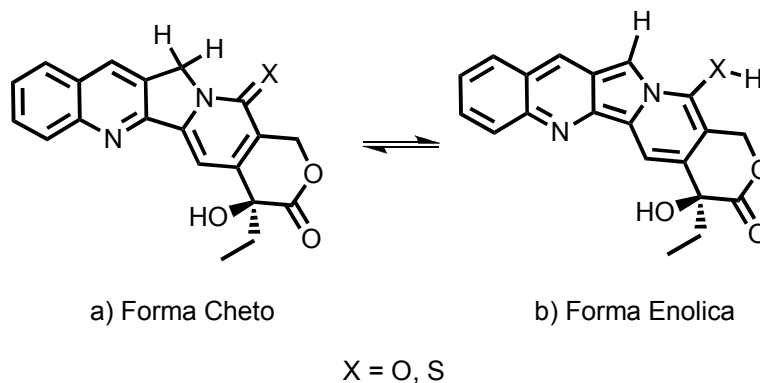


Figura 20. Rappresentazione spaziale di **88**. Le linee tratteggiate rappresentano i legami intermolecolari ad idrogeno.

Nel secondo set di molecole, rappresentato in Figura 20, la connessione tra una molecola e l'altra è dovuta alla formazione di un legame ad idrogeno intermolecolare tra l'atomo di zolfo ed il gruppo ossidrilico, con una distanza intermolecolare S.....O di 3.241 Å.

La minore elettronegatività dell'atomo di zolfo rispetto all'ossigeno, implica la formazione di legami intermolecolari più deboli ed i valori delle distanze di legame sopra riportati ne sono un'evidenza. Nel conformero raffigurato in figura 18, dove sono coinvolti atomi di ossigeno di strutture diverse, la lunghezza del legame S-C è di 1.669 (4) Å, mentre nel conformero raffigurato in figura 19, la lunghezza del legame S-C raggiunge 1.682 Å. Tali osservazioni sperimentali possono essere spiegate sulla base del fatto che la natura del legame C(16a)-S è più vicina a quella di un legame singolo, essendo gli elettroni del legame π del tiocarbonile più "spostati" verso l'atomo di zolfo. Tale fenomeno favorisce l'interazione con il residuo 20-OH di una seconda struttura.

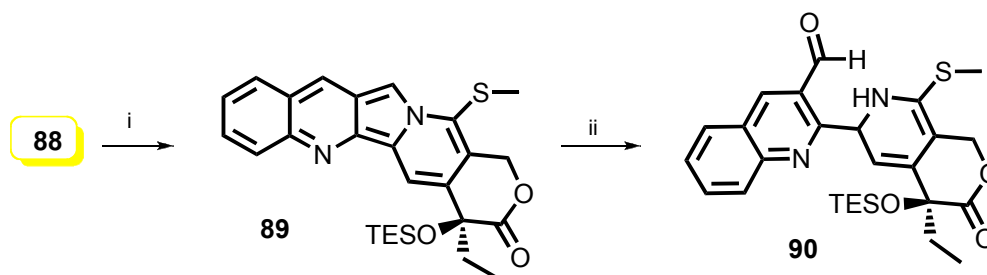
Anche per ciò che concerne la reattività, la camptotecina e la tio-camptotecina hanno mostrato considerevoli differenze. A causa della maggior polarizzabilità del legame C=S rispetto al legame C=O, infatti, le reazioni in presenza di basi, evidenziano che nel caso della Tio-CPT, il contributo della forma enolica aumenta (Schema 20).⁹¹ Infatti, trattando la tio-camptotecina con 2.0 eq. di imidazolo in DMSO- d_6 /D₂O, dopo 15 minuti a 20°C, si osserva che l'85% di deuterio è stato incorporato in posizione 5, mentre la camptotecina, in analoghe condizioni, non supera il 70 % di assorbimento di deuterio dopo 3 giorni di reazione.



Schema 20. Struttura molecolare della camptotecina (X=O) e della Tioamptotecina (X=S): a) Forma cheto; b) Forma enolica

Inoltre, è stato possibile osservare la forma enolica della tiocamptotecina mediante spettroscopia ¹H NMR, monitorando la reazione indotta dal ^tBuOK in solvente deuterato (THF- d_8). Il corrispondente tiolato è stabile in soluzione per diverse ore; la successiva S-

alchilazione, eseguita con MeI genera il corrispondente metil solfuro **89** (Schema 21). Il trattamento di **89** con NH₄Cl saturo genera il composto aperto **90** (Schema 21).



i) MeI, ^tBuOK, THF-*d*₈; ii) H₂O/H⁺

Scheme 21. S-Alchilazione della TioCPT **88** con MeI e sua Idrolisi.

4.3 VALUTAZIONI BIOLOGICHE E BIOCHIMICHE

L'attività citotossica della tiocamptotecina **88** è stata studiata su differenti linee cellulari tumorali umane, utilizzando come riferimento la CPT **1** (Tabella 4).

Tabella 4. Attività citotossica (IC₅₀, μM) di CPT **1** e tiocamptotecina **88** contro linee cellulari di tumore umani.^a

| Linea cellulare | Tempo di Esposizione (h) | IC ₅₀ (μM) | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|
| | | Composto | |
| | | 1 | 88 |
| H460 | 1 | 0.33±0.05 | 0.14±0.058 |
| | 72 | 0.0062±0.000204 | 0.0074±0.00038 |
| IGROV-1 | 1 | 1.65±0.10 | 0.22±0.041 |
| | 72 | 0.012±0.0004 | 0.00467±0.00077 |
| HT29 | 1 | 3.16±1.2 | 0.17±0.091 |
| HT29/mit | 1 | 8.81±2.35 | 0.11±0.03 |

^aL'attività è determinata da saggi antiproliferativi (cell count) a 72 h, seguendo l'esposizione a 1 e 72 h. IC₅₀, concentrazione del farmaco richiesta per la riduzione del 50% di crescita tumorale comparata con il controllo non trattato. Media±SD sono riportati almeno tre esperimenti.

Dopo 1 h d'esposizione al tumore la tiocamptotecina risulta essere più attiva del riferimento verso tutte le linee cellulari esaminate, mentre dopo un tempo prolungato di esposizione (72 h) l'effetto citotossico è sostanzialmente paragonabile o leggermente superiore al riferimento.

L'incremento della citotossicità di **88** è considerevole per la linea cellulare IGROV-1 ed è ancor più marcato per la linea cellulare HT29 (carcinoma del colon resistente al farmaco) e nella sotto-linea cellulare HT29/mit, selezionato per la resistenza al mitoxantrone e caratterizzato da una sovrpressione della pompa di membrana BCRP.⁹²

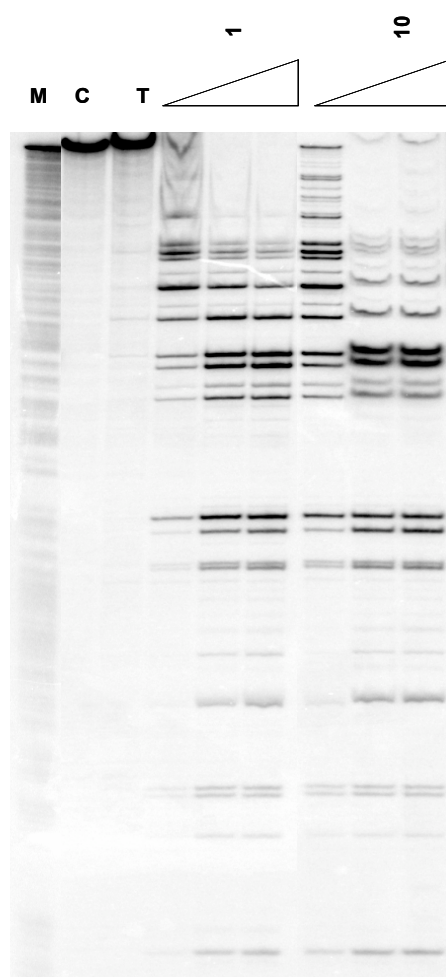


Figure 21. Saggi di cleavage di Topo I-DNA relativi ai composti **1** e **88**. I campioni sono fatti reagire con 1, 10 e 50 μM di farmaco a 37 °C per 30 min. la reazione è bloccata dall'aggiunta di 0.5% SDS, 0.3 mg/ml di proteinase K e incubata per 45 min a 42°C prima di essere caricata su 8% di gel di poliacriloammide denaturato. C, controllo DNA; T, reazione senza farmaco; M, marcatore purinico. Esperimenti ripetuti 3 volte.

Saggi di cleavage Topo I-DNA sono stati eseguiti per esaminare la capacità della tiocamptotecina nello stimolare danno al DNA. Il composto **88** rivela un'intensità di danno al DNA leggermente superiore a quella indotta dalla molecola naturale CPT (Figura 19). Come si evince dalla Figura 19 la coppia di cleavage risulta essere identica a quella osservata per la molecola naturale.

4.4 CONCLUSIONI

Diverse sono le ragioni che possono rendere conto della maggiore attività della tiocamptotecina **88** rispetto alla camptotecina. L'incremento della carica negativa sull'eteroatomo evidenziato dai raggi X della molecola potrebbe rendere conto di una più efficace formazione di legame ad idrogeno intermolecolare tra il DNA ed il farmaco; ciò spiegherebbe la più elevata citotossicità registrata per **88**. Una seconda ipotesi che potrebbe chiarire la maggiore potenza inibitoria della tiocamptotecina, sarebbe l'incremento di lipofilia rispetto alla CPT, il che potrebbe favorire un più rapido assorbimento del farmaco all'interno del tumore. In ultima analisi, la presenza dell'atomo di zolfo conferisce maggior stabilità all'anello lattonico, il che si traduce in una maggiore quantità di farmaco presente in forma attiva che, come osservato in precedenza, è quella chiusa.

In conclusione, la sostituzione dell'atomo di ossigeno con l'atomo di zolfo nel gruppo piridonico rende il composto più attivo verso tutte le linee cellulari tumorali umane testate, perciò la sostituzione isosterica ha generato un nuovo composto che ha le potenzialità per diventare un nuovo lead a livello di trattamento chemioterapico. Ulteriori studi sono in corso.

CAPITOLO 5

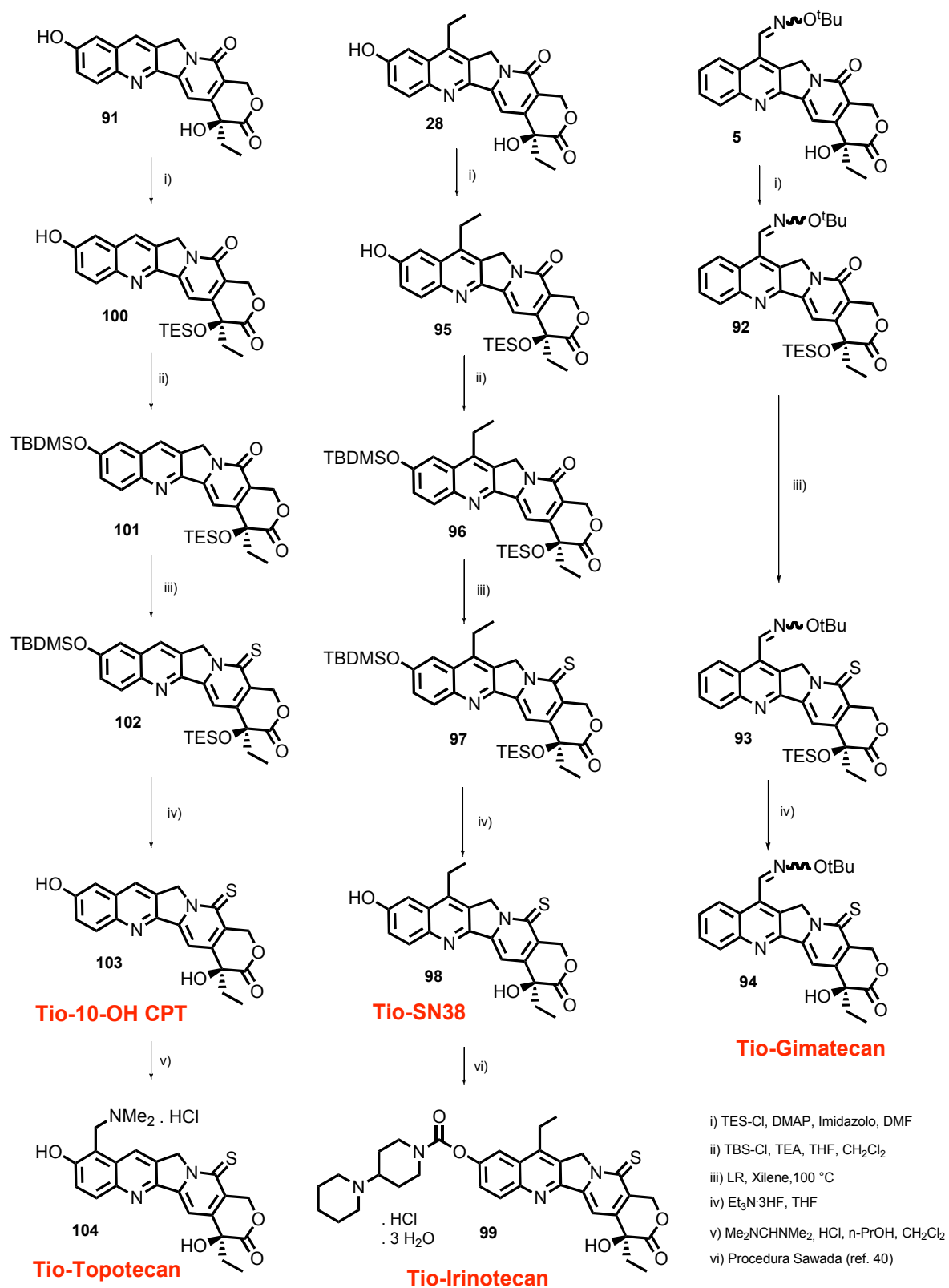
MODIFICHE ANELLO D

5.1 RISULTATI E DISCUSSIONE

Dopo l'isolamento e la caratterizzazione della tiocamptotecina **88**, si è pensato di sintetizzare gli analoghi più attivi della CPT in forma "tio", ovvero trasformando il gruppo piridonico di ognuno di essi in tio-piridone, con lo scopo di valutare se l'incremento dell'attività biologica legata alla presenza dello zolfo fosse una caratteristica generale, oppure un caso isolato alla camptotecina.

Gli analoghi presi in considerazione sono: il Topotecan (**2**), l'SN38 (**28**) che è il metabolita attivo dell'Irinotecan (**3**), farmaco attualmente in commercio, il Gimatecan (**5**), che è attualmente in fase clinica II ed è l'analogo della CPT che negli ultimi anni si è dimostrato più promettente, ed infine la 10-OH-CPT (**91**), che è un analogo estratto dalla pianta ed ha un profilo farmacologico migliore rispetto la CPT stessa, soprattutto per la sua minore tossicità intrinseca. Per la sintesi degli analoghi tionati, abbiamo applicato la metodologia sintetica precedentemente riportata per la sintesi della Tio-CPT (Schema 19), eccetto che per un'opportuna modifica utilizzata nel caso dei derivati recanti il gruppo fenolico. Il Gimatecan **5**,⁹³ è stato dapprima protetto come sililetere, generando il corrispondente 20(*S*)-*O*-trietilsilil-Gimatecan **92**. La successiva reazione di tionazione ha condotto all'ottenimento del corrispondente 20(*S*)-*O*-trietilsilil-16a-tio-Gimatecan (**93**) con una resa pari all'82%. Infine, la desililazione di **93** con Et₃N·3HF ha generato l'analogo desiderato tio-Gimatecan (**94**) in resa quantitativa (Schema 22).

La reazione di SN38 (**28**) con trietil silil cloruro è regioselettiva nei confronti dell'OH terziario (Schema 22), generando esclusivamente il corrispondente 20(*S*)-OTES-SN38 (**95**). La reazione fra **95** ed il LR nelle condizioni precedentemente riportate ha condotto al recupero quantitativo del materiale di partenza. Tale inconveniente è stato superato proteggendo il gruppo OH fenolico con TBDMS-Cl in solvente misto THF/CH₂Cl₂ ed in presenza di Et₃N. Il derivato 20(*S*)-OTES-10-OTBDMS-SN38 (**96**) è stato quindi trattato



Schema 22. Sintesi degli analoghi Tionati partendo dai corrispondenti parentali.

con il LR, portando alla formazione del prodotto desiderato 20(*S*)-OTES-10-OTBDMS-TioSN38 (**97**) con una resa dell'80%. Per reazione di **97** con Et₃N·3HF si è ottenuto il TioSN38 **98** in resa quantitativa, e la successiva reazione di coupling tra **98** e la 1,4'-bipiperidina-1'-carbonil cloruro in presenza di base porta alla formazione del Tio-Irinotecan **99**.

Per la sintesi della 10-OH-TioCPT (**103**), si è partiti da una doppia protezione ortogonale della 10-OH-Camptotecina, eseguita come già descritto per la sintesi del tio-SN38. La reazione dell'addotto bis-sililato **101** con il reattivo di Lawesson, eseguita in xilene a 90-100°C, ha fornito il derivato 20(*S*)-OTES-10-OTBDMS-TioCPT (**102**) con resa del 90%. In ultimo, la deprotezione completa di **102** ha generato la corrispondente 10-OH-TioCPT (**103**) in resa quantitativa. La sintesi del derivato Tio-Topotecan (**104**) è stata eseguita attraverso una reazione di Mannich sul derivato **103**, usando come ammina la bis-(dimetilammina)-metano in solvente misto CH₂Cl₂/iPrOH, seguita dall'aggiunta di HCl acquoso, che ha generato il derivato desiderato **104** con resa > 90% come sale cloridrato. (Schema 22)⁹⁴

5.2 VALUTAZIONI BIOLOGICHE E BIOCHIMICHE

L'attività citotossica dei tio-analoghi (**94**, **98**, **103**, e **104**) è stata valutata in diversi tests biologici utilizzando differenti linee cellulari tumorali umane, tenendo come riferimento i rispettivi analoghi non solforati, ossia: Gimatecan (**5**), SN38 (**28**), Topotecan (**2**), e 10-OH-CPT (**91**) (Tabella 5). Dopo 1 h di esposizione tutti i derivati tio-funzionalizzati risultano essere più attivi in tutte le linee cellulari testate con un incremento dell'attività citotossica che va da un minimo di 2 ad un massimo di 20 volte rispetto al riferimento. Analizzando le varie coppie (Tabella 5) possiamo affermare che l'incremento della potenza di **103** vs **91** non è eclatante in nessuna delle linee tumorali considerate, mentre per quanto riguarda la coppia **98** vs **28**, l'aumento della citotossicità è molto elevato, soprattutto nel caso del tumore al polmone (linea H460), con un incremento della potenza di 20 volte rispetto all'analogo ossigenato **28**. È importante ricordare che SN38 è ad oggi il principio attivo del farmaco leader utilizzato per la cura del tumore al colon, mentre per quanto concerne la coppia **104** vs **2**, l'aumento della potenza citotossica è di circa 4 volte a

favore di **104**. E' importante notare che il topotecan (**2**) è stato attualmente introdotto in Europa per il trattamento al microcarcinoma polmonare.

Tabella 5. Attività citotossica (IC₅₀, μM) dei Tio-analoghi vs i parentali in diverse linee cellulari di tumore umani.^a

| | IC ₅₀ | | |
|------------------------------|------------------|-------------|-------------|
| | H460 | HT29 | HT29mit |
| 10-OH-CPT (91) | 0.30±0.11 | 1.3±0.48 | 15±1.9 |
| 10-OH-TioCPT (103) | 0.092±0.092 | 0.23±0.19 | 31.5±3.7 |
| SN38 (28) | 0.51±0.38 | 0.53±0.25 | 14.5±7.1 |
| Tio-SN38 (98) | 0.029±0.017 | 0.102±0.008 | 4.28±1.57 |
| Topotecan (2) | 1.37±0.50 | 5.45±7.8 | 41.27±17.68 |
| Tio-Topotecan (104) | 0.41±0.057 | 1.5±0.91 | 11.11±5.48 |
| Gimatecan (5) | 0.01 | ---- | ---- |
| Tio-Gimatecan (94) | 0.0023 | ---- | ---- |

^aL'attività è determinata da saggi antiproliferativi (cell count) a 72 h, seguendo l'esposizione a 1 e 72 h. IC₅₀, concentrazione del farmaco richiesta per la riduzione del 50% di crescita tumorale comparata con il controllo non trattato. Media±SD sono riportati almeno tre esperimenti.

Saggi di cleavage Topo I-DNA sono stati eseguiti per esaminare la capacità dei tio-derivati nello stimolare danno al DNA. Tutti i composti solforati presentano un'intensità di danno al DNA superiore alle rispettive molecole parentali (Figura 22). Come si evince dalla Figura 22 il composto TioSN38 esibisce una capacità di taglio dipendente alla dose e man a mano che aumenta la concentrazione del farmaco aumenta il danno conferito al complesso binario.

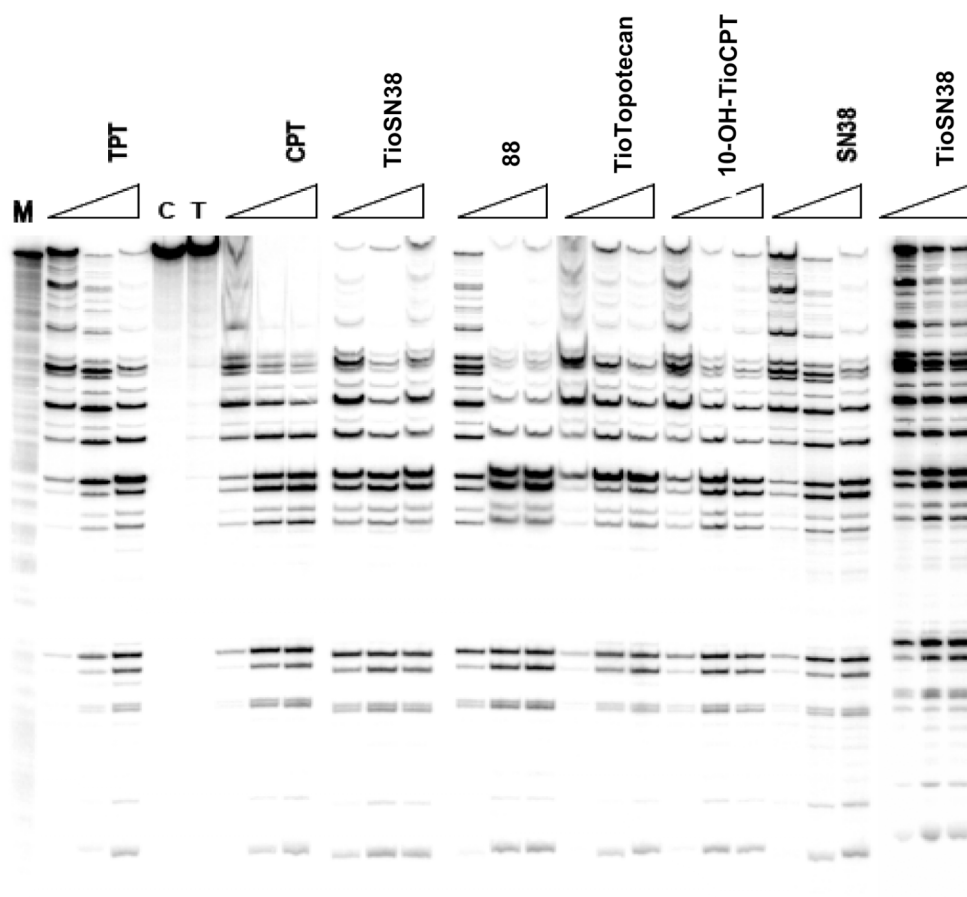


Figura 22. Saggi di cleavage di Topo I-DNA relativi alle molecole tionate e le rispettive molecole parentali. I campioni sono fatti reagire con 1, 10 e 50 μM di farmaco a 37 °C per 30 min. la reazione è bloccata dall'aggiunta di 0.5% SDS, 0.3 mg/ml di proteinase K e incubata per 45 min a 42°C prima di essere caricata su 8% di gel di poliacrilammide denaturato. C, controllo DNA; T, reazione senza farmaco; M, marcatore purinico. Esperimenti ripetuti 3 volte.

5.3 CONCLUSIONI

Osservando i dati di attività mostrati in Tabella 5 possiamo notare che tutti i derivati che recano il sostituito zolfo sull'anello D risultano essere più attivi rispetto agli analoghi non solforati, confermando il dato già registrato per la tio-camptotecina rispetto alla camptotecina. Tale scoperta potrebbe aver aperto la strada alla sintesi di nuove molecole più attive di quelle attualmente usate in sperimentazione clinica o già commercializzate.

CAPITOLO 6

6.1 CONCLUSIONI

Il tema centrale della ricerca presentata in questo lavoro di tesi di dottorato in scienze chimiche riguarda la sintesi di camptotecine differientemente modificate negli anelli C, D, ed E dello scheletro pentaciclico. Per quanto concerne le sostituzioni sull'anello C, è stata messa a punto una metodologia semi-sintetica generale per l'introduzione di elettrofili altamente versatile, che sfrutta la formazione di un enolato stabile in posizione 5. I derivati ottenuti sono stati testati nella linea cellulare NCI-H460 (tumore polmonare), ma tali derivati si sono rivelati meno efficienti della molecola parentale di riferimento.

Per quanto riguarda la modifica strutturale sull'anello E, abbiamo sviluppato l'idea dei nuovi "targeted drug delivery systems" che utilizza poliammine come carriers. Inoltre, durante la sintesi di questi analoghi tripartati abbiamo sviluppato una nuova procedura per l'ottenimento dell'acido 17-*O*-acetil camptotecinico (**49**) in 4 stadi e con resa globale superiore all' 80%. Infine, abbiamo studiato l'architettura del residuo poliamminico che poteva generare il coniugato tripartato più efficiente.

In ultimo abbiamo apportato modifiche all'anello D, creando una nuova serie di isosteri che recano la modifica sul residuo piridonico che è fondamentale per esplicitare l'attività antineoplastica. Questa nuova classe di tio-analoghi ha mostrato possedere una potenza citotossica molto più elevata rispetto agli analoghi parentali, da un minimo di 2 ad un massimo di 20 volte come nel caso del TioSN38 vs SN38. Inoltre, abbiamo sviluppato una procedura semi-sintetica generale in 3/5 passaggi ad alta resa, che utilizza una protezione facilmente rimovibile in condizioni blande. Tutti i tio-derivati sono stati testati in più linee tumorali (polmone, ovario e colon refrattario) e si sono mostrati sempre più efficienti degli analoghi parentali.

PARTE SPERIMENTALE

Tutte le reazioni sono eseguite in flusso di azoto anidro e in vetreria siccata in stufa. I reagenti chimici sensibili all'umidità sono stati maneggiati mediante l'utilizzo di siringhe. THF, toluene, xilene ed etil etere sono distillati da sodio/benzofenone; DMF e CH₂Cl₂ sono invece, distillati da CaH₂. Tutti gli altri solventi hanno purezza HPLC. I setacci molecolari a 4Å sono preanidrificati prima dell'uso a 180 °C per 24 h. Tutti gli altri reattivi e solventi sono acquistati dalle varie compagnie e utilizzati senza un'ulteriore purificazione.

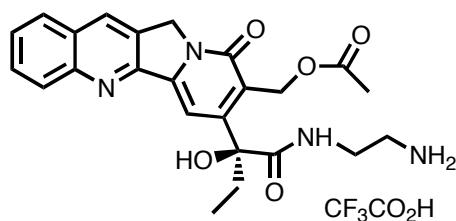
Tutte le reazioni sono agitate magneticamente e monitorate utilizzando la cromatografia su strato sottile (TLC) usando i fogli di gel di silice 60-F254 (E. Merck), e visualizzate da lampada a UV a 254 nm, bruciate con soluzione di permanganato o di acido fosfomolibdico. Le colonne cromatografiche sono state eseguite su Merck silice per flash cromatografia (0.04-0.63 µm, 240-400 mesh). Gli spettri NMR ¹H e ¹³C sono registrati su un 400 MHz Varian Gemini, e a meno che diversamente dichiarato tutti gli spettri sono registrati in CDCl₃ usando come linea di riferimento il segnale del CHCl₃. Tutti i chemical shift sono dati in ppm (s=singoletto; d=doppio; t=tripletto; dd=doppio doppio; q=quartetto; dt=doppio di tripletto, m=multiplietto; br s=segnale ampio). Le costanti di accoppiamento *J* sono date in Hz. L'assegnazione dei segnali ¹H e ¹³C sono confermati quando è possibile da esperimenti omonucleari, eteronucleari o da disaccoppiamenti. Gli spettri IR sono registrati su un Perkin Elmer FT-IR utilizzando NaCl come celle. Spettri di spettroscopia di massa (MS) sono registrati su uno spettrometro a trappola ionica con un potenziale di ionizzazione di 70 eV. La CPT e i suoi analoghi ci sono stati forniti dalla ditta Indena S. p. A.

ATTENZIONE: La CPT e i suoi analoghi sono sostanze tossiche, tutti gli esperimenti devono essere eseguiti in cappe ben ventilate; guanti e occhiali protettivi devono essere utilizzati tutte le volte.

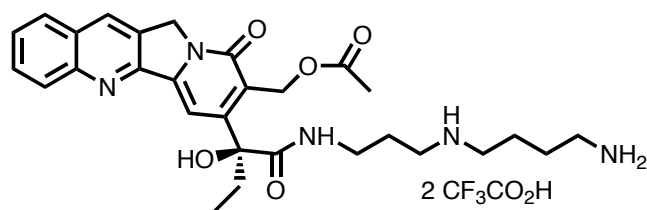
CAPITOLO 2

Procedura Generale per la Sintesi dei Coniugati Tripartati **47**, **35**, e **48** dalla Camptotecina **1** con *N*-Boc Poliammine **42**, **43**, e **45** rispettivamente.

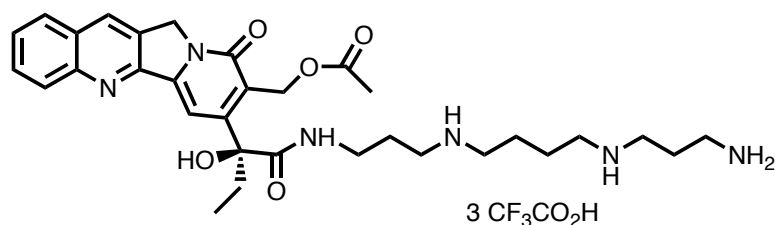
Camptotecina **1** (1 eq), è sospesa in 5 mL di piridina anidra, successivamente si introducono (4 eq) di *N*-BOC-poliammine **42**, **43**, e **45**. La miscela di reazione è scaldata a 80°C per 70 h; in seguito si evapora il solvente e si purifica il grezzo di reazione mediante flash cromatografia su silice e come miscela eluente si usa CH₂Cl₂-MeOH (30:1). Si ottengono rispettivamente con resa dell'88%, 55%, e del 10% i corrispondenti 17-idrossi-21-BOC ammidi. Quest'ultimi composti (1 eq), vengono sciolti in 5 mL di piridina anidra, dopodichè si aggiunge Ac₂O (20 eq). Si lascia reagire la miscela di reazione per 2 h a temperatura ambiente e l'eccesso dei solventi è rimosso a pressione ridotta. Il risultante residuo è purificato su silice per flash cromatografia; come eluente si usa CH₂Cl₂-MeOH (30:1). Si ottengono i corrispondenti 17-*O*-acil-21-*N*-Boc-ammidi con resa quantitativa. Quest'ultimi coniugati tripartati protetti (1 eq) sono sciolti in 8 mL di DCM anidro e raffreddati a 0°C; successivamente si sgocciolano in 30 minuti (15.7 eq) di TFA. La reazione è agitata per 60 h ad una temperatura di 0-4°C. Il solvente è rimosso a pressione ridotta, si ottengono i corrispondenti tripartati **47**, **35**, e **48** come solidi gialli.



47. (88%); solido giallo; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆/D₂O) δ 8.58 (s, 1 H, Ar), 8.08 (d, 1 H, J = 8.4 Hz, Ar), 8.01 (d, 1 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.81 (t, 1 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.64 (t, 1 H, J = 8.4 Hz, Ar), 7.53 (s, 1 H, Ar), 5.29 (d, 1 H, J = 11.2 Hz), 5.20 (d, 1 H, J = 11.2 Hz), 5.15 (s, 2 H, H-5), 3.38 (m, 1 H), 3.22 (m, 1 H), 2.86 (bt, 2 H), 2.22 (m, 1 H), 2.13 (m, 1 H), 1.95 (s, 3 H), 0.87 (t, 3 H, J = 7.8 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 174.1, 171.0, 161.3, 156.2, 153.4, 148.6, 144.9, 132.3, 131.1, 130.7, 129.7, 129.2, 128.7, 128.3, 123.9, 99.4, 79.3, 59.4, 51.0, 38.9, 37.3, 32.4, 21.4, 8.5.

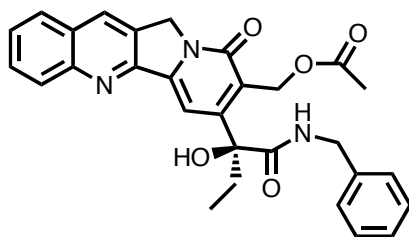


35. (55%); solido giallo; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O) δ 8.63 (s, 1 H, Ar), 8.12 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.05 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.86-7.81 (m, 1 H, Ar), 7.70-7.65 (m, 1 H, Ar), 7.50 (s, 1 H, Ar), 5.29 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.24 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.21 (s, 2 H, H-5), 3.20-3.00 (m, 2 H), 2.88-2.80 (m, 4 H), 2.80-2.72 (m, 2 H), 2.18-2.28 (m, 1 H), 2.06-2.18 (m, 1 H), 1.95 (s, 3 H), 1.76-1.66 (m, 2 H), 1.60-1.48 (m, 4 H), 0.88 (t, 3 H, $J = 7.8$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 173.9, 171.0, 161.3, 158.0 (q, CO $_2$ H i TFA), 156.5, 153.4, 148.7, 144.9, 132.3, 131.1, 130.6, 129.7, 129.2, 128.7, 128.3, 124.0, 99.5, 79.4, 59.5, 51.0, 46.8, 45.3, 38.9, 36.7, 32.3, 26.5, 24.8, 23.3, 21.4, 8.6.



48. (10%); solido giallo; ^1H NMR (400 MHz, CD $_3$ OD) δ 8.65 (s, 1 H, Ar), 8.18 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.07 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.88 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.83 (s, 1 H, H-14), 7.72 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.46 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.40 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.33 (s, 2 H, H-5), 3.18-3.00 (m, 12 H), 2.48-2.40 (m, 1 H, H-19), 2.34-2.26 (m, 1 H, H-19), 2.12-2.08 (m, 4 H), 2.06 (s, 3 H), 1.90-1.76 (m, 4 H), 1.06 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD $_3$ OD) δ 176.4, 173.2, 163.3, 158.5, 153.8, 149.7, 146.2, 133.4, 132.0, 131.0, 130.0, 129.8, 129.7, 129.1, 125.5, 102.2, 80.0, 60.5, 51.8, 46.7, 46.3, 45.9, 37.8, 37.1, 36.8, 33.2, 27.7, 27.5, 25.4, 24.3, 22.4, 8.3.

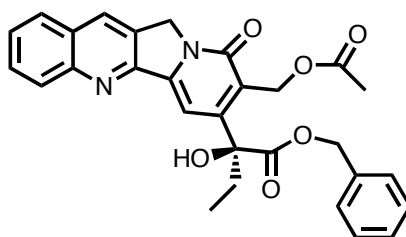
17-Acetilcamptotecina-21-benzil amide (**50**)



Camptotecina **1** (350 mg, 1.01 mmol), è sospesa in 2.5 mL di benzil ammina anidra. La miscela di reazione è scaldata a 45-50°C per 2.5 h poi il solvente viene rimosso a pressione ridotta. Si aggiunge acqua e la fase acquosa è estratta con CH₂Cl₂ (15mL x 3). Le fasi organiche vengono anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate in vuoto. Si ottengono (440 mg, 96%) di 17-idrossi-21-benzil amide come solido giallo. Il grezzo di reazione non necessita di ulteriore purificazione.

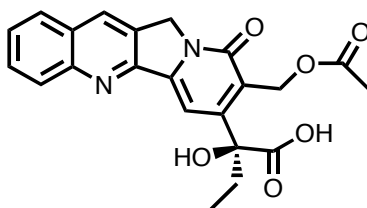
La 17-idrossi-21-benzil amide (440 mg, 0.97 mmol), è sciolta in 10 mL di piridina anidra, successivamente si aggiungono (1.8 mL, 19.4 mmol) di Ac₂O. La reazione è agitata a temperatura ambiente e controllata mediante TLC [CH₂Cl₂-MeOH (30:1)] fino a completa scomparsa del materiale di partenza (2.5 h). Il solvente e l'eccesso di reagente sono rimossi a pressione ridotta poi si aggiunge acqua; le fasi acquose sono estratte con CH₂Cl₂ (20mL x 3). Le fasi organiche sono ulteriormente lavate con una soluzione al 5% di HCl e poi anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate sotto vuoto. Si ottiene **50** come solido giallo pallido (480 mg, ≈100%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1 H, Ar), 8.11 (d, 1 H, *J*=8.4 Hz, Ar), 7.74 (t, 1 H, *J*=8.4 Hz, Ar), 7.69 (d, 1 H, *J*=8.4 Hz, Ar), 7.63 (s, 1 H, H-14), 7.51 (t, 1 H, *J*=8.4 Hz, Ar), 7.35-7.20 (m, 5 H, Ar), 5.56 (d, 1 H, *J*=12.0 Hz), 5.44 (d, 1 H, *J*=12.0 Hz), 5.19 (d, 1 H, *J*=16.4 Hz), 5.13 (d, 1 H, *J*=16.4 Hz), 5.13 (s, 1 H, OH), 4.53 (dd, 1 H, *J*₁=14.8 Hz, *J*₂=6.4 Hz), 4.39 (dd, 1 H, *J*₁=14.8 Hz, *J*₂=6.4 Hz), 2.56-2.46 (m, 1 H, H-19), 2.38-2.28 (m, 1 H, H-19), 2.04 (s, 3 H), 1.08 (t, 3 H, *J*=7.6 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.1, 171.1, 161.5, 157.0, 151.3, 148.0, 144.1, 137.7, 130.5, 130.1, 128.9, 128.6, 128.5, 128.0, 127.8, 127.7, 127.5, 127.2, 124.9, 100.7, 78.5, 58.7, 50.3, 43.5, 33.1, 20.9, 7.9.

17-Acetilcamptotecina-21-benzil estere (**52**)



17-Acetilcamptotecina-21-benzil amide **50** (480 mg, 0.97 mmol) è sciolta in una miscela 2:1 di Ac₂O (12mL) e AcOH (6mL), si raffredda la miscela di reazione a 0°C e successivamente si addiziona NaNO₂ granulare (1.34g, 19.4mmol) in piccole porzioni nell'arco di 2 h. Si nota formazione di gas marrone; la reazione è tenuta a 0°C per altre 2 h e poi scaldata a temperatura ambiente e lasciata reagire per altre 24 h. Si blocca la reazione rovesciandola in una miscela acqua/ghiaccio ed estratta con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). La fase organica è ulteriormente lavata con una miscela al 5% di Na₂CO₃ e H₂O, poi anidrificata su Na₂SO₄. L'evaporazione del solvente offre **51** come solido giallo, il quale è immediatamente disciolto in 1,4-diossano anidro (16 mL) e reflussato per 5 h. La miscela di reazione è raffreddata a temperatura ambiente e il solvente eliminato a pressione ridotta; il grezzo di reazione è sufficientemente pulito per proseguire; si ottiene **52** (483 mg, ≈100%) come solido giallo. Comunque un campione analitico di **52** è stato ulteriormente purificato mediante flash cromatografia su silice CH₂Cl₂-MeOH (30:1). **52**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (s, 1 H, Ar), 8.20 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.89 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.80 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.63 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.52 (s, 1 H, H-14), 7.33-7.24 (m, 5 H, Ar), 5.50 (d, 1 H, *J* = 11.6 Hz), 5.47 (d, 1 H, *J* = 11.6 Hz), 5.29 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz), 5.23 (s, 2 H), 5.16 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz), 4.32 (s, 1 H, OH), 2.41-2.24 (m, 2 H, H-19), 2.03 (s, 3 H), 0.95 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 171.0, 161.4, 153.4, 152.5, 148.7, 144.7, 134.7, 131.0, 130.5, 129.5, 128.8, 128.6, 128.6, 128.3, 128.1, 128.1, 127.8, 124.9, 99.8, 79.4, 68.2, 58.7, 50.2, 32.2, 20.9, 7.6.

Acido 17-Acetil-camptotecinico (49)



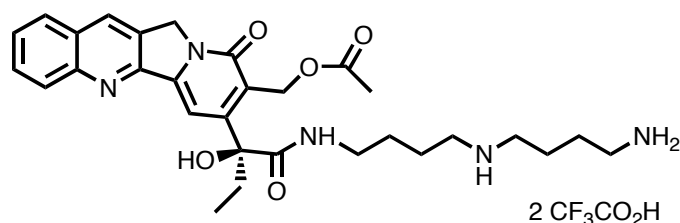
17-Acetil-21-benzil estere **52** (226 mg, 0.45 mmol) è disciolto in una miscela di THF-EtOH (1:1). 10% Pd/C anidro (48 mg) è aggiunto molto attentamente; l'ossigeno disciolto è rimosso sotto vuoto. Si effettuano un paio di cicli vuoto/H₂ e la miscela di reazione è agitata per 10 h a temperatura ambiente. Il catalizzatore è rimosso mediante filtrazione su uno strato di Celite mentre il filtrato è concentrato sotto vuoto. Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH (gradiente di eluizione 20:1, 10:1). Si ottiene **49** come solido giallo pallido. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.64 (s, 1 H, Ar), 8.18 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 8.08 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.85-7.81 (m, 2 H, Ar), 7.68 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 5.90 (s, 1 H, OH), 5.61 (d, 1 H, *J* = 10.4 Hz), 5.39 (d, 1 H, *J* = 10.4 Hz), 5.20 (s, 2 H), 1.98-1.82 (m, 5 H, H-19 + Me), 0.82 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 171.0, 161.8, 160.0, 153.9, 148.7, 143.5, 132.0, 130.9, 130.6, 129.7, 129.1, 128.5, 128.1, 123.6, 101.3, 80.6, 60.2, 50.6, 33.8, 21.5, 9.6.

Procedura generale per la preparazione di coniugati tripartati **53**, **48**, **54** dalla reazione di addizione di **49** alle *N*-^tBoc poliammine **44**, **45** e **46** rispettivamente.

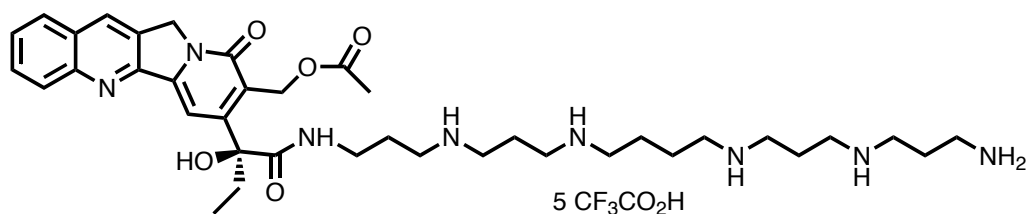
L'acido 17-O-acetil camptotecinico **49** è sciolto in 2 mL di DMF anidra, successivamente si addizionano le poliammine **44**, **45** e **46** (2 eq) e Et₃N (3 eq). La miscela di reazione è raffreddata a 0°C e 1-[3-(dimetilammino)propil]-3-etilcarbodiimmide cloridrato (EDCI·HCl, 2.2 eq), *N*-idrossibenzotriazolo (HOBt, 2.1 eq) sono aggiunti, si lascia reagire a questa temperatura per 2 h poi si scalda a 20°C e si lascia reagire per ulteriori 40-50 h. il solvente viene rimosso a pressione ridotta e il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH (gradiente di eluizione 40:1, 30:1 and 15:1). Si ottengono I corrispondenti 17-O-acetil-21-N-^tBoc ammidi in 62%, 50% e 27% di resa complessiva. Quest'ultimi coniugati tripartati protetti (1 eq) sono sciolti in 8 mL di DCM anidro e raffreddati a 0°C; successivamente si sgocciolano in 30 minuti (15.7

eq) di TFA. La reazione è agitata per 60 h ad una temperatura di 0-4°C. Il solvente è rimosso a pressione ridotta, si ottengono i corrispondenti tripartati **53**, **48** e **54** come solidi gialli.

48. (50%); solido giallo pallido (Spettro descritto sopra).



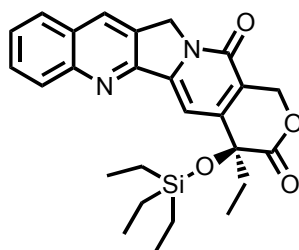
53. (62%); solido giallo pallido; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.59 (s, 1 H, Ar), 8.13 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.02 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.83 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.78 (s, 1 H, H-14), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.46 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.39 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.25 (s, 2 H, H-5), 3.10-2.90 (m, 8 H), 2.54-2.44 (m, 1 H, H-19), 2.33-2.24 (m, 1 H, H-19), 2.06 (s, 3 H), 1.82-1.66 (m, 8 H), 1.07 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.5, 172.1, 162.2, 157.6, 152.5, 148.4, 144.8, 132.1, 130.7, 129.7, 128.7, 128.6, 128.5, 127.9, 124.5, 101.1, 78.7, 59.3, 50.5, 47.3, 46.9, 38.8, 38.4, 32.1, 26.3, 24.4, 23.5, 23.1, 21.4, 7.1.



54. (27%); solido giallo pallido; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.60 (s, 1 H, Ar), 8.14 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.03 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.85 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.80 (s, 1 H, H-14), 7.69 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.46 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.40 (d, 1 H, $J = 11.2$ Hz, H-17), 5.27 (s, 2 H, H-5), 3.18-3.00 (m, 20 H), 2.48-2.40 (m, 1 H, H-19), 2.34-2.26 (m, 1 H, H-19), 2.18-2.07 (m, 8 H), 2.06 (s, 3 H), 1.90-1.76 (m, 4 H), 1.06 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 176.4, 173.2, 163.4, 158.4, 153.7, 149.6, 146.1, 133.3, 131.9, 131.0, 130.9, 129.9, 129.8, 129.7, 129.1, 125.5, 102.2, 80.0, 60.4, 51.7, 48.2, 46.8, 46.4, 45.9, 45.8, 45.8, 37.8, 37.1, 33.3, 30.9, 27.7, 27.5, 25.3, 24.1(2 C), 21.0, 8.3.

CAPITOLO 3

20(S)-OTES-Camptotecina (59)



La camptotecina **1** (100 mg, 0.29 mmol), è sospesa in 3 mL di DMF anidra, successivamente si addiziona imidazolo (98 mg, 1.44 mmol). Dopo 10 min si introduce trietilsilil cloruro (0.19 mL, 1.15 mmol) seguita dall'aggiunta di DMAP (40 mg, 0.29 mmol). La reazione è agitata a temperatura ambiente fino a completa scomparsa del materiale di partenza evidenziata da analisi TLC (CH₂Cl₂-MeOH:30-1). L'eccesso di solvente è rimosso a pressione ridotta, poi si aggiunge acqua e le fasi acquose sono estratte con CH₂Cl₂ (20 mL x 3); le fasi organiche sono poi anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate sotto vuoto. Il risultante solido è purificato su silice per flash cromatografia (CH₂Cl₂-MeOH:30-1). Si ottengono 130 mg, (98%) di **59** come solido giallo pallido. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.37 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.92 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ar), 7.82 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ar), 7.65 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.57 (s, 1 H, H-14), 5.67 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.29 (s, 2 H, H-5), 5.25 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 2.00-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.03-0.93 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.7, 157.6, 152.5, 151.5, 149.0, 145.9, 130.9, 130.4, 130.0, 128.4, 128.1, 128.0, 127.9, 118.9, 94.4, 75.3, 66.0, 50.0, 33.2, 7.9, 7.2, 6.4. MS (70eV): *m/z*. (rel. intensità), 433 [M⁺-29] (89), 390 [M⁺-72] (100). HRMS *m/z* calc: C₂₆H₃₀N₂O₄Si 462.197, *m/z* trovato: 462.193.

METODO A: Procedura generale per l'addizione elettrofilica a 20-(S)-OTES-CPT (59).

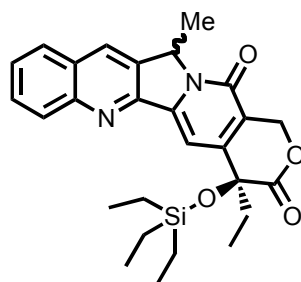
20(S)-OTES-CPT (**59**) (1 eq.) è sciolta in 6 mL di THF anidro, la miscela è raffreddata a -78 °C, si aggiungono (1.2 eq.) di LiHMDS (1.0 M in THF). La reazione è agitata a questa temperatura per 30 min, poi si sgocciola una soluzione dell'elettrofilo (1.3 eq.) in 2 mL di THF. La miscela di reazione è agitata a -78 °C per 2 h, poi scaldata a temperatura ambiente e fatta reagire per successive 2 h. La reazione è trattata con NH₄Cl ed estratta con

CH₂Cl₂, le fasi organiche sono anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è purificato mediante silice per flash cromatografia.

METODO B: Procedura generale per l'addizione elettrofila a 20-(S)-OTES-CPT (59).

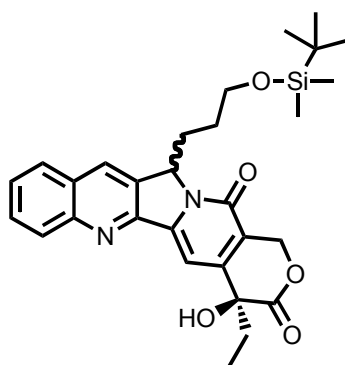
20-(S)-OTES-CPT (**59**) (1 eq.) è sciolta in 4 mL di DMF anidra, la miscela è raffreddata a 0 °C, si addiziona *t*BuOK (1.3 eq.). La soluzione è agitata a questa temperatura per 5 min, si sgocciola una soluzione dell'elettrofilo (5.0 eq.) in 0.5 mL di DMF. La miscela di reazione è agitata a 0 °C per 5 min poi scaldata a temperatura ambiente per successivi 30 min. La reazione è diluita con H₂O (15 mL) ed estratta con EtOAc; le fasi organiche sono anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è purificato mediante silice per flash cromatografia.

20(S)-OTES-5-Metil-Camptotecina (60).



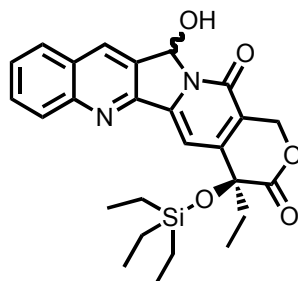
Metodo B: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia (*n*-Esano-EtOAc:1-3). Si ottiene **60**, come una miscela inseparabile di epimeri in rapporto 1:1 (solido giallo pallido, 40%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.25 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 8.25 (s, 1 H, Ar), 7.92 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.81 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.64 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.54 (s, 0.5 H, Ar), 7.52 (s, 0.5 H, Ar), 5.74 (m, 1 H, H-5), 5.66 (d, 0.5 H, *J* = 16.8 Hz), 5.63 (d, 0.5 H, *J* = 16.8 Hz), 5.24 (d, 0.5 H, *J* = 16.8 Hz), 5.22 (d, 0.5 H, *J* = 16.8 Hz), 1.98-1.84 (m, 5 H, H-19 + Me), 1.04-0.96 (m, 12 H), 0.82-0.74 (m, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.9, 158.1, 151.7, 151.2, 149.3, 145.4, 134.7, 130.3, 130.1, (130.0-130.0), 128.3, 128.1, 127.8, 119.9, (98.1-98.0), 75.3, (66.2-66.0), (59.2-59.1), (33.2-33.2), (18.9-18.5), (7.9-7.9), 7.2, 6.5. HRMS *m/z* calc: C₂₇H₃₂N₂O₄Si 476.213, *m/z* trovato: 476.209.

20(S)-OH-5-(tert-Butil-(3-Idrossipropil)dimetil silano)-Camptotecina (61).



Metodo B: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano-EtOAc (gradiente di eluizione: 1-3 poi 1-1). Si ottiene **61**, come una miscela inseparabile di epimeri in rapporto 1:1 (solido giallo pallido, 41%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.29 (s, 1 H, Ar), 8.22 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.91 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.82 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.65 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.63 (s, 0.5 H, Ar), 7.61 (s, 0.5 H, Ar), 5.86 (dd, 0.5 H, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H-5), 5.82 (dd, 0.5 H, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H-5), 5.72 (d, 0.5 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.70 (d, 0.5 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.29 (d, 0.5 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.27 (d, 0.5 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.75 (s, 1 H, OH), 3.55-3.49 (m, 2 H), 2.68-2.58 (m, 1 H), 2.52-2.44 (m, 1 H), 1.98-1.74 (m, 2 H, H-19), 1.25-1.10 (m, 2 H), 1.05 (t, 1.5 H, $J = 7.6$ Hz, Me), 1.04 (t, 1.5 H, $J = 7.6$ Hz, Me), 0.82 (s, 9 H), -0.03 (s, 3 H), -0.07 (s, 3 H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ (174.0-173.9), 157.9, 152.1, (149.8-149.8), 149.2, (146.5-146.5), (133.0-133.0), 130.5 (2C), 129.8, 128.2, 127.9, 119.4, (97.6-97.6), (72.7-72.7), (66.5-66.4), 62.8, (62.4-62.3), 31.6, (27.6-27.1), (26.3-26.1), 25.9, 18.2, (7.9-7.8), ((-5.4)-(-5.4)). HRMS m/z calc: $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ 520.239, m/z trovato: 520.231.

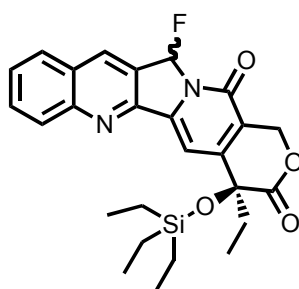
20(S)-OTES-5-OH-Camptotecina (64).



Metodo A: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano-EtOAc (gradiente di eluizione: 1-3 poi 2-7). Si ottiene **64**, come una miscela inseparabile di

epimeri in rapporto 1:1 (solido giallo pallido, 97%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.48 (s, 0.5 H, Ar, H-7), 8.47 (s, 0.5 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.96 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.85 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.67 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.49 (s, 0.5 H, H-14), 7.48 (s, 0.5 H, H-14), 7.09 (d, 0.5 H, $J = 2.8$ Hz, H-5), 7.05 (d, 0.5, $J = 2.8$ Hz, H-5), 5.63 (d, 0.5 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.62 (d, 0.5 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.55 (bs, 0.5 H, OH), 5.51 (bs, 0.5 H, OH), 5.23 (d, 0.5 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.21 (d, 0.5 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 1.94-1.86 (m, 2 H, H-19), 0.98-0.92 (m, 12 H), 0.78-0.72 (m, 6 H). HRMS m/z calc: $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ 478.192, m/z trovato: 478.187.

20(S)-OTES-5-F-Camptotecina (66).



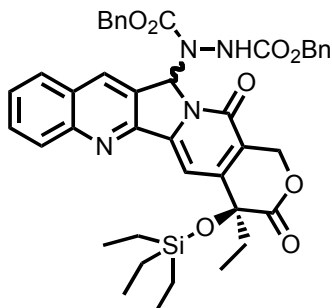
Metodo A: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia *n*-Esano-EtOAc (gradiente di eluizione: 3-1, 2-1 e 1-1). Si separano i diastereoisomeri **66a**, e **66b** come solidi giallo pallido (resa globale 97%).

66a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.52 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.96 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.87 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.69 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.47 (d, 1 H, $^1J_{\text{HF}} = 61.2$ Hz, H-5), 7.45 (s, 1 H, H-14), 5.62 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.22 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.02-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.03-0.93 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.4, 157.5, 152.3, 151.2, 150.3, 143.6, 133.7, 131.7, 130.2, 128.9, 128.4, 127.9, 126.3, 121.8, 98.9, 93.8 (d, $^1J_{\text{CF}} = 213.2$ Hz, C-5), 75.1, 65.7, 33.1, 7.8, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_4\text{Si}$ 480.188, m/z trovato: 480.195.

66b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.51 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.96 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.87 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.51 (d, 1 H, $^1J_{\text{HF}} = 60.8$ Hz, H-5), 7.42 (s, 1 H, H-14), 5.62 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17), 5.20 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17), 2.02-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.04-0.93 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.2, 157.8, 152.5, 151.2, 150.3, 143.7, 133.7,

131.7, 130.2, 128.9, 128.3, 127.9, 126.3, 121.8, 99.0, 93.8 (d, $^1J_{CF} = 214.8$ Hz, C-5), 75.0, 65.8, 33.3, 7.9, 7.1, 6.4. HRMS m/z calc: $C_{26}H_{29}FN_2O_4Si$ 480.188, m/z trovato: 480.192.

20(S)-OTES-5-DBAC-Camptotecina (70).

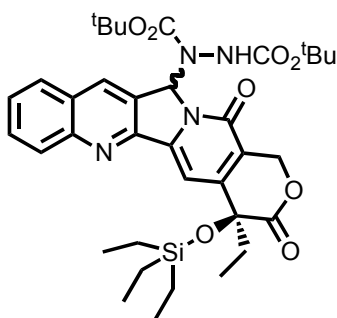


Metodo A: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia *n*-Esano-EtOAc (gradiente di eluizione: 4-1, 7-2). Si separano i diastereoisomeri **70a**, e **70b** come solidi giallo pallido (resa globale 98%).

70a: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.70 (br s, 1 H, Ar), 8.39 (br s 1 H, Ar), 8.22 (br d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.95 (br d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.83 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.65 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.64-7.00 (m, 11 H, Ar + H-14), 6.49 (br s, 1 H, H-5), 5.57 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.47-4.44 (m, 5 H), 1.98-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.02-0.89 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 171.6, 158.0, 156.3, 156.3, 153.0, 152.2, 151.0, 149.6, 144.8, 135.3, 132.1, 130.6, 130.0, 128.6-127.8 (11 C), 119.9, 98.4, 79.5, 75.2, 68.4, 67.9, 65.6, 33.0, 7.9, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $C_{42}H_{44}N_4O_8Si$ 760.293, m/z trovato: 760.289.

70b: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.85 (br s, 1 H, Ar), 8.58 (br s 1 H, Ar), 8.20 (br s, 1 H, Ar), 7.93 (br s, Ar), 7.81 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.63 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.56-6.90 (m, 11 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.55 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.44-4.71 (m, 5 H), 1.98-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.05-0.90 (m, 12 H), 0.81-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 171.5, 157.9, 156.4, 156.4, 152.9, 152.4, 150.9, 149.4, 144.8, 135.3, 132.1, 130.6, 129.9, 128.6-127.8 (11 C), 119.9, 98.5, 79.3, 75.2, 68.4, 67.8, 65.6, 32.9, 7.8, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $C_{42}H_{44}N_4O_8Si$ 760.293, m/z trovato: 760.297.

20(S)-OTES-5-DTBAC-Camptotecina (71).

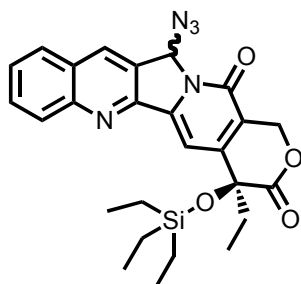


Metodo A: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia *n*-Esano-EtOAc: 3-1. Si separano i diastereoisomeri **71a**, e **71b** come solidi giallo pallido (resa globale 97%).

71a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.80 (br s, 1 H, Ar), 8.23 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.01 (br d, 1 H, Ar), 7.90-7.71 (m, 2 H, Ar), 7.70-7.45 (m, 2 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.61 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.23 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.03-1.81 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.08 (br s, 18 H), 1.06-0.92 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.7, 157.8, 155.5, 155.5, 152.0, 152.0, 151.2, 149.4, 145.0, 132.1, 130.6, 130.0, 128.7, 128.4, 127.9, 119.9, 98.2, 82.7, 81.5, 79.7, 75.2, 65.7, 33.2, 28.3, 27.6, 7.7, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{Si}$ 692.324, m/z trovato: 692.319.

71b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.79 (br s, 1 H, Ar), 8.23 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.01 (br d, 1 H, Ar), 7.85-7.76 (m, 2 H, Ar), 7.65 (br t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.52 (s, 1 H, H-14), 6.54 (br s, 1 H, H-5), 5.61 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.22 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.03-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.76-1.08 (br s, 18 H), 1.04-0.92 (m, 12 H), 0.80-0.70 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.5, 157.9, 155.5, 155.5, 152.3, 152.0, 151.2, 149.4, 145.1, 132.1, 130.6, 130.0, 128.7, 128.4, 127.9, 119.9, 98.2, 82.9, 81.5, 79.6, 75.2, 65.8, 33.3, 28.3, 27.4, 7.8, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{Si}$ 692.324, m/z trovato: 692.317.

20(S)-OTES-5-Azido-Camptotecina (74).

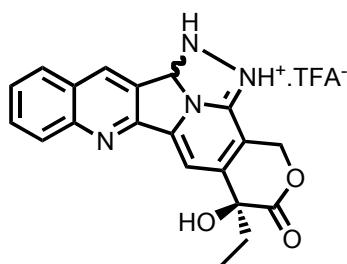


Metodo A: Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia *n*-Esano-EtOAc: (gradiente di eluizione: 3-1, 2-1 e 1-1). Si separano i diastereoisomeri **74a**, e **74b** come solidi giallo pallido (resa globale 97%).

74a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.45 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.95 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.86 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.49 (s, 1 H, H-14), 6.97 (s, 1 H, H-5), 5.65 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.26 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.01-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.03-0.94 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.6, 158.3, 152.2, 150.8, 150.0, 144.0, 132.9, 131.4, 130.1, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1, 120.8, 98.7, 75.4, 75.2, 65.7, 33.1, 7.9, 7.2, 6.4. . HRMS m/z calc: $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}$ 503.199, m/z trovato: 503.191.

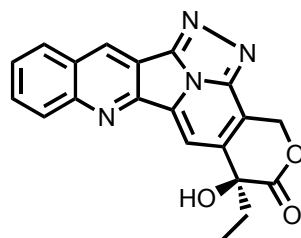
74b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.45 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.24 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.95 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.86 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.46 (s, 1 H, H-14), 6.99 (s, 1 H, H-5), 5.66 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.22 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 2.02-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.03-0.94 (m, 12 H), 0.80-0.71 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.4, 158.4, 152.3, 150.9, 150.0, 144.0, 132.9, 131.4, 130.1, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1, 120.8, 98.7, 75.3, 75.1, 65.8, 33.3, 7.9, 7.2, 6.4. HRMS m/z calc: $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}$ 503.199, m/z trovato: 503.192.

4,5-diidro-triazolo[5,4-c]16a-deossicamptotecina trifluoroacetato (77).



A una soluzione di 20(*S*)-OTES-5-DTBAC-CPT (**71**) (225 mg, 0.32 mmol) sciolti in 8 mL di dicloroetano anidro si aggiungono (0.9 mL, 11.7 mmol) di TFA. La reazione è agitata a temperatura ambiente per 20 h, e poi riflussata per 4 h. L'eccesso dei solventi è rimosso a pressione ridotta e il residuo solido purificato mediante silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH: (30-1). Il prodotto ottenuto è ulteriormente purificato da una seconda cromatografia Toluene-AcOEt: (1-1). Si ottiene **77** come solido giallo pallido (84 mg, 55%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.61 (br s, 0.5 H, N⁵-NH=C^{16a}), 10.39 (br s, 0.5 H, N⁵-NH=C^{16a}), 8.67 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.22-8.15 (m, 1 H, Ar), 7.96-7.92 (m, 1 H, Ar), 7.88-7.78 (m, 1 H, Ar), 7.69-7.60 (m, 2 H, Ar), 6.38-6.36 (m, 1 H, Ar, H-5), 5.72-5.62 (m, 1 H, Ar, H-17), 5.32-5.20 (m, 2 H, Ar, H-17 + N⁵H), 4.08-3.86 (br s, 1 H, OH), 1.96-1.74 (m, 2 H, H-19), 1.05-0.98 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.4 (0.5 C), 173.8 (0.5 C), 159.1, 159.0, 156.7 (q CF₃COOH), 156.5 (q CF₃COOH) 151.5, 151.3, 150.7, 150.5, 150.1, 149.9, 144.8, 144.7, 134.0, 133.8, 131.6, 131.5, 129.9, 129.8, 128.7, 128.7, 128.4, 128.4, 128.2, 128.2, 127.1, 126.9, 120.5, 120.3, 99.1(2 C), 78.9, 78.6, 72.7, 72.7, 66.0 (2 C), 31.7 (2 C), 7.7, 7.7. HRMS *m/z* calc: C₂₂H₁₇F₃N₄O₅ 474.115, *m/z* trovato: 474.109.

Triazolo[5,4-c]16a-deossicamptotecina (78).



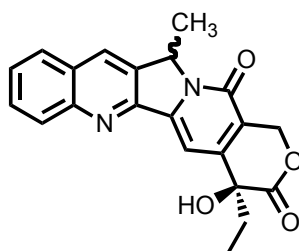
DDQ (25 mg, 0.110 mmol) è aggiunto a una soluzione di **77** (20 mg, 0.042 mmol) sciolto in 4 mL di THF anidro. La miscela di reazione è scaldata a 60 °C e lasciata reagire a

questa temperatura per 3 h. Il solvente è rimosso a pressione ridotta. Al residuo solido si aggiunge acqua e le fasi acquose sono estratte con CH₂Cl₂ (15 mL x 3), anidificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia *n*-Esano-AcOEt: (1-1). Si ottiene **78** (14 mg, 94%) come solido giallo pallido. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.89 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.20 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 8.00 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.88 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.79 (s, 1 H, Ar H-14), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 5.70 (d, 1 H, *J* = 17.2 Hz, H-17), 5.28 (d, 1 H, *J* = 17.2 Hz, H-17), 3.83 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.74 (m, 2 H, H-19), 1.08 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.6, 157.4, 152.5, 150.8, 148.9, 143.7, 134.9, 132.5, 132.4, 130.0, 129.5, 128.7, 127.5, 122.6, 121.4, 101.2, 72.4, 66.0, 31.6, 7.7. HRMS *m/z* calc: C₂₀H₁₄N₄O₃ 358.107, *m/z* trovato: 358.101.

Procedura generale per la deprotezione del Sililetere.

Ad una soluzione di 20(*S*)-OTES-CPT-5-Derivati (1 eq.) in THF anidro (5 mL), Et₃3HF (7.5 eq.) è aggiunto alla miscela di reazione. La reazione è agitata a temperatura ambiente, e monitorata attraverso analisi TLC, fino alla completa scomparsa del materiale di partenza (35-40 h). Il solvente è rimosso a pressione ridotta e il residuo è purificato attraverso silice per flash cromatografia.

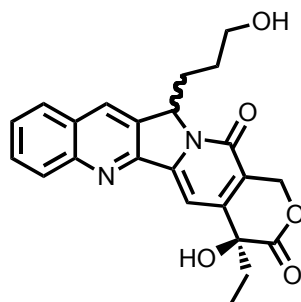
20(*S*)-OH-5-Metil-Camptotecina (**62**).



La reazione di **60** con Et₃3HF genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia (*n*-Esano-AcOEt, 1:3), **62** con resa del 98% come solido giallo pallido. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.25 (s, 1 H, Ar), 8.24 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.92 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.82 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.65 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.63 (s, 1 H, Ar), 5.80-5.70 (m, 2 H, H-5 + H-17), 5.30 (d, 0.5 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.28 (d, 0.5 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 1.98-1.84 (m, 5 H, H-19 + Me), 1.06 (t, 1.5 H, *J* = 7.6 Hz, Me), 1.05 (t, 1.5 H, *J* = 7.6

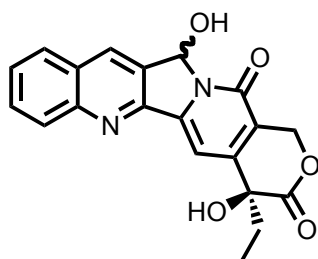
Hz, Me).

20(S)-OH-5-(3-Idrossipropil)-Camptotecina (63).



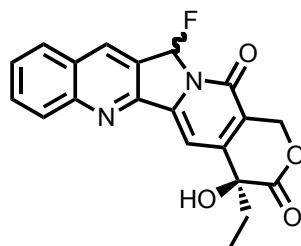
La reazione di **61** con $\text{Et}_3\text{3HF}$ genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia (CH_2Cl_2 -MeOH, 30:1), **63** con resa del 98% come solido giallo pallido. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.31 (s, 1 H, Ar), 8.22 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.92 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.82 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.66 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.65 (s, 0.5 H, Ar), 7.63 (s, 0.5 H, Ar), 5.88 (dd, 0.5 H, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H-5), 5.82 (bt, 0.5 H, $J = 4.8$ Hz, H-5), 5.71 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz, H-17), 5.70 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz, H-17), 5.29 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz, H-17), 5.27 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz, H-17), 3.76 (s, 1 H, OH), 3.71-3.48 (m, 2 H), 2.68-2.48 (m, 2 H), 1.98-1.74 (m, 2 H, H-19), 1.48-1.30 (m, 2 H), 1.06 (t, 1.5 H, $J = 7.6$ Hz, Me), 1.04 (t, 1.5 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.9, 158.0, 150.1, 149.2, 148.8, 146.4, 133.2, 130.6, 130.3, 129.8, (128.3-128.2), 128.0, 119.4, 97.9, (72.7-72.7), (66.4-66.3), 62.4, 62.0, 31.6, (27.9-27.4), (26.5-26.3), (7.9-7.8).

20(S)-OH-5-OH-Camptotecina (65).



La reazione di **64** con $\text{Et}_3\text{3HF}$ genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia (CH_2Cl_2 -MeOH, 30:1), **65** con resa del 98% come solido giallo pallido. ^1H NMR ^{13}C NMR sono già riportati in letteratura (vedi ref. 67).

20(S)-OH-5-F-Camptotecina (67a, 67b).

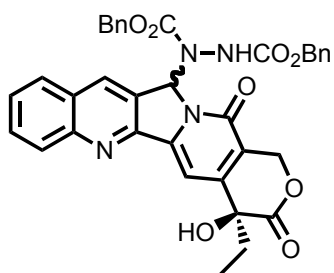


La reazione di **66a** (**66b**) con Et₃NHF genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia (*n*-Esano-AcOEt, 1:1), **67a** (**67b**) con resa del 97% come solido giallo pallido.

67a: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.52 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.25 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.96 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.87 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.59 (s, 1 H, H-14), 7.46 (d, 1 H, ¹*J*_{HF} = 61.2 Hz, H-5), 5.69 (d, 1 H, *J* = 16.8 Hz, H-17), 5.26 (d, 1 H, *J* = 16.8 Hz, H-17), 3.87 (br s, 1 H, OH), 2.01-1.81 (m, 2 H, H-19), 1.05 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.5, 157.6, 151.1, 151.0, 150.2, 144.1, 133.9, 131.9, 130.0, 129.0, 128.5, 127.8, 126.4, 121.7, 98.8, 93.8 (d, ¹*J*_{CF} = 214.0 Hz, C-5), 72.5, 66.0, 31.5, 7.8. HRMS *m/z* calc: C₂₀H₁₅FN₂O₄ 366.102, *m/z* trovato: 366.109.

67b: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.52 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.24 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.96 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.88 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ar), 7.56 (s, 1 H, H-14), 7.51 (d, 1 H, ¹*J*_{HF} = 60.4 Hz, H-5), 5.69 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.25 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 3.87 (br s, 1 H, OH), 1.98-1.78 (m, 2 H, H-19), 1.04 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.3, 157.7, 151.2, 151.2, 150.2, 144.2, 133.8, 131.9, 130.0, 129.0, 128.5, 127.8, 126.4, 121.6, 98.9, 93.7 (d, ¹*J*_{CF} = 214.0 Hz, C-5), 72.5, 66.1, 31.6, 7.8. HRMS *m/z* calc: C₂₀H₁₅FN₂O₄ 366.102, *m/z* trovato: 366.110.

20(S)-OH-5-DBAC-Camptotecina (72a, 72b).

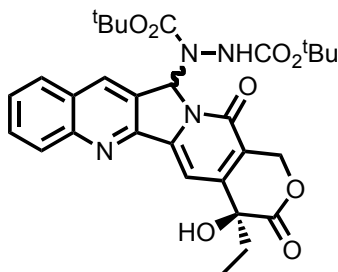


La reazione di **70a** (**70b**) con $\text{Et}_3\text{3HF}$ genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia *n*-Esano-EtOAc: (gradiente di eluizione: 1-1, 2-3), **72a** (**72b**) con resa del 98% come solido giallo pallido.

72a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.67 (br s, 1 H, Ar), 8.39 (br s 1 H, Ar), 8.12 (br d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.95 (br s, 1 H, Ar), 7.74 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.65-6.66 (m, 12 H, Ar + H-14), 6.48 (br s, 1 H, H-5), 5.55 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz, H-17), 5.42-4.44 (m, 5 H), 3.86 (br s, 1 H, OH), 1.92-1.72 (m, 2 H, H-19), 0.95 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.5, 158.0, 156.2, 156.0, 153.0, 150.9, 150.9, 149.5, 145.3, 135.4, 132.2, 130.7, 129.8, 128.7-127.8 (11 C), 119.9, 98.2, 79.6, 72.7, 68.5, 68.0, 65.9, 31.6, 7.8.

72b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.71 (br s, 1 H, Ar), 8.34 (br s 1 H, Ar), 8.18 (br s, 1 H, Ar), 7.94 (br s, 1 H, Ar), 7.79 (br t, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.70-6.70 (m, 12 H, Ar + H-14), 6.52 (br s, 1 H, H-5), 5.53 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.44-4.48 (m, 5 H), 3.87 (br s, 1 H, OH), 1.90-1.70 (m, 2 H, H-19), 0.99 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.4, 158.0, 156.3, 156.1, 153.0, 151.0, 150.9, 149.6, 145.3, 135.5, 132.3, 130.8, 129.8, 128.7-127.8 (11 C), 119.8, 98.4, 79.5, 72.7, 68.5, 67.8, 66.0, 31.6, 7.7.

20(S)-OH-5-DTBAC-Camptotecina (73a, 73b).



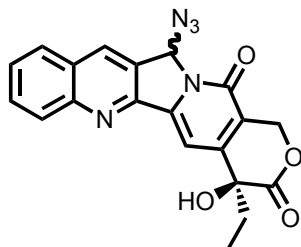
La reazione di **71a** (**71b**) con $\text{Et}_3\text{3HF}$ genera dopo purificazione su silice per flash

cromatografia (*n*-Esano-EtOAc, 3:2), **73a** (**73b**) con resa del 97% come solido giallo pallido.

73a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.77 (br s, 1 H, Ar), 8.16 (br d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 7.97 (br s, 1 H, Ar), 7.86-7.50 (m, 4 H, Ar), 6.51 (br s, 1 H, H-5), 5.66 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.24 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.86 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.13 (br s, 18 H), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.7, 157.9, 155.5, 155.5, 152.1, 151.3, 150.7, 149.6, 145.7, 132.3, 130.7, 129.9, 128.7, 127.9, 127.6, 120.0, 97.9, 82.8, 81.6, 79.7, 72.7, 66.1, 31.8, 28.3, 27.7, 7.7.

73b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.79 (br s, 1 H, Ar), 8.22 (br d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.99 (br s, 1 H, Ar), 7.88-7.50 (m, 4 H, Ar), 6.53 (br s, 1 H, H-5), 5.65 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.26 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.80 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.80 (m, 2 H, H-19), 1.79-1.13 (br s, 18 H), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.6, 157.9, 155.4, 155.4, 152.1, 151.3, 150.8, 149.5, 145.6, 132.3, 130.8, 129.8, 128.7, 127.9, 127.8, 119.8, 98.0, 83.0, 81.5, 79.7, 72.7, 66.3, 31.8, 28.3, 27.7, 7.8.

20(*S*)-OH-5-Azido-Camptotecina (**75a**, **75b**).



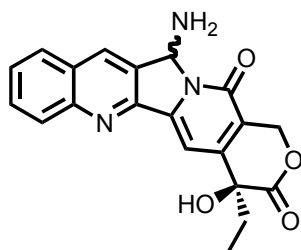
La reazione di **71a** (**71b**) con $\text{Et}_3\text{3HF}$ genera dopo purificazione su silice per flash cromatografia (*n*-Esano-EtOAc, 1:1), **75a** (**75b**) con resa del 97% come solido giallo pallido.

75a: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.44 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.24 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.93 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.85 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.67 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.63 (s, 1 H, H-14), 6.97 (s, 1 H, H-5), 5.70 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.29 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 3.99 (br s, 1 H, OH), 2.00-1.84 (m, 2 H, H-19), 1.04 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.6, 158.3, 150.8, 150.7, 149.8, 144.4, 133.1, 131.5,

129.9, 128.6, 128.3, 128.3, 128.1, 120.6, 98.6, 75.4, 72.7, 66.0, 31.5, 7.8. HRMS m/z calc: $C_{20}H_{15}N_5O_4$ 389.112, m/z trovato: 389.108.

75b: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.45 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.23 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.95 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.85 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.60 (s, 1 H, H-14), 7.00 (s, 1 H, H-5), 5.74 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.28 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 3.86 (br s, 1 H, OH), 1.98-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.04 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 173.4, 158.4, 150.9, 150.7, 149.8, 144.5, 133.0, 131.5, 129.9, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 120.6, 98.6, 75.3, 72.6, 66.1, 31.6, 7.8. HRMS m/z calc: $C_{20}H_{15}N_5O_4$ 389.112, m/z trovato: 389.109.

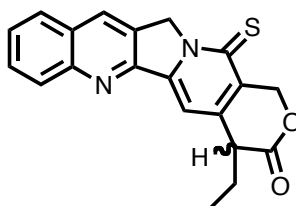
20(S)-OH-5-NH₂-Camptotecina (79).



20-OH-5-N3-CPT estere **75a (75b)** (50 mg, 0.129 mmol) è disciolto in una miscela di THF-MeOH (2:1). 10% Pd/C anidro (14 mg) è aggiunto molto attentamente; l'ossigeno disciolto è rimosso sotto vuoto. Si eseguono un paio di cicli vuoto/H₂ e la miscela di reazione è agitata per 3 h a temperatura ambiente. Il catalizzatore è rimosso mediante filtrazione su uno strato di Celite mentre il filtrato è concentrato sotto vuoto. Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH (gradiente di eluizione 35:1, 25:1). Si ottiene **79** (46 mg, 98%) come solido giallo pallido. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.48 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.22-8.17 (m, 1 H, Ar), 7.95-7.90 (m, 1 H, Ar), 7.85-7.78 (m, 1 H, Ar), 7.68-7.60 (m, 1 H, Ar), 7.58 (s, 0.5 H, H-14), 7.54 (s, 0.5 H, H-14), 6.50 (s, 0.5 H, H-5), 6.47 (s, 0.5 H, H-5), 5.74-5.64 (m, 1 H, H-17), 5.28-5.22 (m, 1 H, H-17), 4.00-2.40 (br s, 3 H, OH + NH₂), 1.98-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.07-1.01 (m, 3 H, Me). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 173.8 (2 C), 158.5 (2 C), 151.2 (2 C), 150.4 (2 C), 149.7 (2 C), 144.5 (2 C), 132.7 (2 C), 131.0 (2 C), 129.8 (2 C), 128.5 (2 C), 128.3 (2 C), 128.0 (2 C), 127.8 (2 C), 120.2 (2 C), 113.8 (2 C), 97.7 (2 C), 72.7 (2 C), 66.3, 66.0 31.5 (2 C), 7.8, 7.8.

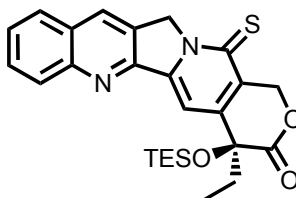
CAPITOLO 4

20-Desossi-TioCamptotecina (86)



Camptotecina (**1**) (100 mg, 0.29 mmol) è sospesa in 3 mL di xilene anidro. Successivamente si aggiungono (160 mg, 0.40 mmol) del reagente di Lawesson e la miscela di reazione è rifevoluta per 3 h. Il solvente in eccesso è rimosso a pressione ridotta, e il residuo solido è purificato mediante silice per flash cromatografia n-Esano-AcOEt (1:1). Si ottengono (63 mg, 63%) di 20-desossi-TioCPT (**86**) come solido arancione. $[\alpha]_D^{20} = 4.2$ ($c = 0.36$ g cm^{-3} in CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.43 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.20 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.94 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 7.84 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ar), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.56 (s, 1 H, H-14), 5.92 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.55 (s, 2 H, H-5), 5.51 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 3.66 (t, 1 H, $J = 6.8$ Hz, H-20), 2.10 (m, 2 H, H-19), 1.08 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, H-18). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.8, 170.5, 151.6, 148.9, 148.0, 142.7, 132.4, 130.9, 130.9, 129.6, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 105.8, 68.9, 56.2, 45.5, 25.7, 11.3. MS (70eV): m/z . (rel intensità), 348 [M^+] (100), 320 [$\text{M}^+ - 28$] (40), 303 [$\text{M}^+ - 45$] (48), 265 [$\text{M}^+ - 83$] (85) HR-MS: massa calc. = 348.093, massa trovata = 348.098.

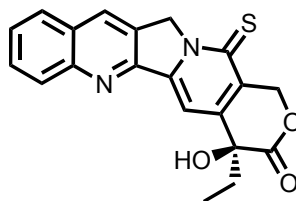
20(S)-OTES-TioCamptotecina (87).



A una soluzione di 20(S)-OTES-CPT (**59**) (664 mg, 1.44 mmol) in 20 mL di xilene anidro, si aggiunge (523 mg, 1.29 mmol) il reagente di Lawesson. La reazione è scaldata a 90-100°C e dopo 18 h non si osservava più conversione, il solvente in eccesso è rimosso a

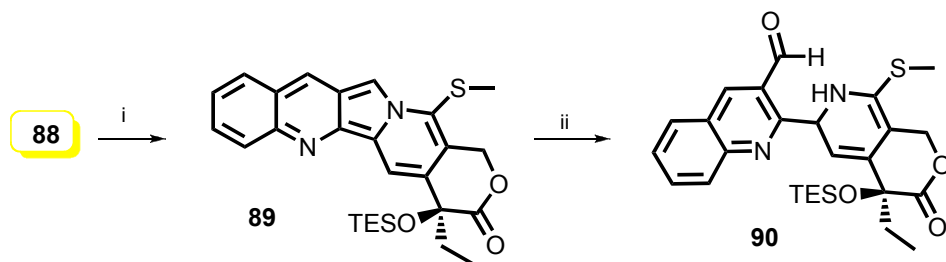
pressione ridotta e il residuo solido purificato mediante silice per flash cromatografia n-Esano-AcOEt (gradiente di eluizione 4:1, 7:2). Si ottengono (578 mg, 84%) di **87** come solido giallo. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.46 (s, 1 H, Ar, H-7) 8.29 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.03 (s, 1 H, H-14), 7.97 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.86 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.69 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 6.15 (d, 1 H, $J = 16.9$ Hz, H-17), 5.62 (d, 1 H, $J = 21.0$ Hz, H-5), 5.57 (d, 1 H, $J = 21.0$ Hz, H-5), 5.34 (d, 1 H, $J = 16.9$ Hz, H-17), 1.92 (q, 2 H, H-19), 1.05-0.91 (m, 12 H), 0.82-0.71 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.3, 171.5, 151.9, 149.1, 148.3, 147.2, 130.8, 130.6, 130.6, 130.1, 128.3, 128.2, 128.2, 128.0, 104.5, 75.0, 68.8, 56.3, 33.5, 7.7, 7.2, 6.4. MS (70eV): m/z. (rel. intensità), 479 [$\text{M}^+ + 1$] (10), 450 [$\text{M}^+ - 28$] (100) HR-MS: massa calc. = 478.175, massa trovata = 478.169

20(S)-OH-TioCamptotecina (**88**).



A una soluzione di 20(S)-OTES-TioCPT (**87**) (150 mg, 0.31 mmol) in 10 mL di THF anidro, $\text{Et}_3\text{3HF}$ (0.14 mL, 0.82 mmol) è aggiunto alla miscela di reazione. La reazione è agitata a temperatura ambiente, e seguita attraverso analisi TLC, fino alla completa scomparsa del materiale di partenza 48 h. Il solvente è rimosso a pressione ridotta e il residuo è purificato attraverso silice per flash cromatografia CH_2Cl_2 -MeOH (30:1). Si ottengono (112 mg, 98%) di **88** come solido giallo. $[\alpha]_D^{20} = 137.7$ ($c = 0.47$ g cm^{-3} in THF); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.46 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.27 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 8.13 (s, 1 H, H-14), 7.97 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.86 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 7.70 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar), 6.25 (d, 1 H, $J = 16.9$ Hz, H-17), 5.62 (d, 1 H, $J = 21.0$ Hz, H-5), 5.58 (d, 1 H, $J = 21.0$ Hz, H-5), 5.37 (d, 1 H, $J = 16.9$ Hz, H-17), 3.80 (s, 1 H, OH), 1.90 (q, 2 H, H-19), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, Me). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 173.5, 172.6, 151.8, 149.1, 148.7, 145.5, 130.9, 130.8, 130.5, 129.9, 128.3 (2 C), 128.2, 128.0, 104.3, 72.3, 69.2, 56.3, 32.0, 7.8. MS (70eV): m/z. (rel. intensità), 364 [M^+] (100), IR (NaCl): 1752, 1631, 1537 cm^{-1} ; HR-MS: massa calc. = 364.088, massa trovata = 364.081.

(S)-2-(4-etil-8-(metiltio)-3-oxo-4-(trietilsililossi)-3,4-diidro-1H-pirano[3,4-c]piridin-6-il)quinoline-3-carbaldeide (90).



A una soluzione di (**87**) (20 mg, 0.042 mmol) in 0.75 mL di THF- d_8 in un tubo NMR, t -BuOK (6.6 mg, 0.059 mmol) è aggiunto alla reazione. La soluzione diventa immediatamente blu scura e lo spettro ^1H NMR è registrato dopo 30 minuti, mostrando la presenza del corrispondente tiolato. Il tiolato è spento mediante aggiunta di MeI (3.6 μL , 0.059 mmol) che genera il composto instabile (**89**) (vedi spettro ^1H NMR e ^{13}C NMR). In seguito la miscela risultante è stata trattata con una soluzione satura di NH_4Cl , le fasi acquose sono state estratte con CH_2Cl_2 (2 x 10 mL) anidificate su Na_2SO_4 , filtrate e concentrate sotto vuoto. Il residuo solido è purificato tramite silice per flash cromatografia n-Esano-AcOEt (2:1). Si ottiene **90** in resa quantitativa come solido bianco.

Tiolato: ^1H NMR (THF- d_8 , 400 MHz) δ 8.73 (s, 1 H), 8.37 (s, 1 H), 8.33 (s, 1 H), 8.05 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.80 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.33 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.22 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 6.41 (d, 1 H, $J = 14.8$ Hz, H-17), 5.43 (d, 1 H, $J = 14.8$ Hz, H-17), 1.94 (m, 2 H, H-19), 1.03 (t, 9 H, $J = 8.0$ Hz), 0.95 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz), 0.80 (q, 6 H, $J = 8.0$ Hz). ^{13}C NMR (THF- d_8 , 400 MHz) (picchi rilevanti) δ 176.1, 145.8, 140.9, 132.2, 129.6, 128.7, 125.9, 124.8, 122.3, 121.9, 119.2, 106.0, 99.7, 79.0, 72.6, 34.7, 9.4, 9.0, 8.7.

89. ^1H NMR (THF- d_8 , 400 MHz) δ 8.87 (s, 1 H), 8.74 (s, 1 H), 8.51 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 8.00 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.59 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.42 (t, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 6.10 (d, 1 H, $J = 14.8$ Hz, H-17), 5.72 (d, 1 H, $J = 14.8$ Hz, H-17), 2.52 (s, 3 H, Me), 1.98 (m, 2 H, H-19), 1.03 (t, 9 H, $J = 8.0$ Hz), 0.98 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz), 0.81 (q, 6 H, $J = 8.0$ Hz). ^{13}C NMR (THF- d_8 , 400 MHz) (picchi rilevanti) δ 172.3, 146.4, 138.8, 131.9, 130.2, 129.6, 129.2, 128.3, 127.2, 127.1, 124.5, 123.7, 120.5, 116.3, 100.5, 76.7, 67.7, 32.3,

13.4, 7.4, 7.0, 6.7.

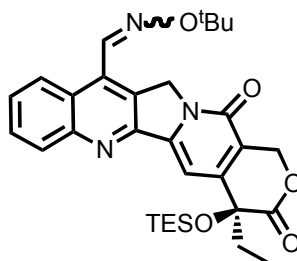
90. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.62 (s, 1 H, CHO), 8.68 (s, 1 H), 8.60 (s, 1 H), 8.17 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 8.00 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 7.87 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 7.66 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 5.57 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 5.29 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 2.65 (s, 3 H, Me), 1.91 (m, 2 H, H-19), 1.02 (t, 9 H, $J = 8.0$ Hz), 0.99 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz), 0.78 (m, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) (picchi rilevanti) δ 192.0, 171.9, 155.9, 154.8, 149.4, 149.2, 137.9, 132.2, 130.2, 130.1, 129.2, 128.2, 127.3, 122.2, 116.7, 66.3, 33.4, 13.6, 8.1, 7.5, 6.7.

CAPITOLO 5

Procedura generale per la formazione di 20-(S)-OTES-Analoghi (92, 95, 100).

Il derivato **5**, **28**, e **91** (1 eq.) è sospeso in 3 mL di DMF anidra, successivamente si addiziona imidazolo (5 eq.). Dopo 10 min si introduce trietilsilil cloruro (4 eq.) seguita dall'aggiunta di DMAP (1 eq.). La reazione è agitata a temperatura ambiente fino a completa scomparsa del materiale di partenza evidenziata da analisi TLC (CH₂Cl₂-MeOH:30-1). L'eccesso di solvente è rimosso a pressione ridotta, poi si aggiunge acqua e le fasi acquose sono estratte con CH₂Cl₂ (20 mL x 3); le fasi organiche sono poi anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate sotto vuoto. Il grezzo di reazione è purificato mediante silice per flash cromatografia.

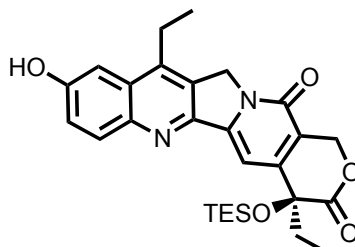
20(S)-OTES-Gimatecan (92).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano-EtOAc (1:1). Si ottiene **92**, come una miscela (E/Z = 70/30), solido giallo pallido, 97%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.02 (s, 1 H, CH=N E), 8.29 (d, 1 H, J = 8.42 Hz, Ar, H-12E + H-12Z), 8.23 (d, 1 H, J = 7.6 Hz, H-9E), 8.00 (s, 1 H, CH=N Z), 7.99 (d, 1 H, J = 7.6 Hz, H-9Z), 7.83 (t, 1 H, J = 7.4 Hz, H-11E + H-11Z), 7.68 (t, 1 H, J = 7.4 Hz, H-10E + H-10Z), 7.57 (s, 1 H, H-14E + H-14Z), 5.67 (d, 1 H, J = 16.4 Hz, H-17E + H-17Z), 5.43 (s, 2 H, H-5E), 5.26 (d, 1 H, J = 16.4 Hz, H-17E), 5.25 (d, 1 H, J = 16.4 Hz, H-17Z), 5.20 (s, 2 H, H-5Z), 2.00-1.84 (m, 2 H, H-19E + H-19Z), 1.50 (s, 9 H, O^tBuE), 1.35 (s, 9 H, O^tBuZ), 1.02-0.94 (m, 12 H, E + Z), 0.80-0.70 (m, 6 H, E + Z). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.9 (E + Z, C-21), 157.5 (E + Z, C-16a), 152.5 (E), 152.3 (Z), 151.3 (E + Z), 149.7 (E), 149.0 (Z), 145.7 (E + Z), 142.2 (CH=N E), 139.4 (CH=N Z), 132.9 (E), 132.1 (Z), 130.9 (E, CH, Ar), 130.6 (Z, CH, Ar), 130.3 (Z, CH; Ar), 130.1 (E, CH, Ar), 128.1 (E + Z, CH, Ar), 125.6 (Z), 125.4 (E), 124.7 (Z, CH, Ar), 122.8 (E, CH, Ar), 119.1 (Z), 118.9 (E), 98.3 (Z, C-14), 98.1 (E, C-14), 81.4

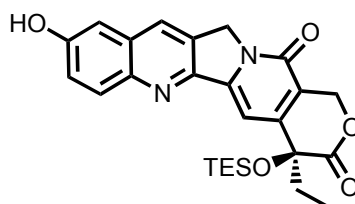
(*E*, OC(CH₃)₃), 81.2 (*Z*, OC(CH₃)₃), 75.3 (*E* + *Z*, C-20), 66.0 (*E* + *Z*, C-17), 52.7 (*E*, C-5), 51.2 (*Z*, C-5), 33.3 (*E*, C-19), 33.2 (*Z*, C-19), 27.6 (OC(CH₃)₃ *E*), 27.5 (OC(CH₃)₃ *Z*), 7.9 (*E* + *Z* C-18), 7.2 (*E* + *Z*), 6.4 (*E* + *Z*).

20(*S*)-OTES-SN38 (**95**).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH:30-1. Si ottiene **95**, come solido giallo pallido, (94%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.26 (br s, 1 H, OH), 8.14 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ar, H-12), 7.58 (s, 1 H, H-14), 7.49 (dd, 1 H, *J*₁ = 9.2 Hz *J*₂ = 2.2 Hz, H-11), 7.46 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz, H-9), 5.70 (d, 1 H, *J* = 16.5 Hz, H-17), 5.28 (d, 1 H, *J* = 16.5 Hz, H-17), 5.23 (s, 2 H, H-5), 3.05 (q, 2 H, *J* = 7.5 Hz), 1.97-1.81 (m, 2 H, H-19), 1.32 (t, 3 H, *J* = 7.5 Hz, Me), 0.98-0.88 (m, 12 H), 0.77-0.68 (m, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.1, 157.9, 156.6, 152.1, 149.0, 146.7, 144.6, 143.6, 131.9, 128.7, 126.9, 122.8, 117.9, 105.5, 98.5, 75.4, 65.9, 49.5, 32.9, 23.2, 13.5, 7.8, 7.2, 6.4.

20(*S*)-OTES-10-OH-CPT (**100**).



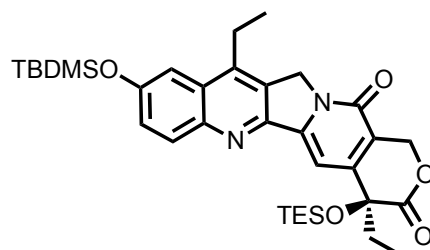
Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂-MeOH:20-1. Si ottiene **100**, come solido giallo pallido, (94%). ¹H NMR (CDCl₃ + 5% CD₃OD, 400 MHz) δ 8.10 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.05 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ar), 7.50 (s, 1 H, H-14), 7.39 (dd, 1 H, *J*₁ = 9.2 Hz *J*₂ = 2.4 Hz, H-11), 7.11 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz, H-9), 5.60 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.21 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz, H-17), 5.15 (s, 2 H, H-5), 1.97-1.81 (m, 2 H, H-19), 0.98-0.88 (m, 12 H), 0.76-0.68 (m, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃ + 5% CD₃OD, 100 MHz) δ 172.2,

157.8, 156.7, 151.8, 149.2, 146.1, 144.1, 130.9, 129.8, 129.0, 128.6, 123.2, 117.8, 108.8, 98.1, 75.4, 65.8, 50.0, 32.9, 7.7, 7.1, 6.3.

Procedura generale per la protezione del residuo 10-OH dei 20-(S)-OTES-Analoghi (96, 101).

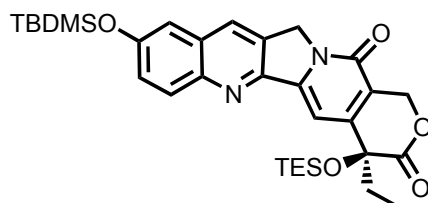
Il derivato **95**, **101** (1 eq.) è sciolta in una miscela anidra di CH₂Cl₂/THF = 1:1 (4 mL), successivamente si addiziona imidazolo (5 eq.). Dopo 10 min si introduce ter-Butildimetilsilil cloruro (4 eq.) seguita dall'aggiunta di DMAP (1 eq.). La reazione è agitata a temperatura ambiente fino a completa scomparsa del materiale di partenza evidenziata da analisi TLC (Cicloesano/AcOEt = 1/3). L'eccesso di solvente è rimosso a pressione ridotta, poi si aggiunge acqua e le fasi acquose sono estratte con CH₂Cl₂ (20 mL x 3); le fasi organiche sono poi anidrificate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate sotto vuoto. Il grezzo di reazione è purificato mediante silice per flash cromatografia.

20(S)-OTES-10-OTBS-SN38 (96).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano/AcOEt = 1/1. Si ottiene **96**, come solido giallo pallido, (85%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.14 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ar, H-12), 7.49 (s, 1 H, H-14), 7.40 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz, H-9), 7.38 (dd, 1 H, *J*₁ = 8.8 Hz *J*₂ = 2.5 Hz, H-11), 5.67 (d, 1 H, *J* = 16.5 Hz, H-17), 5.25 (d, 1 H, *J* = 16.5 Hz, H-17), 5.23 (s, 2 H, H-5), 3.11 (q, 2 H, *J* = 7.6 Hz), 1.99-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.38 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me), 1.04 (s, 9 H), 1.00-0.92 (m, 12 H), 0.78-0.69 (m, 6 H), 0.30 (s, 6 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.9, 157.7, 155.1, 151.5, 150.1, 146.8, 145.6, 143.5, 132.2, 128.2, 126.9, 125.9, 118.0, 110.5, 97.7, 75.4, 66.0, 49.3, 33.2, 25.6, 23.1, 18.3, 13.7, 7.9, 7.2, 6.4, -4.3.

20(S)-OTES-10-OTBS-CPT (101).

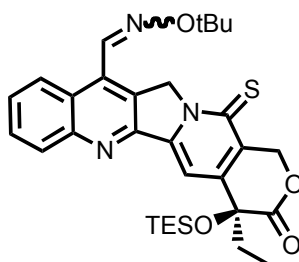


Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Cicloesano/AcOEt = 1/3. Si ottiene **101**, come solido giallo pallido, (90%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.22 (s, 1H, Ar, H-7), 8.13 (d, 1 H, $J = 9.2$ Hz, Ar, H-12), 7.51 (s, 1 H, H-14), 7.39 (dd, 1 H, $J_1 = 9.2$ Hz $J_2 = 2.8$ Hz, H-11), 7.22 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, H-9), 5.66 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz, H-17), 5.25 (s, 2 H, H-5), 5.24 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz, H-17), 1.99-1.82 (m, 2 H, H-19), 1.03 (s, 9 H), 1.00-0.92 (m, 12 H), 0.78-0.69 (m, 6 H), 0.29 (s, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.0, 157.7, 155.1, 151.5, 150.6, 146.1, 145.1, 131.4, 129.4, 129.3, 128.7, 126.7, 118.3, 114.5, 97.7, 75.3, 66.0, 49.9, 33.1, 25.6, 18.3, 7.9, 7.2, 6.4, -4.3.

Procedura generale per la reazione di tionazione sui derivati (93, 97, 102).

A una soluzione di **92**, **96**, e **101** (1 eq.) in 20 mL di xilene anidro, si aggiunge il reagente di Lawesson (1.5 eq.). Dopo 10 min si introduce trietilsilil cloruro (4 eq.) seguita dall'aggiunta di DMAP (1 eq.). La reazione è scaldata a 90-100°C e dopo 18 h non si osservava più conversione; il solvente in eccesso è rimosso a pressione ridotta e il residuo solido purificato mediante silice per flash cromatografia.

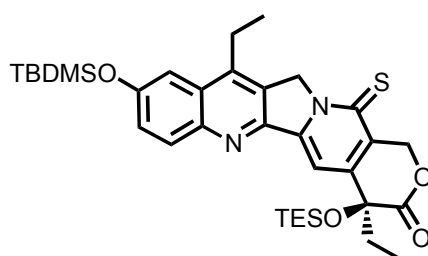
20(S)-OTES-Tio-Gimatecan (93).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano/AcOEt = 4/1. Si ottiene **93**, come una miscela (E/Z = 90/10), solido giallo, 71%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.06 (s, 1 H, $\text{CH}=\text{N}$ E) 8.33 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz, Ar, H-12E), 8.27 (d, 1 H, $J = 7.6$

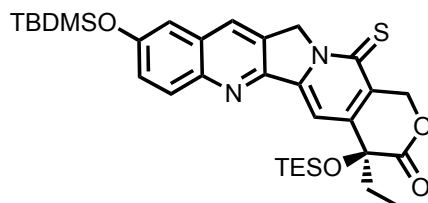
Hz, H-9E), 8.02 (s, 1 H, H-14 E), 7.87 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz, H-11E), 7.73 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz, H-10E), 7.57 (s, 1 H, H-14E + H-14Z), 6.18 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17E), 5.73 (s, 2 H, H-5E), 5.35 (d, 1 H, $J = 17.2$ Hz, H-17E), 1.93 (q, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-19E), 1.55 (s, 9 H, O'BuE), 1.06-0.92 (m, 12 H, E), 0.82-0.72 (m, 6 H, E). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.4, 171.5, 151.8, 149.8, 148.0, 146.9, 141.9, 132.3, 131.0, 130.7, 130.3, 128.4, 125.6, 125.1, 122.9, 104.3, 81.8, 75.0, 68.9, 59.2, 33.6, 27.6, 7.8, 7.2, 6.5.

20(S)-OTES-10-OTBS-Tio-SN38 (97).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano/AcOEt = 5/1. Si ottiene **97**, come solido giallo, (84%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.17 (d, 1 H, $J = 8.9$ Hz, Ar, H-12), 7.96 (s, 1 H, H-14), 7.43 (d, 1 H, $J = 2.6$ Hz, H-9), 7.41 (dd, 1 H, $J_1 = 8.8$ Hz $J_2 = 2.6$ Hz, H-11), 6.16 (d, 1 H, $J = 17.1$ Hz, H-17), 5.56 (d, 1 H, $J = 20.0$ Hz, H-5), 5.50 (d, 1 H, $J = 20.0$ Hz, H-5), 5.33 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz, H-17), 3.18 (q, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 1.91 (q, 2 H, $J = 7.4$ Hz, H-19), 1.41 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me), 1.05 (s, 9 H), 1.03-0.92 (m, 12 H), 0.81-0.72 (m, 6 H), 0.31 (s, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.1, 171.5, 155.4, 149.4, 149.3, 147.4, 145.7, 143.6, 132.4, 129.9, 128.5, 126.5, 126.2, 110.5, 104.1, 75.0, 68.8, 55.8, 33.5, 25.7, 23.2, 18.4, 13.9, 7.8, 7.2, 6.5, -4.3.

20(S)-OTES-10-OTBS-Tio-CPT (102).



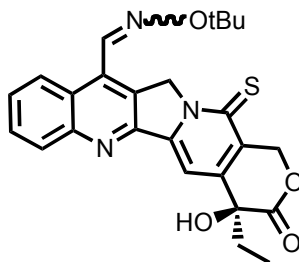
Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Cicloesano/AcOEt = 4/1. Si ottiene **102**, come solido giallo, (90%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.28 (s, 1H,

Ar, H-7), 8.16 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar, H-12), 7.97 (s, 1 H, H-14), 7.40 (dd, 1 H, $J_1 = 9.2$ Hz $J_2 = 2.8$ Hz, H-11), 7.26 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, H-9), 6.15 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 5.58 (d, 1 H, $J = 20.0$ Hz, H-5), 5.53 (d, 1 H, $J = 20.0$ Hz, H-5), 5.33 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17), 1.91 (q, 2 H, $J = 7.4$ Hz, H-19), 1.04 (s, 9 H), 1.02-0.92 (m, 12 H), 0.82-0.72 (m, 6 H), 0.30 (s, 6 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.1, 171.5, 155.5, 149.8, 148.6, 147.3, 145.3, 131.5, 130.1, 129.8, 129.1, 128.3, 127.0, 114.5, 104.0, 75.0, 68.8, 56.3, 33.5, 25.6, 18.3, 7.8, 7.2, 6.4, -4.3.

Procedura generale per la deprotezione dei Silileteri (**94**, **98** e **103**).

Il derivato **93**, **97**, e **102** (1 eq.) è sciolto in THF anidro (5 mL), $\text{Et}_3\text{3HF}$ (7.5 eq.) è aggiunto alla miscela di reazione. La reazione è agitata a temperatura ambiente, e monitorata attraverso analisi TLC, fino alla completa scomparsa del materiale di partenza (35-40 h). Il solvente è rimosso a pressione ridotta e il residuo è purificato attraverso silice per flash cromatografia.

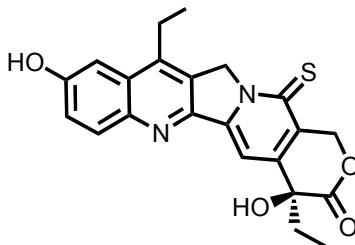
20(S)-OH-Tio-Gimatecan (**94**).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano/AcOEt = 2/1. Si ottiene **94**, come una miscela (E/Z = 70/30), solido giallo, 95%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9.02 (s, 1 H, $\text{CH}=\text{N}$ E) 8.28 (d, 1 H, $J = 8.42$ Hz, Ar, H-12E + H-12Z), 8.23 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, H-9E), 8.09 (br s, 1 H, H-14E + H-14Z), 8.08 (s, 1 H, $\text{CH}=\text{N}$ Z), 8.04 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, H-9Z), 7.85 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz, H-11E + H-11Z), 7.70 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz, H-10E + H-10Z), 6.26 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17E), 6.24 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz, H-17Z), 5.67 (s, 2 H, H-5E), 5.51 (s, 2 H, H-5Z), 5.37 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17E + H-17Z), 3.87 (br s, 1 H, OH), 1.89 (q, 2 H, H-19E + H-19Z), 1.55 (s, 9 H, O^tBu E), 1.42 (s, 9 H, O^tBu Z), 1.03 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, H-18 Z), 1.02 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, H-18 E). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ

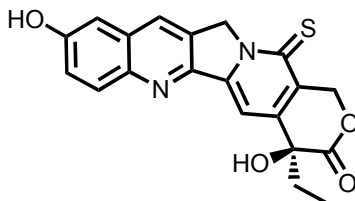
173.5, 172.5, 151.7, 149.7, 148.4, 145.2, 141.9 (CH=N *E*), 139.0 (CH=N *Z*), 132.3, 130.8, 130.6, 130.5, 128.5, 125.5, 125.0, 122.9, 104.0, 81.8, 72.3, 69.3, 59.2, 32.1, 27.6, 7.7.

20(S)-OH-Tio-SN38 (98).



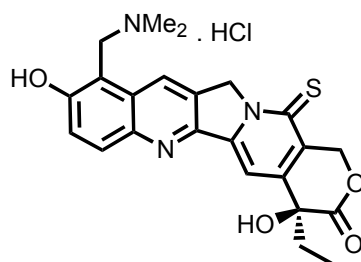
Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia Esano/AcOEt = 1/3. Si ottiene **98**, come solido giallo, (98%). ¹H NMR (THF-*d*₈, 400 MHz) δ 9.23 (br s, 1 H, OH), 8.06 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ar, H-12), 7.88 (s, 1 H, H-14), 7.41 (d, 1 H, *J* = 2.6 Hz, H-9), 7.38 (dd, 1 H, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, H-11), 6.08 (d, 1 H, *J* = 17.2 Hz, H-17), 5.67 (br s, 1 H, OH), 5.50 (s, 2 H, H-5), 5.33 (d, 1 H, *J* = 17.2 Hz, H-17), 3.22 (q, 2 H, *J* = 7.8 Hz), 1.91 (q, 2 H, *J* = 7.6 Hz, H-19), 1.42 (t, 3 H, *J* = 7.8 Hz, Me), 0.97 (t, 3 H, *J* = 7.9 Hz, Me). ¹³C NMR (THF-*d*₈, 100 MHz) δ 173.0, 172.1, 157.5, 149.6, 149.2, 146.1, 145.0, 142.6, 132.3, 130.1, 128.9, 127.6, 122.3, 104.9, 102.3, 72.3, 68.5, 55.8, 31.7, 22.7, 13.1, 7.3.

20(S)-OH-10-OH-Tio-CPT (103).



Il grezzo di reazione è purificato su silice per flash cromatografia CH₂Cl₂/MeOH (gradiente di eluizione 25/1 poi 20/1). Si ottiene **103**, come solido giallo, (90%). ¹H NMR (THF-*d*₈, 400 MHz) δ 9.20 (br s, 1 H, OH), 8.37 (s, 1H, Ar, H-7), 8.05 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ar, H-12), 7.89 (s, 1 H, H-14), 7.39 (dd, 1 H, *J*₁ = 9.2 Hz *J*₂ = 2.8 Hz, H-11), 7.22 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, H-9), 6.07 (d, 1 H, *J* = 17.2 Hz, H-17), 5.70 (br s, 1 H, OH), 5.47 (s, 2 H, H-5), 5.33 (d, 1 H, *J* = 16.8 Hz, H-17), 1.89 (q, 2 H, *J* = 7.6 Hz, H-19), 0.97 (t, 3 H, *J* = 7.6 Hz, Me). ¹³C NMR (THF-*d*₈, 100 MHz) δ 173.0, 172.1, 157.4, 149.7, 149.0, 146.1, 144.5, 131.3, 130.5, 130.2, 129.7, 128.6, 123.0, 108.9, 102.3, 72.3, 68.5, 56.5, 31.7, 7.3.

20(S)-OH-Tio-Topotecan (**104**).



10-OH Tio-Camptotecina **103** (0.150 g, 0.421 mmol) viene sciolta in una miscela di CH_2Cl_2 anidro (3.5 mL) e *n*-Propanolo (1.8 mL) sotto agitazione e in atmosfera inerte. Successivamente si sgocciola bis(dimetilammino)metano (0.092 g, 0.905 mmol). La miscela di reazione è agitata a temperatura ambiente per 5 h, si controlla la scomparsa del reagente mediante TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 25/1$). Successivamente si introduce una miscela di 0.125 g di HCl concentrato in 1 mL di *n*-PrOH e si lascia reagire per altre 16 h. Il prodotto È filtrato e lavato più volte con CH_2Cl_2 e Et_2O . Si ottiene **104** (0.168 g, 0.370 mmol, 88%) come solido arancio-rosso. ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 11.51 (br s, 1 H, OH), 9.78 (br s, 1 H, OH), 9.06 (s, 1 H, Ar, H-7), 8.21 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 7.76 (s, 1 H, H-14), 7.72 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ar), 5.91 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.50 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz, H-17), 5.49 (s, 2 H, H-5), 4.73 (s, 1H, CH_2NMe_2), 4.72 (s, 1H, CH_2NMe_2), 2.83 (s, 3 H, Me), 2.82 (s, 3 H, Me), 1.87 (q, 2 H, $J = 7.6$ Hz, H-19), 0.85 (t, 3 H, $J = 7.6$ Hz, Me). ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 172.7, 172.1, 158.8, 149.6, 148.8, 147.0, 144.2, 133.7, 130.6, 130.6, 129.9, 127.5, 123.2, 109.1, 103.6, 72.8, 68.6, 57.4, 51.1, 43.1, 31.2, 8.3.

MATERIALI E METODI.

Saggio di attivita' antiproliferativa.

L'attivita' antiproliferativa dei composti sintetizzati è stata valutata utilizzando le linee cellulari tumorali umane: carcinoma polmonare a grandi cellule (NCI-H460), carcinoma ovarico IGROV-1, all'adenocarcinoma colonrettale HT29 (ATCC, HTB-38) e sulla variante resistente al mitoxantrone HT29/mit. Le cellule sono mantenute in coltura utilizzando il terreno RPMI-1640 in presenza di siero bovino fetale al 10%. La potenza citotossica delle molecole sintetizzate è stata confrontata con quella di due farmaci già utilizzati in clinica nel trattamento di molti tumori umani, SN38 (metabolita attivo di irinotecan) e topotecan. Le cellule in fase di crescita esponenziale sono state seminate in duplicato in piastre da sei pozzetti. Ventiquattro ore dopo la semina le cellule sono state esposte per 1 ora o 72 ore a concentrazioni differenti di composto. Dopo 72 ore in terreno privo di composto le cellule sono state trattate con tripsina e raccolte. La conta delle cellule sopravvissute al trattamento effettuata con contatore automatico (Coulter counter) ha permesso di calcolare l'IC₅₀, cioè la concentrazione di composto che causa la morte del 50% delle cellule rispetto al controllo non trattato.

Esperimenti di danno al DNA.

Il DNA del virus di scimmia SV40 è stato prima digerito con l'enzima di restrizione BamHI e poi marcato in 3' utilizzando la DNA polimerasi I in presenza di dGTP e di $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP. Il DNA marcato è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione EcoRI. Il frammento di DNA di 751-paia di basi è stato purificato su gel di agarosio ed utilizzato come substrato nei saggi di danno al DNA in provetta. La reazione di danno al DNA è stata effettuata in tampone 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 15 µg/ml BSA, 0.1 mM dithiotritol, in presenza di 20000 cpm totali di DNA marcato e di 640 ng di DNA topoisomerasi pura per 30 minuti a 37 °C. Le reazioni sono state fermate utilizzando SDS 0.5% e proteinasi K 0.3 mg/ml per 45 minuti a 42 °C. La persistenza del danno al DNA è stata valutata dopo 30 minuti di incubazione aggiungendo 0.6 M NaCl per differenti tempi (1, 5 e 10 minuti). I campioni sono stati precipitati, risospesi in tampone denaturante (80% formammide, 10 mM NaOH, 0.01 M EDTA e 1 mg/ml di colorante) e

caricati su gel di poliacrilammide all'8% in tampone TBE. Il livello di danno al DNA è stato valutato con PhosphoImager 425 model.

BIBLIOGRAFIA

- 1 *Cancer facts: A Concise Oncology Text*; Bishop, J. F., Ed.; Harwood Academic Publishers, Singapore, 1999.
- 2 a) Priestman, T. J. *Cancer Chemotherapy: An Introduction*, 3rd ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1989. b) Wall, M. E. In: *Chronicles of Drug Discovery*, Lednicer, D. (Ed.). American Chemical Society: Washington D.C., **1993**; Vol. 3, p 327
- 3 a) Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 3888. b) Pizzolato J. F., Saltz L. B. *The Lancet*, **2003**, 361, 2235-2242.
- 4 Kingsbury, W. D.; Boehm, J. C.; Jakas, D. R.; Holden, K. G.; Hecht, S. M.; Gallagher, G.; Caranfa, M. J.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Johnson, R. K.; Hertzberg, R. P. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 98
- 5 O'Leary, J., Muggia, F.M., *European J. Cancer* **1998**, 34, 10, 1500.
- 6 Hsiang, Y. H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L. F. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14873-14878.
- 7 Pommier Y. *Nature Reviews Cancer*, **2006**, 6, 789-802.
- 8 Zunino F.; Dallavalle S.; Laccabue D.; Beretta G.; Merlini L.; Pratesi G.; *Curr. Pharm. Design*, **2002**, 8, 2505-2520.
- 9 Bailly, C. Critical Rev. in Oncology/Hematology, **2003**, 45, 91-108.
- 10 a) Hsiang, Y. H.; Liu, L. F.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Kirschenbaum, S.; Silber, R.; Potmesil, M. *Cancer Res.* **1989**, 49, 4385. b) Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1989**, 28, 4629. c) Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Wall, M. E. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1774. e) Mi, Z. H.; Burke, T. G. *Biochemistry* **1994**, 33, 10325. d) Gilbert, B. E.; Knight, V. *Sem. Ped. Infect. Dis.* **1996**, 7, 148
- 11 Hsiang, Y. H.; Lihou, M. G.; Liu, L. F. *Cancer Res.* **1989**, 49, 5077.
- 12 Li, T.-K.; Liu, L. F., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, 41, 53-77.
- 13 Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J., Hol, W. G. J., *Science*, **1998**, 279 (6), 1504-1513.
- 14 Burke, T. G.; Mi, Z.; *Anal. Biochem.*, **1993**, 212, 285-287.

-
- 15 Mi, Z.; Burke, T. G.; *Biochemistry*, **1994**, *33*, 10325-10336.
- 16 Wani M. C.; Nicholas, A. W.; Wall, M. E.; *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 2358
- 17 Wall, M. E.; Wani M. C.; Natschke, S., M.; Nicholas, A. W.; *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 1553.
- 18 Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Holden, K. G.; Jakas, D. R.; Gallagher, G.; Mattern, M. R.; Mong, S.-M.; Bartus, J. O.; Johnson, R. K. and Kingsbury, W.D. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 715.
- 19 Sawada, S.; Yokokura, T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1996**, *803*, 13.
- 20 Sawada, S.; Okajima, S.; Aiyama, R.; Nokata, K.-I.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Sugino, E.; Yamaguchi, K.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1446.
- 21 Staker, B.L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin, Jr. A. B.; Stewart, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15387.
- 22 Adams V. R.; Burke T. G., *Camptothecins in Cancer Therapy*, Humana Press.
- 23 Zhou X. X. W.; Hecht S. M. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 4374-4381.
- 24 Libri: a) *The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential*; Liehr, J. G.; Giovanella, B. C.; Verschraegen, C. F. Eds.; *Ann. NY Acad. Sci.*, **2000**, vol. 922. b) *The Camptothecins. From Discovery to Patient*; Pantaziz, P.; Giovannella, B. C.; Eds.; *Ann. NY Acad. Sci.*, **1996**, vol. 803. c) *Camptothecins: New Anticancer Agents*; Potmesil, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1995. Review sulle sintesi: d) Stefan, B.; Ulrich, K. *Organic Synthesis Highlights IV (2000)*, 232-240. Reviews sulla chimica medicinale della CPT: e) Kehrer, D. F. S.; Soepenber, O.; Loos, W. J.; Verweij, J.; Sarreboom, A. *Anti-Cancer Drugs*, **2001**, *12*, 89. f) Lerchen, H-G. *IDrugs*, **1999**, *2*, 896. g) Kawato, Y.; Terasawa, H.; *Prog. Med. Chem.* **1997**, *34*, 69. Reviews sugli studi preclinici e clinici delle CPT: h) De Jong, M. J. A.; Sparreboom, A.; Verweij, *Cancer Treat. Rev.* **1998**, *24*, 205.
- 25 a) Luzzio, M. J.; Besterman, J. M.; Emerson, D. L.; Evans, M. G.; Lackey, K.; Leither, P. L.; McIntyre, G.; Morton, B.; Myers, P. L.; Peel, M.; Sisco, J. M.; Sternbach, D. D.; Tong, W.; Truesdale, A.; Uehling, D. E.; Vuong, A.; Yates, J. J. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 395. b) Mitsui, I.; Kumazawa, E.; Hirota, Y.; Aonuma, M.; Sugimori, M.; Ohsuki, S.; Uoto, K.; Ejima, A.; Terasawa, H.; Sato, K. *Jpn. J. Cancer*

-
- Res.* **1995**, *55*, 776. c) Pantazis, P.; Early, J. A.; Kozielski, A. J.; Mendoza, J. T.; Hinz, H. R.; Giovanella, B. C. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1577.
- 26 Ahn S. K.; Choi N. S.; Jeong B. S.; Kim K. K.; Journ D. J.; Kim J. K.; Lee S. J.; Kim J. W.; Hong C. I.; Jew S.-sup. *J. Heterocyclic Chem.*, **2000**, *37*, 1141-1144.
- 27 Dallavalle S.; Ferrari A.; Biasotti B.; Merlini L.; Penco S.; Gallo G.; Marzi M.; Tinti M. O.; Martinelli R.; Pisano C.; Carminati P.; Carenino N.; Beretta G.; Perego P.; De Cesare M.; Pratesi G.; Zumino F. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3264-3274.
- 28 a) Emerson, D. L.; Besterman, J. M.; Brown, H. R.; Evans, M. G.; Leitner, P. P.; Luzzio, M. J.; Shaffer, J. E.; Sternbach, D. D.; Uehling, D. E.; Vuong, A. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 603. (b) Luzzio, M. J.; Besterman, J. M.; Emerson, D. L.; Evans, M. G.; Lackey, K.; Leitner, P. L.; McIntyere, G.; Morton, B.; Myers, P. L.; Peel, M.; Sisco, J. M.; Sternbach, D. D.; Tong, W.-Q.; Truesdale, A.; Uehling, D. E.; Vuong, A.; Yates, J. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 395.
- 29 a) Mitsui, I.; Kumazawa, E.; Hirota, Y.; Aonuma, M.; Sugimori, M.; Ohsuki, S.; Uoto, K.; Ejima, A.; Terasawa, H.; Sato, K. *Jpn. J. Cancer Res.* **1995**, *86*, 776. (b) van Hattum, A. H.; Pinedo, H. M.; Schluper, H. M. M.; Erkelens, C. A. M.; Tohgo, A.; Boven, E. *Biochem. Pharm.* **2002**, *64*, 1267.
- 30 a) Schoanffski, P.; Herr, A.; Vermorken, J. B.; Van den Brande, J.; Beijnen, J. H.; Rosing, H.; Volk, J.; Ganser, A.; Adank, S.; Botma, H. J.; Wanders, J. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 807. (b) Raymond, E.; Campone, M.; Stupp, R.; Menten, J.; Chollet, P.; Lesimple, T.; Fety-Deporte, R.; Lacombe, D.; Paoletti, X.; Fumoleau, P. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 1348.
- 31 a) Pollack, I. F.; Erff, M.; Bom, D.; Burke, T. G.; Strode, J. T.; Curran, D. P. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4898. (b) Sudzuka, Y.; Hirotsu, S.; Hirota, S. *Jpn. J. Cancer. Res.* **1999**, *90*, 226. (c) van Hattum, A. H.; Schluper, H. M. M.; Hausheer, F. H.; Pinedo, H. M.; Boven, E. *Int. J. Cancer* **2002**, *100*, 22.
- 32 Stork, G.; Schultz, A.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4074.
- 33 a) Volkmann, R.; Danishefsky, S.; Eggler, J.; Solomon, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5576. (b) Winterfeldt E.; Korth, T.; Pike, D.; Boch, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 289. c) Boch, M.; Korth, T.; Pike, D.; Radunz, H.; Winterfeldt, E.

-
- Chem. Ber.* **1972**, *105*, 2126. (d) Wani, M. C.; Campbell, H. F.; Brine, G. A.; Kelper, J. A.; Wall, M. E.; Levine, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3631. (e) Tang, C.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8615. (f) Sugasawa, T.; Toyoda, T.; Saskura, K. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 5109. (g) Meyers, A. I.; Nolen, R. L.; Collington, E. W.; Narwid, T. A.; Strickland, R. C. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1974. (h) Kende, A. S.; Bentley, T. J.; Draper, R. W.; Jenkins, J. K.; Joyeux, M.; Kudo, J. *Tetrahedron Lett.* **1973**, 1307. (i) Shamma, M.; Smithers, D. A.; Georgev, V. S. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 1949. (j) Ihara, M.; Noguchi, K.; Ohsasa, T.; Fukumoto, K. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3150. (k) Earl, R. A.; Vollhardt, K. P. C. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4786. (l) Du, W. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8649
- 34 Corey, E. J.; Crouse, D. N.; Anderson, J. E. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2140.
- 35 a) Ejima, A.; Terasawa, H.; Sugimori, M.; Tagawa, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2639. (b) Ejima, A.; Terasawa, H.; Sugimori, M.; Tagawa, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1990**, 27.
- 36 Tagami, K.; Nakazawa, N.; Sano, S.; Nagao, Y. *Heterocycles* **2000**, *53*, 771.
- 37 a) Bannasar, M.-L.; Juan, C.; Bosch, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2000**, *24*, 2459. (b) Bannasar, M.-L.; Zulaica, E.; Juan, C.; Alonso, C.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7465.
- 38 Curran, D. P.; Ko, S.-B.; Josien, H. *Agnew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 2683.
- 39 a) Josien, H.; Ko, S.-B.; Curran, D. P. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 67. (b) Curran, D. P.; Josien, H.; Bom, D.; Gabarda, A. E.; Du, W. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000**, 922, 112.
- 40 Sawada, S.; Okajima, S.; Aiyama, R.; Nokata, K.-I.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Sugimo, E.; Yamaguchi, K.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1446.
- 41 Kingsbury, W. D.; Boehm, J. C.; Jakas, D. R.; Holden, K. G.; Hecht, S. M.; Gallagher, G.; Caranfa, M. J.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Johnson, R. K.; Hertzberg, R. P. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 98.
- 42 Burke, T. G.; Mishra, A. K.; Wani, M.; Wall, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5352.
- 43 a) Mi, Z.; Burke, T. G.; *Biochemistry* **1994**, *33*, 10325. b) Burke, T. G.; Staubus, A. E.; Mishra, A. K.; Malak, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8318.

-
- 44 Sriram, D.; Yogeewari P.; Thirumurugan, R.; Ratan Bal, T. *Natural Product Research*, **2005**, Vol 19, 4, 393-412
- 45 Lavergne, O.; Lesueur-Ginot, L.; Rodas, F. P.; Bigg, D. C. H. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* **1997**, 7, 2235.
- 46 a) Lavergne, O.; Harnett, J.; Rolland, A.; Lanco, C.; Lesueur-Ginot, L.; Demarquay, D.; Huchet, M.; Coulomb, H.; Bigg, D. C. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2599. b) Bailly, C.; Lansiaux, A.; Dassonneville, L.; Demarquay, D.; Coulomb, H.; Huchet, M.; Lavergne, O.; Bigg, D. C. H. *Biochemistry* **1999**, 38, 15556. c) Lesueur-Ginot, L.; Demarquay, D.; Kiss, R.; Kasprzyk, P. G.; Dassonneville, L.; Bailly, C.; Camara, J.; Lavergne, O.; Bigg, D. C. H. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2939. d) Philippart, P.; Harper, L.; Chaboteaux, C.; Decaestecker, C.; Bronckart, K.; Gordover, L.; Lesueur-Ginot, L.; Malonne, H.; Lavergne, O.; Bigg, D. C. H. Costa, P. M.; Kiss, R. *Clinical Cancer Res.* **2000**, 6, 1557. e) Lavergne, O.; Demarquay, D.; Bailly, C.; Lanco, C.; Rolland, A.; Huchet, M.; Coulomb, H.; Muller, N.; Baroggi, N.; Camara, J.; Breton, C. L.; Manginot, E.; Cazaux, J-B, Bigg, D. C. H. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2285.
- 47 T. M. Allen and P. R. Cullis, *Science*, **2004**, 303, 1818.
- 48 (a) K. Kostarelos, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 106, 147; (b) T. Merdan, J. Kopecek and T. Kissel, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2002**, 54, 715.
- 49 C. J. Thomas, N. J. Rahier, S. M. Hecht, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 1585–1604.
- 50 (a). Yang, L. -X.; Pan, X.; Wang, H. -J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1241-1244.
- 51 X. He; W. Lu; X. Jiang; J. Cai; X. Zhang; J. Ding, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4003-4008.
- 52 J. G. Liehr, N. J. Harris, J. Mendoza, A. E. Ahmed, B. C. Giovanella *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000**, 922, 216-223
- 53 T. Satoh; M. Hosokawa, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1998**, 38, 257-288.
- 54 Adamovics, J. A.; Hutchinson, C. R. *J. Med. Chem.* **1979**, 3, 310-314.
- 55 Sawada, S.; Yaegashi, T.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 310-313.

-
- 56 Greenwald, R. B., Zhao, H., Xia, J. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 2635–2639.
- 57 Beretta, G. L.; Petrangolini, G.; De Cesare, M.; Pratesi, G.; Perego, P.; Tinelli, S.; Tortoreto, M.; Zucchetti, M.; Frapolli, R.; Bello, E.; Manzotti, C.; Fontana, G.; Bombardelli, E.; Battaglia, A.; Samori, C.; Zunino, F. *Cancer Res* **2006**; *66*, 10976–10982.
- 58 a) Cohen, S. S. *A Guide to the Polyamines* **1998**, Oxford University Press, Oxford. b) Igarashi, K., Kashiwagi, K. *Biochem. Biophys. Res.* **2000**, *271*, 559–564. c) Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A., Igarashi, K. *J. Biol. Chem* **2004**, *279*, 46008–46013.
- 59 Cullis, P. M., Green, R. E., Merson-Davies, L., Travis, N. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 717–729 e riferimenti interni.
- 60 Bloomfield, V. A. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269–282.
- 61 a) Vassilyev, D. G., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Morikawa K, Igarashi, K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17604–17609. b) Phanstiel, O. IV, Price, H. L., Wang, L., Juusola, J., Kline, M., Shah, S. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5590–5599. c) Wang, C., Delcros, J.-G., Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A., Phanstiel, O. IV. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5129–5138. d) Gardner, R. A., Delcros, J.-G., Konate, F., Breitbeil III, Martin, B., Sigman, M., Huang, M., Phanstiel, O. IV *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6055–6069. e) Phanstiel, O. IV, Kaur, N., Delcros J.-G. *Amino Acids* **2007**, *33*, 305–313.
- 62 a) Holley, J., Mather, A., Cullis, P., Symons, M. R., Wardman, P., Watt, R. A., Cohen, G. M., *Biochem Pharmacol.* **1992**, *43*, 763–769. b) Siddiqui, A. Q., Merson-Davies, L., Cullis P. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3243–3252.
- 63 Bombardelli, E., Verotta, L. (2000) *US Patent* 6,121,277.
- 64 Marchesini, R., Colombo, A., Caserini, C. *Int. J. Cancer* **1996**, *66*, 342–346
- 65 (a) Ihara, M.; Noguchi, K.; Ohsawa, T.; Fukumoto, K.; Kametani, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3150. (b) Kurihara, T.; Tanno, H.; Takemura, S.; Harusawa, S.; Yoneda, R. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 643.
- 66 Sawada, S.; Nokata, K.-I.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2574.

-
- 67 Subrahmanyam, D.; Sarma, V. M.; Venkateswarlu, A.; Sastry, T. V. R. S.; Kulakarni, A. P.; Srinivas, R. D.; Krishna Reddy, K. V. S. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *7*, 2013-2020.
- 68 Wang, H. -K.; Liu, S. -Y.; Hwang, K. -M.; McPhail, A. T.; Lee, H.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *5*, 77-82
- 69 Sugimori, M.; Ejima, A.; Ohsuki, S.; Matsumoto, K.; Kawato, Y.; Yasuoka, M.; Tagawa, H.; Terasawa, H. *Heterocycles* **1994**, *38*, 81-94.
- 70 Subrahmanyam, D.; Sarma, V. M.; Venkateswarlu, A.; Sastry, T. V. R. S.; Akella, S. S. V.; Srinivas, A. S. S. V.; Krishna, C. V.; Deevi, D. S.; Kumar, S. A.; Babu M. J.; Damodaran, N. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 369-371
- 71 Chatterjee, A.; Digumarti, R.; Katneni, K.; Upreti, V. V.; Mamidi R. N.; Mullangi, R.; Surath, A.; Srinivas, M. L.; Uppalapati, S.; Jiwatani, S.; Srinivas, N. R. *J Clin. Pharmacol.* **2005**, *45*, 453-460.
- 72 Torregrossa, J.; Bublely, G. J.; Jones, G. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6082-6085, per studi sull'ipossia HIF-1a vedi: (a) Zhong, H.; Semenza, G. L.; Simons, J. W.; DeMarzo, A. M. *Cancer Detect. Prev.* **2004**, *28*, 88-93. (b). Rapisarda, A.; Uranchimeg, B.; Sordet, O.; Pommier, Y.; Shoemaker, R. H.; Melillo, G. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1475.
- 73 Hinz, H. R.; Harris, N. J.; Giovanella, B. C.; Ezell, E. L.; Liehr, J. G. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1996**, *38*, 733-742
- 74 Miyasaka, T.; Mutai, M.; Sawada, S.; Nokata, K.; Higiwara, H. *U. S. Patent N.* 4,399,282, **1983**.
- 75 Subrahmanyam, D.; Venkateswarlu, A.; Venkateswara, K. R.; Sastry, T. V. R. S.; Vandana, G.; Kumar, S. A.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1633-1638.
- 76 Miyasaka, S.; Mutai, M.; Sawada, S.; Kimura, K. *Japan Patent N.* JP58154584 data di pubblicazione **1983**
- 77 Chatterjee, A.; Digumarti, R.; Katneni, K.; Upreti, V.V.; Mamidi, R. N. V. S.; Mullangi, R.; Surath, A.; Srinivas, M. L.; Uppalapati, S.; Jiwatani S.; and Nuggehally R. Srinivas N. R. *J. Clin. Pharmacol.* **2005**; *45*; 453-460.

-
- 78 Das, B.; Madhusuda, P. ; Satya, V. N., Kalavagunta, s. *U. S. Patent* N. 6,872,829 B2, **2005**.
- 79 Davis, F. A.; Chattopardhay, S.; Towson, J. C.; Lal, S.; Reddy, T. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2087-2089.
- 80 Organofluoro in campo medico e biomedico vedi: a) *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*, Ojima, I.; McCarthy, J. R.; Welch, J. T. Eds. ACS Symposium Series 639; American Chemical Society, Washington, DC, **1996**. b) *Organic Chemistry in Medicinal Chemistry and Biomedical Application*, Filler, R. Ed Elsevier, Amsterdam, **1993**. c) Welch, J. R.; Eswarakrishnan, S. *Fluorine in Bioorganic Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, **1991**. d) Filler, R.; Kirk, K.; *Biological Properties of Fluorinated Compounds*. In *Chemistry of Organic Fluorine Compounds II: A Critical Review*. Hudlicky, M.; Pavlath, A. E.; Eds. ACS Monograph 187; American Chemical Society, Washington, DC, **1995**. e) Elliot, A. J. *Fluorinated Pharmaceuticals*. In *Chemistry of Organic Fluorine Compounds II*; Hudlicky, M.; Pavlath, A. E.; Eds. ACS Monograph 187; American Chemical Society, Washington, DC, **1995**.
- 81 Tangirala R. S., Dixon R., Yang D., Ambrus A., Antony S., Agama K., Pommier Y., Curran D. P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4736–4740.
- 82 Peters, R.; Althaus, M.; Diolez, C.; Rolland, A.; Manginot, E.; Veyrat, M. *J. Org. Chem.* **2006**; *71*; 7583-7595
- 83 a) Kühlein, K.; Jensen, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 369–402. b) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A.; Dorow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4011–4030.
- 84 S. Sawada, S. Matsuoka, K. Nokata, H. Nagata, T. Furuta, T. Yokokura, T. Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 3183-3188.
- 85 M.A. Elban, W. Sun, B.M. Eisenhauer, R. Gao, R.; S.M. Hecht, *Org. Lett.* **2006**, *16*, 3513-3516.
- 86 A.W. Nicholas, M.C. Wani, G. Manikumar, M.E. Wall, K.T. Kohn, Y. Pommier, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 972-978.
- 87 Cao Z., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.*, **1996**, 2629-2632.

-
- 88 Esempi selezionati, vedi: (a) Hermit, M.B.; Greenwood, J.R.; Nielsen, B.; Bunch, L.; Jørgensen, C.G.; Vestergaard, H.T.; Stensbøl, T.B.; Sanchez, C.; Krogsgaard-Larsen, P.; Madsen, U.; Bräuner-Osborne, H. *Eur. J. Pharm.* **2004**, *486*, 241–250. (b) Muccioli, G.G.; Martin, D.; Scriba, G.K.E.; Poppitz W.; Poupaert, J.H.; Wouters, J.; Lamber, D.M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2509-2517. (c) Chong, Y.; Choo, H.; Choi, Y.; Mathew, J.; Schinazi, R.F.; Chu, C.K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4888-4898 and references therein. (d) Wouters, J.; Michaux, C.; Durant, F.; Dogne, J.M.; Delarge, J.; Masereel, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 923–929. (e) Hlaváček, J.; Marcová, R.; Jezek, R.; Slaninová, J. *Amino Acids* **1996**, *11*, 367-377. (f) Fujita, T. *Biosci. Biotech. Bioch.* **1996**, *60*, 557-566. (g). Mésangeau, C.; Narayanan, S.; Green, A.M.; Shaikh, J.; Kaushal, N.; Viard, E.; Xu, Y. -T.; Fishback, J. A.; Poupaert, J. H.; Matsumoto, R. R.; McCurdy, C. R. *J. Med. Chem.* Web, release date: 16-Feb-2008, DOI: 10.1021/jm701357m.
- 89 Rahier, N.J.; Eisenhauer, B.M; Gao, R.; Thomas, C.J.; Hecht, S.M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1381–1386.
- 90 Dati cristallografici per la Tiocamptotecina C₂₀H₁₆N₂O₃S: monoclinic, *P*2₁, *a* = 7.954(5), *b* = 6.978(4), *c* = 30.232(18) Å, *V* = 1673.1(17) Å³, *Z* = 4, ρ = 1,447 g cm⁻³, graphite-monochromatized MoK α radiation (λ = 0.71073), *R*₁ = 0.0513, *wR*₂ = 0.0989 (for *I*_o > 2 σ (*I*_o)). Data were collected at room temperature and corrected for Lorentz-polarization and absorption (empirical, SADABS [ref. G. M. Sheldrick, SADABS, 1996, Universität Göttingen, Germany.]). The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares procedures (SHELX97 [ref. G. M. Sheldrick, SHELX97, 1997, Universität Göttingen, Germany]). CCDC XXX contains the supplementary crystallographic data for this paper, which can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.uk/data_request/cif.
- 91 Sanna, N.; Chillemi, G.; Grandi, A.; Castelli, S.; Desideri, A.; Barone, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15429-15436.

-
- 92 Perego, P.; De Cesare, M.; De Isabella, P.; Carenini, N.; Beggiolin, G.; Pezzoni, G.; Palumbo, M.; Tartaglia, L.; Pratesi, G.; Pisano, C.; Carminati, P.; Scheffer, G.L.; Zunino, F. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6034-6037.
- 93 Dallavalle S.; Ferrari A.; Biasotti B.; Merlini L.; Penco S.; Gallo G.; Marzi M.; Tinti M. O.; Martinelli R.; Pisano C.; Carminati P.; Carenino N.; Beretta G.; Perego P.; De Cesare M.; Pratesi G.; Zunino F. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3264-3274.
- 94 Fortunak J. M. D., Kitteringham J., Mastrocola A., Mellinger M., Sisti N. J., Wood J. L., Zhuang Z-P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 5683-5686.