
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XXIII CICLO

Dott.^{ssa} CHIARA ZAGNI

PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI INIBITORI
DELLE
ISTONE DEACETILASI

Coordinatore:

Tutor:

Chiar.^{mo} Prof. G. RONSISVALLE

Chiar.^{mo} Prof. U. CHIACCHIO

Chiar.^{mo} Prof. A. RESCIFINA

TRIENNIO 2007-2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. CANCRO	5
2.1 Morte per arresto del ciclo cellulare.....	5
2.2 Morte per apoptosi.....	9
2.3 Caratteristiche di una cellula tumorale.....	12
3. ISTONE DEACETILASI: CLASSIFICAZIONE E LOCALIZZA- ZIONE	15
3.1 Localizzazione delle HDAC.....	15
3.2 Classi di HDAC	16
4. EFFETTI DELL'ATTIVAZIONE DELLE HDAC.....	21
5. HDAC E MALATTIE NEURODEGENERATIVE E CARDIO- VASCOLARI.....	27
6. HDAC NELLE INFEZIONI VIRALI.....	32
7. HDAC ED INIBITORI DELLE ISTONE DEACETILASI(HDI)	36
7.1 HDI: classi chimiche	40
7.2 Sito attivo delle HDAC.....	50
8. DEACETILAZIONE DELLE HDAC.....	54
9. SCOPO DEL LAVORO	57
10. MOLECULAR DOCKING.....	62
11. RISULTATI E DISCUSSIONE	65
12. STUDI SPETTROSCOPICI	104
12.1 Spettroscopia UV-vis.....	104
12.2 Spettroscopia NMR.....	106

13. CONCLUSIONI.....	108
14. PARTE SPERIMENTALE	109
15. BIBLIOGRAFIA.....	121

1. INTRODUZIONE

La trascrizione nelle cellule eucariotiche è influenzata dal grado d'impacchettamento del DNA.¹ Normalmente, nelle cellule, il DNA è strettamente compattato per prevenire l'accessibilità ai fattori di trascrizione; esso è impacchettato nella cromatina, un complesso proteina-DNA fortemente organizzato e dinamico. L'unità di base della cromatina è il nucleosoma, costituito da un ottamero di istoni, due molecole per ciascuno dei quattro diversi istoni (H2A, H2B, H3 e H4), attorno al quale sono avvolte 146 coppie di basi, più un quinto istone, H1, che funge da linker, favorendo la condensazione dei nucleosomi in fibre e fornendo, quindi, alla cromatina un alto grado di condensazione.² Il livello di organizzazione della cromatina (eucromatina ed eterocromatina) gioca un ruolo importante nel regolare l'accessibilità al DNA da parte dei complessi proteici della trascrizione. Infatti, un'organizzazione compatta della cromatina è indice di bassa attività trascrizionale, mentre una struttura più rilassata è indice di maggiore accessibilità al DNA e ciò comporta l'attivazione della trascrizione. Il rimodellamento della cromatina può essere determinato dall'attività di complessi proteici o da modificazioni covalenti delle code istoniche, ricche in residui di lisina, che protrudono dai nucleosomi. Le modificazioni chimiche post-traduzionali più importanti subite dagli istoni comprendono l'acetilazione/deacetilazione, la metilazione, la fosforilazione, l'ubiquitinazione e l'ADP-ribosilazione.

Nel nucleo vi è una continua attività di acetilazione e deacetilazione delle code istoniche, operata da due tipi di enzimi aventi funzione antagonista: le istone acetiltransferasi (HAT) e le istone deacetilasi (HDAC). Poiché le code istoniche acetilate allentano il loro legame con il DNA, di norma, l'acetilazione è associata ad un'intensa attività trascrizionale e le acetilasi fanno parte di complessi proteici che agiscono come attivatori della trascrizione. Al contrario, una volta deacetilati, gli istoni si associano in modo più stretto al DNA; infatti, nucleosomi contenenti istoni ipoacetilati carichi si legano debolmente al fosfato del DNA inibendo la trascrizione, presumibilmente perché fattori di trascrizione, complessi regolatori ed RNA polimerasi non possono avere accesso al DNA. Pertanto la deacetilazione è correlata ad una bassa attività trascrizionale e le deacetilasi fanno parte di complessi con funzione di repressione sulla trascrizione. L'opposta attività delle istone acetiltransferasi (HAT) e delle istone deacetilasi (HDAC), dunque, regola l'espressione genica attraverso modificazioni della cromatina: le HDAC catalizzano la rimozione del gruppo acetile, portando alla condensazione della cromatina e quindi ad una repressione della trascrizione.³

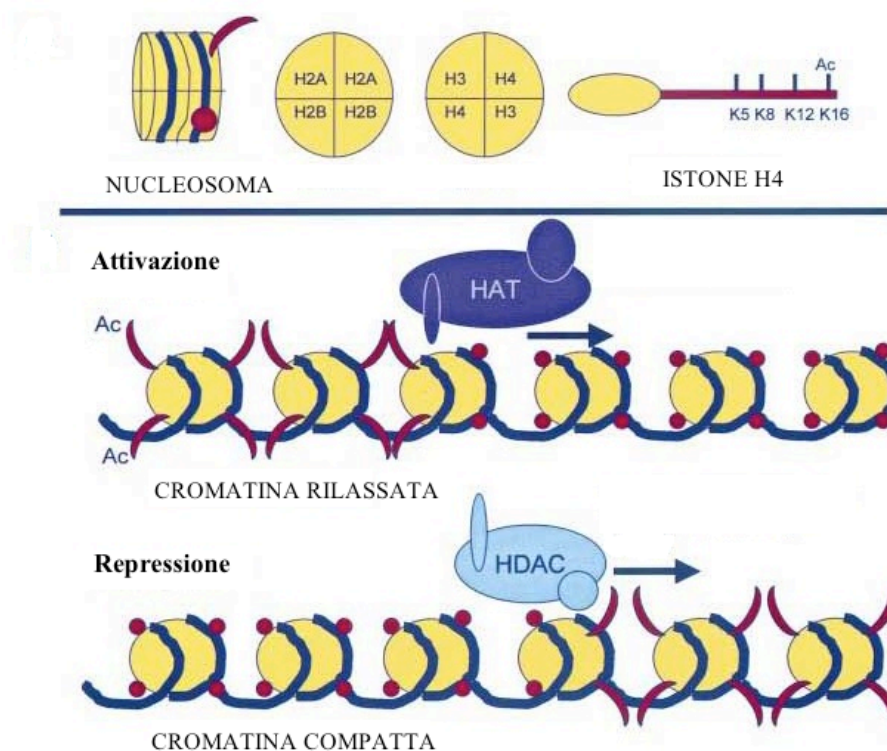


Figura 1

Pertanto, l'inibizione di enzimi che catalizzano la rimozione del gruppo acetilico determina un'iperacetilazione istonica che comporta l'attivazione della trascrizione, in particolare di geni che codificano per proteine responsabili della morte cellulare, mostrando una certa selettività nei confronti delle cellule tumorali.

È noto, infatti, che le HDAC, associate ad una serie di oncogeni cellulari ben caratterizzati e geni tumor-soppressori, ad esempio il Mad e la proteina retinoblastoma (RB), portano ad un'aberrante attività di reclutamento delle HDAC stesse, che a sua volta provocano cambiamenti nell'espressione genica.⁴ Ad esempio, nel caso della leucemia promielocitica acuta, l'oncoproteina prodotta dalla fusione del gene PML e del gene del recettore α per l'acido retinoico sembra esprimere un gene che, attivando l'HDAC, è

in grado di reprimere la trascrizione di geni specifici per la differenziazione; ciò porta ad un'eccessiva proliferazione.⁵ Nei capitoli seguenti vedremo come le HDAC siano coinvolte in varie patologie, tumorali e non, e come gli inibitori di tali enzimi possano rappresentare delle potenziali molecole anticancro, oltre che agire in molte patologie.

2. CANCRO

Il cancro è considerato tradizionalmente una patologia di origine genetica, dovuta ad una mutazione genica, una delezione o ad una anormalità cromosomica che risulta in una perdita di funzionalità dei geni oncosoppressori o in una iperattivazione di geni oncogeni.⁶ È comunque ormai evidente come l'espressione genica, governata da cambiamenti epigenetici, risulti cruciale per l'inizio e la progressione del cancro.⁷

2.1 MORTE PER ARRESTO DEL CICLO CELLULARE

Nella cellula tumorale la moltiplicazione cellulare è autonoma ed afinalistica. Essa ha inizio con il ciclo cellulare, durante il quale la cellula, nella prima fase, sintetizza i componenti necessari per la duplicazione del DNA, attivandosi così per la divisione. All'interno del ciclo cellulare vi sono due punti di controllo (checkpoints), affinché non si verifichino errori: il primo è tra la fase G1 ed S e l'altro tra la fase G2 ed M (Figura 2).

La maggior parte dei farmaci anticancro agiscono nella fase S e solo alcuni esplicano la loro attività nella fase M. Il procedere attraverso le varie fasi del ciclo dipende da fattori di regolazione *positivi* e *negativi*, detti anche *oncogeni* ed *oncosoppressori*.⁸

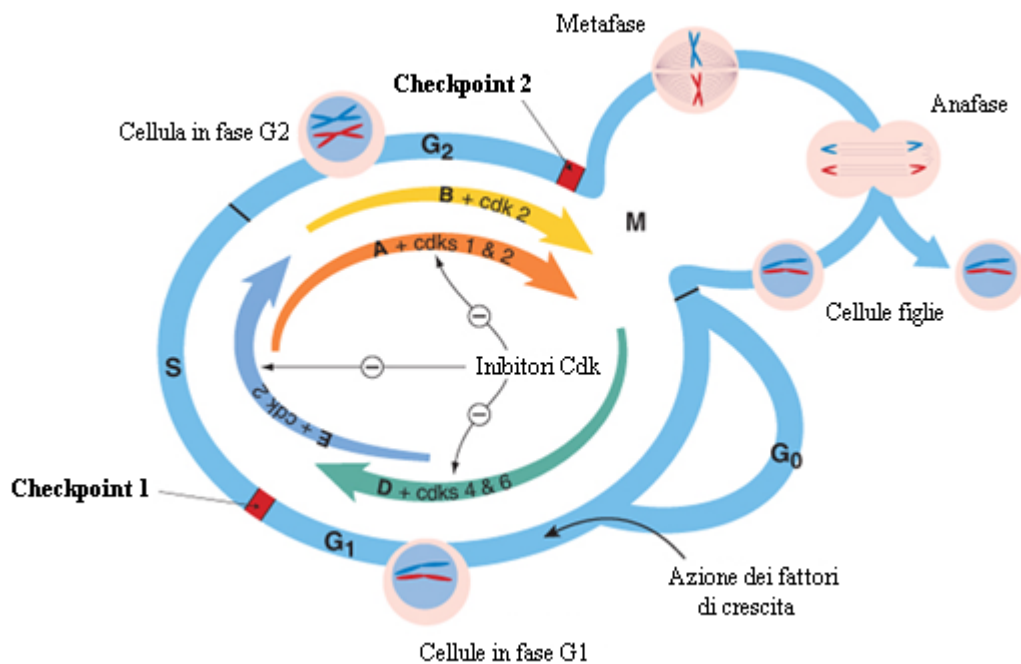


Figura 2

I fattori di regolazione positivi sono *fattori di crescita, citochine, ormoni* e *neurotrasmettitori* che, attraverso una cascata chinasi (Figura 3), attivano la proteina RAS, una proteina ad attività GTPasica che appartiene alla famiglia delle proteine G. Essa lega il GDP attivando, così, una cascata proteica che coinvolge altre proteine tra le quali, è degna di nota, la proteina MAPK. Quest'ultima, a sua volta, attiva i fattori di trascrizione c-fos, c-jun, c-myc ed NF-KB⁹ che stimolano le cicline a legarsi alle chinasi ciclin dipendenti (Cdk) attivando, così, gli enzimi del ciclo cellulare. Com'è possibile osservare dalla figura 2, le *cicline D* stimolano il processo che porta alla fase G₁, le *cicline E* promuovono la proliferazione verso la fase S, le *cicline A* verso la fase G₂ e la *ciclina B* verso le fasi G₂ ed M.

La ciclina D ha l'ulteriore ruolo di attivare le *Cdk 4/6* le quali fosforilano le proteine del retinoblastoma (pRb) causando la dissociazione di pRb dal

fattore di trascrizione E2F. Quest'ultimo, una volta libero dal complesso, trasattiva i geni che codificano per prodotti essenziali per la sintesi del DNA e delle proteine regolatorie.¹⁰

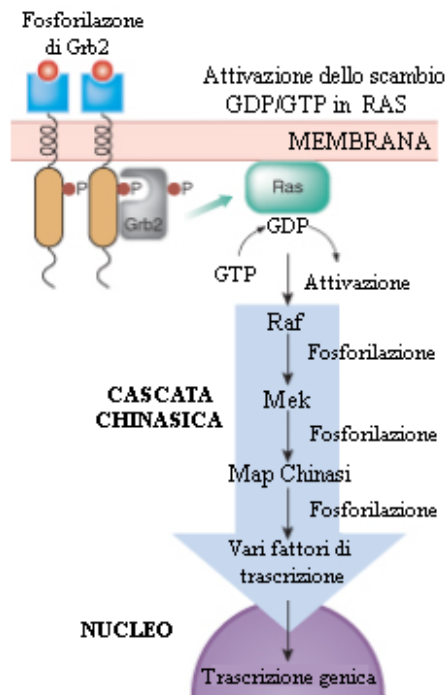


Figura 3

I fattori di regolazione negativi contrastano la progressione del ciclo cellulare e sono dunque detti *antimitotici*. Tra questi ricordiamo (Figura 3):

- a. **pRb**, inibitore della funzione di E2F;
- b. **p16, p21, p27**, inibitori dei complessi proteici ciclina/CdK; la loro espressione è indotta dal TGF- β ;
- c. **p19**, che si lega a mdm2 con conseguente liberazione e attivazione di p53;
- d. **IKB**, inibitori delle chinasi (p16, p19, p15); si legano all' NF-KB inibendone l'azione promitotica;

e. il gene **p53**, definito come “guardiano del genoma”. Codifica per un fattore di trascrizione proteico, la proteina p53. La concentrazione cellulare di tale proteina è normalmente bassa ma, in presenza di un danno al DNA, attiva la trascrizione di numerosi geni tra i quali il **p21**. La proteina p21 inattiva i complessi ciclina/cdk e frena il ciclo cellulare al checkpoint 1.¹¹ La proteina p53 può, inoltre, indurre arresto della crescita cellulare controllando il ciclo cellulare nella fase G1/S (infatti, se la cellula permane in questa fase per molto tempo, le proteine di riparazione del DNA avranno il tempo di riparare il danno e la cellula potrà poi continuare il suo normale ciclo). Essa può, infine, dar luogo ad apoptosi, se il danno al DNA risulta irreparabile.

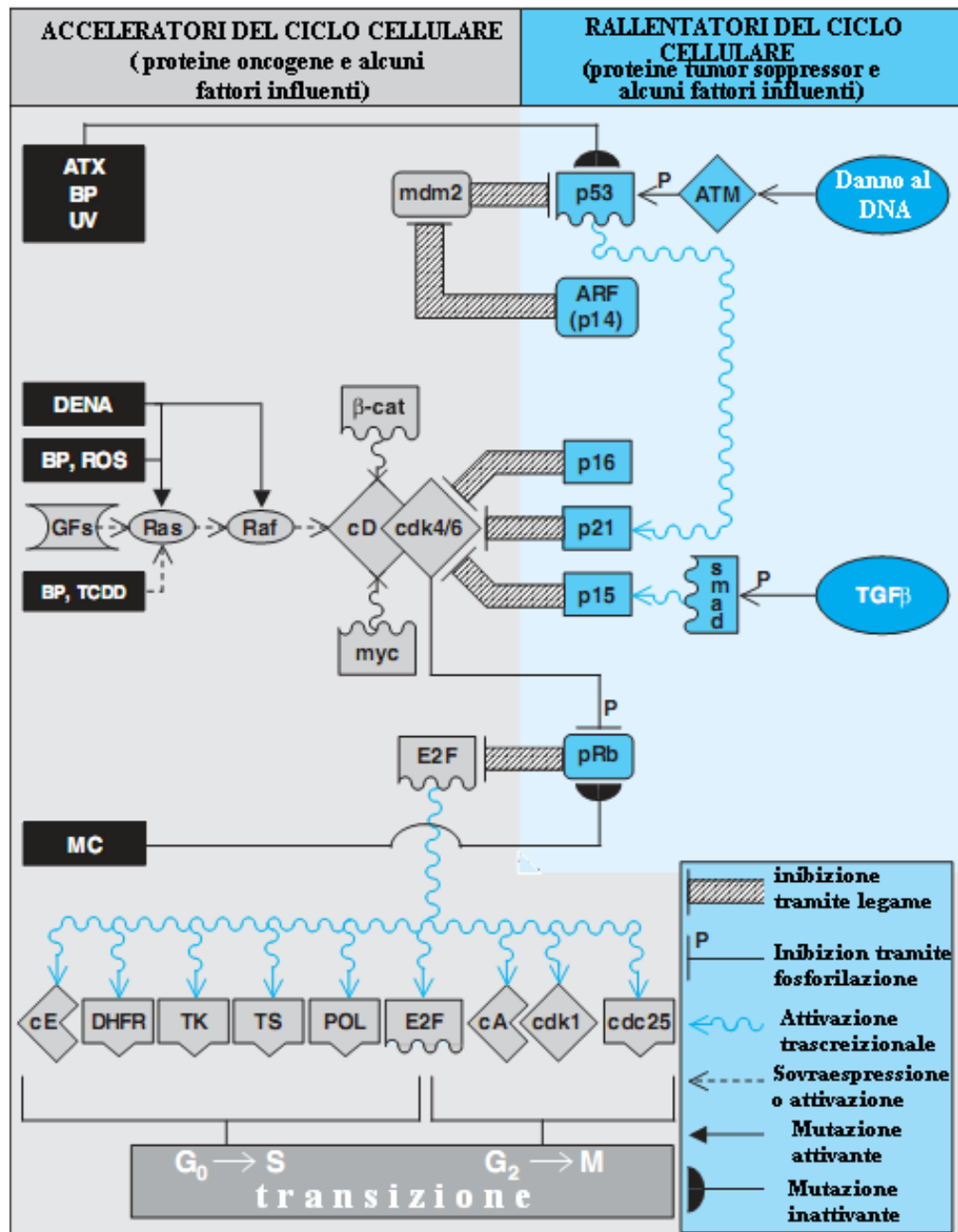


Figura 4

2.2 MORTE PER APOPTOSI

Un altro rilevante freno all'eccessiva crescita del numero di cellule ed un importante meccanismo di eliminazione delle cellule anomale è l'apoptosi. Sono stati identificati due processi apoptotici diversi dal punto di vista fun-

zionale: il processo estrinseco ed il processo intrinseco mitocondriale.

Il *processo estrinseco* è avviato dal legame di specifici ligandi ai recettori della morte, CD95/Fas, TNRF ed il recettore del TRAIL (TRAILR). Tale legame determina modificazioni del recettore, nel lato interno della membrana, consentendo il reclutamento di proteine adattatrici, quali la proteina Fas, associata al dominio di morte (FADD), che attivano il recettore TNFR, associato al dominio di morte, con conseguente formazione del complesso di induzione del segnale di morte (DISC) che comprende anche le caspasi 8 e 9. Queste ultime determinano la scissione proteolitica delle procaspasi generando, così, le caspasi responsabili dell'apoptosi (caspasi esecutrici 3, 6 e 7).

Il *processo intrinseco*, generalmente, è attivato da stress, farmaci, oncoproteine, ipossia, radiazioni ionizzanti e prelievo di fattori di crescita. Questi stimoli distruggono la membrana mitocondriale ed inducono il rilascio di proteine mitocondriali (Figura 5). L'integrità della membrana mitocondriale è regolata da *fattori antiapoptotici*, come la famiglia delle BCL2 (BCL2, BCLX, MCL1), e da *fattori proapoptotici* (Bad e Bax), insieme a domini proapoptotici BH3-only (Bid, Bad, Bik, Bim, Noxa, Puma, Hrk e Bfm). In particolare, il citocromo c (*Cyt c*), una volta attivato da Bax e Bid, interagisce con l'APAF-1 (fattore apoptotico attivatore delle proteasi) formando un complesso che si lega, successivamente, alla procaspasi 9; l'intero complesso prende il nome di apoptosoma. Questi processi comportano l'attivazione delle caspasi 3, 6 e 7, che determinano la scissione di numerosi substrati

nucleari e citoplasmatici che inducono i caratteristici cambiamenti morfologici dell'apoptosi. I recettori della morte possono anche essere attivati dal processo intrinseco attraverso la scissione mediata dalla caspasi 8 e dall'attivazione del Bid. Il danno al DNA, in particolare la rottura della doppia elica, attiva la proteina p53 la quale aumenta l'espressione di Bax (attivatore del citocromo c) e della proteina recettoriale di membrana Fas.¹²

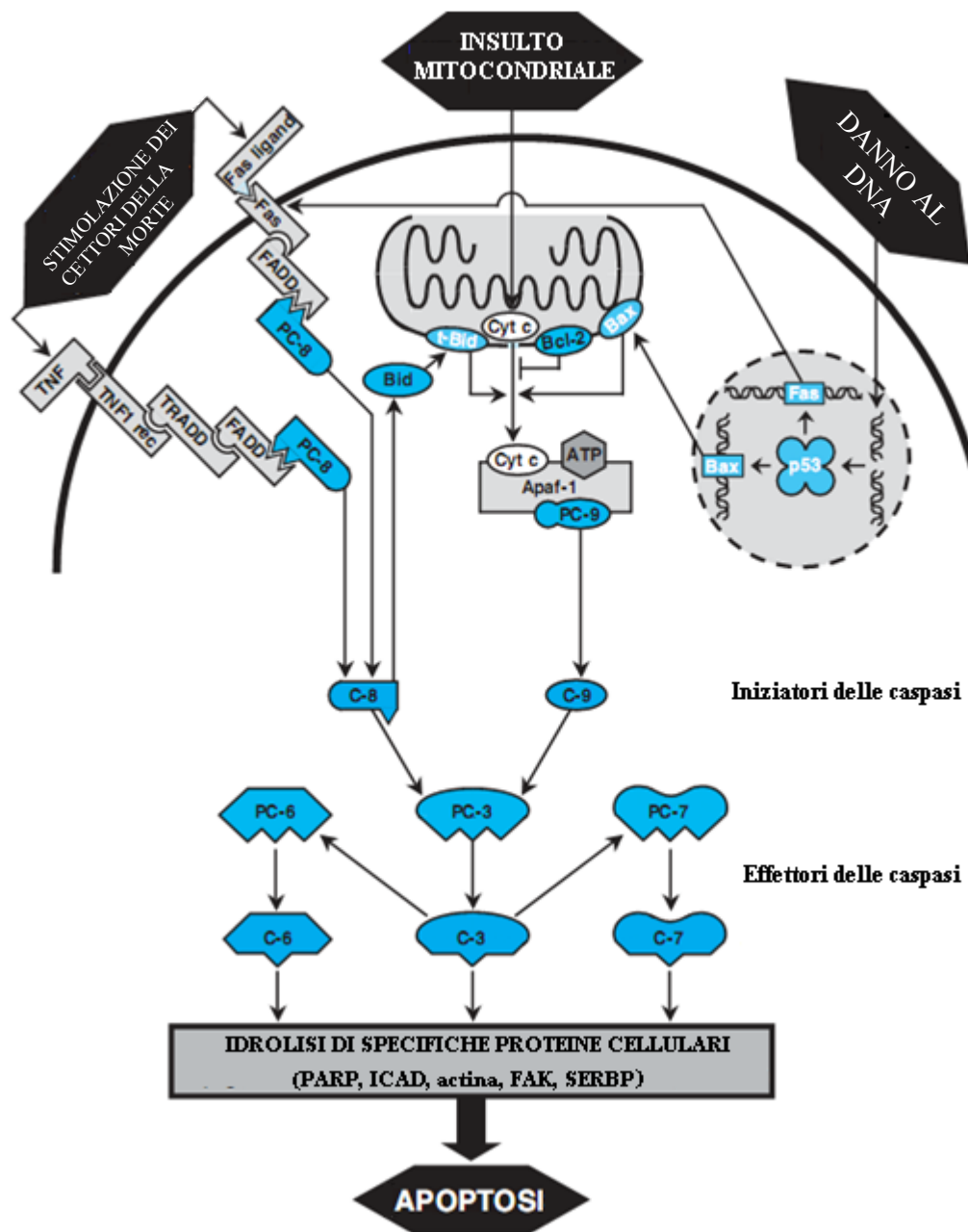


Figura 5

2.3 CARATTERISTICHE TIPICHE DI UNA CELLULA TUMORALE¹³

Le caratteristiche peculiari di una cellula tumorale sono:

- ✓ Proliferazione incontrollata
- ✓ Perdita di funzioni cellulari
- ✓ Invasività
- ✓ Capacità di metastatizzare

Proliferazione incontrollata

Le cellule tumorali sono cellule sfuggite ai meccanismi che normalmente regolano la divisione cellulare e la crescita tissutale. Il controllo del ciclo cellulare viene danneggiato da anomalie dei fattori di crescita, dalle cicline/cdk, dalla sintesi anomala del DNA (come risultato di attività oncogenica), dalla diminuita funzionalità delle forze regolatorie negative e da mutazioni a carico dei geni antiapoptotici.

Inoltre, un fattore importante per il mantenimento dell'integrità cromosomica è il telomero: una struttura presente nella terminazione del cromosoma che ha il compito di proteggerlo dalla degradazione, dal riarrangiamento o dalla fusione con altri cromosomi. Durante il ciclo di divisione cellulare si verifica l'erosione di una porzione di telomero che, di conseguenza, perde la sua funzionalità. Cellule che si dividono rapidamente (ad esempio le cellule del midollo osseo) esprimono degli enzimi, le telomerasi, che stabilizzano i telomeri. Si è visto che nelle cellule differenziate tali enzimi sono completamente assenti, a differenza del 95% dei tumori maligni all'ultimo stadio dove l'enzima è espresso. Tale espressione può conferire immortalità alle cellule tumorali.

Affinché un tumore possa proliferare è indispensabile una forte vascolarizzazione. Infatti, i tumori di 1–2 mm di diametro possono ricevere il nutrimento per diffusione ma qualsiasi altra espansione richiede lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni o la loro formazione, processo chiamato angiogenesi. Perché questo si possa verificare è necessaria l'espressione di fattori di crescita vascolari che solitamente vengono prodotti dai tumori durante la loro crescita. Nel processo di angiogenesi, gli enzimi (come le metalloproteasi) distruggono le aree circostanti creando degli spazi per lo sviluppo dei nuovi vasi sanguiferi.

Differenziazione e perdita di funzione

Normalmente le cellule di un particolare tessuto vanno incontro a divisione, crescita e differenziazione cellulare. La peculiarità delle cellule tumorali è la mancanza dello stato di differenziazione. In genere, minore è lo stato di differenziazione cellulare, maggiore è la loro proliferazione e di conseguenza il loro grado di malignità.

Invasività

Durante il differenziamento tra le cellule di un certo tessuto si sviluppano delle reciproche “relazioni spaziali”. Se una delle cellule dovesse accidentalmente scappare dal tessuto si perderebbe tale relazione e la cellula andrebbe incontro ad apoptosi. Le cellule tumorali, oltre ad aver smarrito questo controllo, per via di una mutazione, secernono degli enzimi, le metallo-

proteasi, che degradano la matrice extracellulare permettendo loro di spostarsi.

Metastasi

Le metastasi sono tumori secondari, provenienti dalla massa tumorale originaria, che hanno raggiunto altre sedi attraverso vasi sanguiferi o linfatici.

3. ISTONE DEACETILASI: CLASSIFICAZIONE E LOCALIZZAZIONE¹⁴

Ad oggi si conoscono 18 tipi di istone deacetilasi che differiscono tra loro per struttura e per funzione. Sono state raggruppate in due famiglie (HDAC classici e sirtuin) e quattro classi:¹⁵

- Classe I: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
- Classe II: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10
- Classe III: Sir2
- Classe IV: HDAC11

Tutte, eccetto la classe II, presentano un dominio catalitico zinco dipendente, con un alto grado di omologia, ed una tasca idrofobica che permette l'inserimento della lisina. Le Sir2, invece, sono NAD dipendenti, e differiscono dalle altre per il sito catalitico. Le classi I e II sono quelle overesprese associate a fattori di trascrizione oncogeni, mutati nel cancro, e rappresentano potenziali target per piccole molecole inibitrici. Recentemente è stato osservato che elevati livelli di HDAC sono coinvolti nella carcinogenesi.

3.1 LOCALIZZAZIONE DELLE HDAC

Affinché le HDAC possano esercitare la loro funzione, è necessario che siano nel nucleo, dove è presente il loro substrato predominante, gli istoni.

La localizzazione nucleare delle HDAC avviene tramite un segnale di localizzazione nucleare (NLS) o tramite la co-localizzazione con altre proteine HDAC. La maggior parte di esse contengono un segnale di localizzazione nucleare, che impone la loro presenza nel nucleo, anche se alcune possono essere presenti anche nel citosol. Infatti, mentre le HDAC1 e 2 sono presenti esclusivamente nel nucleo, a causa della mancanza di un segnale di esportazione nucleare (NES),¹⁶ l'HDAC3 presenta sia un segnale di importazione nucleare sia un segnale di esportazione nucleare e ciò suggerisce che essa si possa localizzare anche nel citoplasma. In realtà l'HDAC3 è sempre localizzata nel nucleo e si pensa che venga reclutata dal complesso che le HDAC4, 5 e 7 formano con il DNA attraverso i co-repressori.¹⁷ HDAC8 è localizzata nel nucleo ed è anche overespressa in quanto presente in basse concentrazioni.¹⁸

Le HDAC di classe II sono in grado spostarsi da e verso il nucleo in risposta a determinati segnali cellulari. A differenza delle altre HDAC, la localizzazione predominante dell'HDAC6 è nel citoplasma,¹⁹ mentre l'HDAC11 risiede nel nucleo; le HDAC10 e le HDAC9 possono essere localizzate sia nel nucleo sia nel citoplasma.²⁰

3.2 CLASSI DI HDAC

Classe I.

I membri della famiglia HDAC1, 2 e 3 sono subunità di complessi nucleari multiproteici, cruciali per la repressione trascrizionale e per il con-

trollo epigenetico. Inoltre le HDAC1 e 2 sono le componenti del complesso che inattiva l'espressione dei geni neuronali in tessuti non neuronali.²¹

Nelle cellule tumorali, diversi studi hanno mostrato un'importante funzione delle HDAC1 nel controllo della proliferazione cellulare. Infatti, la soppressione delle HDAC1 e HDAC3 provoca l'inibizione della proliferazione cellulare di cellule HeLa, a differenza delle HDAC4 e 7.²² La riduzione dell'espressione delle HDAC1 causa, inoltre, arresto del ciclo cellulare nella fase G1 o nella fase di transizione G2/M, provocando la perdita di cellule mitotiche, l'inibizione della crescita cellulare, ed un aumento della percentuale di cellule apoptotiche nell'osteosarcoma e delle cellule del carcinoma mammario. Al contrario, l'HDAC2 non ha mostrato tali effetti in queste cellule.²³ Oltre al controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi, l'HDAC1 potrebbe anche essere coinvolta nella resistenza ai farmaci. L'HDAC2 ha mostrato effetti anche in altre cellule. Si è visto, infatti, che la soppressione dell'espressione dell'HDAC2, nel cancro cervicale, causa un aumento dell'apoptosi associata ad un'aumentata espressione di p21Cip1/WAF1 in modo p53 indipendente.²⁴ Nelle cellule del carcinoma mammario si ha, dunque, un aumento dell'espressione di p53 associata all'inibizione della proliferazione.²⁵ Inoltre, l'inibizione selettiva dell'HDAC2, ma non dell'HDAC1 o 6, potenzia l'apoptosi indotta dal tamoxifene per i recettori delle cellule del cancro al seno attraverso la *down-regulation* dei recettori ormonali.²⁶ L'HDAC3, invece, è un componente chiave dell'aberrante trascrizione delle cellule che esprimono PML-RAR α

nella leucemia promielocitica acuta. La soppressione dell'HDAC3 in queste cellule ripristina l'espressione dei geni dell'acido retinoico.²⁷ Reprimendo l'espressione dell'HDAC8 si ha riduzione della proliferazione delle cellule tumorali del polmone, del colon e del cancro cervicale. L'HDAC8, infatti, è implicato nella regolazione dell'attività delle telomerasi.²⁸ Inibitori selettivi dell'HDAC8 inducono l'apoptosi nelle cellule T del linfoma ed in altre cellule leucemiche, ma non in linee continue di cellule tumorali.²⁹ Nelle cellule del neuroblastoma infantile, la soppressione dell'HDAC8 ha portato all'inibizione della proliferazione, alla riduzione della crescita cellulare, all'arresto del ciclo cellulare ed alla differenziazione cellulare, senza incidere sulla globale acetilazione degli istoni o sull'attività cellulare delle HDAC.

Classe II

I membri della seconda famiglia delle HDAC sono ulteriormente suddivisi in due classi: IIA e IIB. I membri della classe IIA, HDAC4, 5, 7, 9, presentano un ampio ed importante dominio *N*-terminale che consente lo spostamento tra il nucleo ed il citoplasma ed il legame con il DNA. Tra questi, l'HDAC4 interagisce con la proteina di fusione della leucemia PLZF-RAR α e media la repressione di geni associati alla differenziazione.³⁰ L'HDAC5 interagisce con il fattore di trascrizione GATA-1. Il silenziamento dell'HDAC7 nelle cellule endoteliali altera la loro morfologia, la loro migrazione, e la loro capacità di formare strutture capillari in vitro, ma non in-

fluenza l'adesione cellulare, la proliferazione o l'apoptosi, suggerendo che l'HDAC7 possa rappresentare un obiettivo razionale anti-angiogenesi nel cancro.³¹

Tra le HDAC di classe IIB vi sono le HDAC6 e 10. L'inibizione dell'HDAC6 riduce la migrazione dei fibroblasti, ma non altera il ciclo cellulare.³² Essa causa, inoltre, un'acetilazione dell'HSP90 (high shock protein) inibendo la sua funzione di proteina chaperon, con conseguente esaurimento delle proteine responsabili della crescita cellulare nelle cellule leucemiche K562, tra cui l'oncoproteina Bcr-Abl.³³ La soppressione dell'HDAC6 e 10 può giocare un ruolo importante nella degradazione proteosomica del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR) nell'anti-angiogenesi mediata dalle HSP. Le HDAC6 e 10, infatti, se sopresse, riducono l'espressione dei recettori VEGF1 e 2 nelle cellule tumorali.³⁴

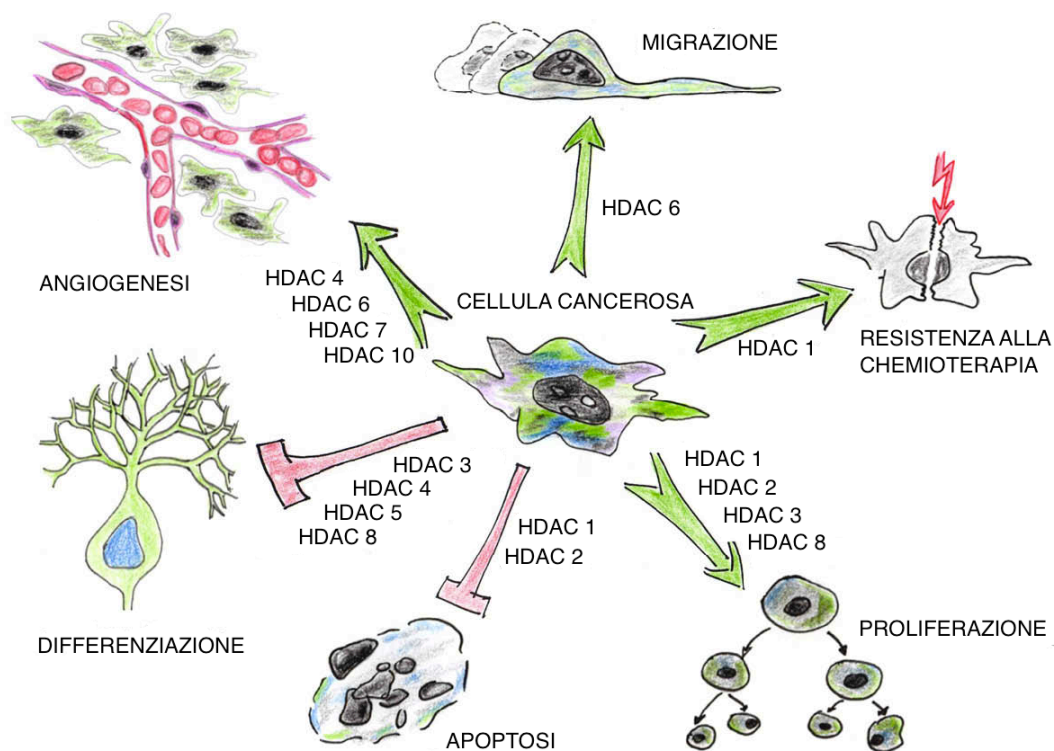


Figura 6

La disponibilità di molti composti che agiscono da inibitori delle HDAC (HDI) ha permesso di guardare a questi enzimi come potenziali agenti anti-tumorali. Tutti gli HDI testati, infatti, hanno mostrato una potente attività inibitoria nella crescita di linee cellulari di differente natura istologica ed in tumori animali. Essi, inoltre, hanno manifestato scarsa tossicità, sia in vitro sia in vivo, nei confronti di cellule sane, nonostante inducano iperacetilazione sia in queste sia nelle cellule tumorali.

4. EFFETTI DELL'ATTIVAZIONE DELLE HDAC

Gli effetti dell'attivazione delle HDAC danno luogo a (Figura 7):

- ✓ Arresto del ciclo cellulare
- ✓ Angiogenesi
- ✓ Immunomodulazione
- ✓ Apoptosi

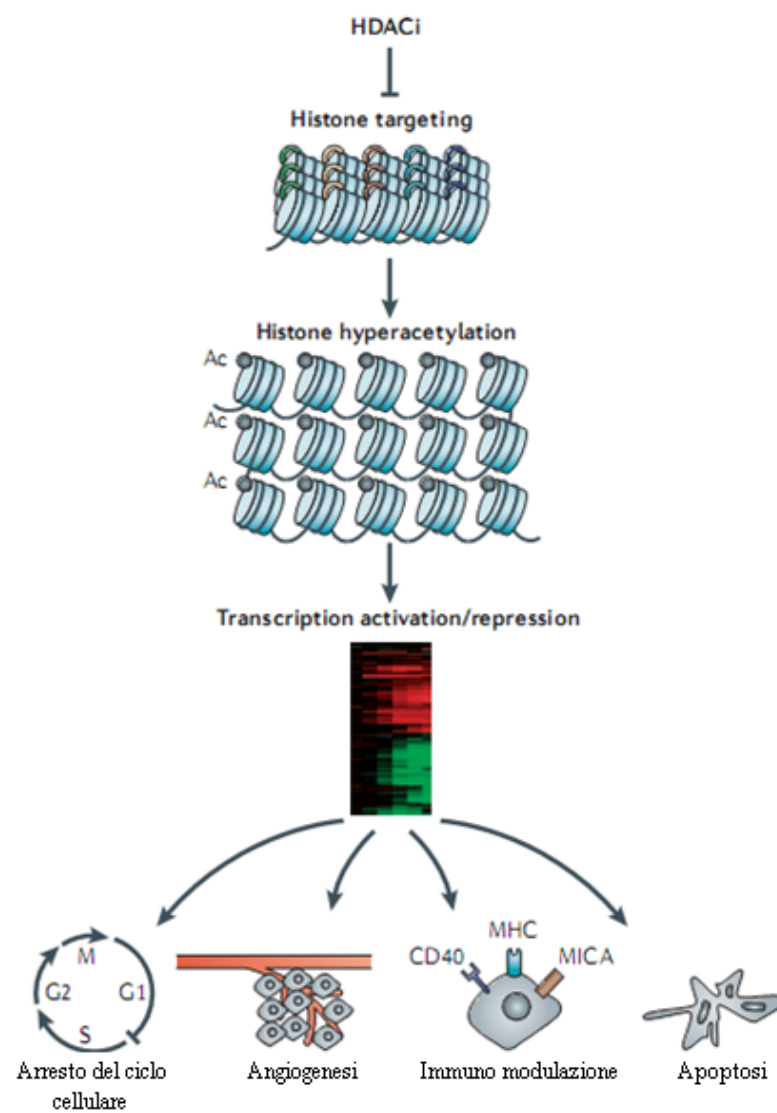


Figura 7

Arresto del ciclo cellulare

L'arresto del ciclo cellulare nella *fase G1/S* avviene principalmente tramite l'attivazione di pRb. Essa ha inizio con l'attivazione trascrizionale del gene CDKN1A, che codifica per la proteina p21 (inibitore ciclin-dipendente della chinasi 1A), la quale è responsabile dell'ipofosforilazione di pRb, determinandone l'attivazione.³⁵ In realtà l'arresto del ciclo cellulare può avvenire anche grazie alla repressione esercitata dagli HDI sui geni che codificano per la *ciclina D* e per la *ciclina A*. Come conseguenza, si ha la perdita dell'attività delle cdk2 e delle cdk4 che determina l'ipofosforilazione di pRb.³⁶

Un ruolo importante è svolto anche dall'espressione di altri inibitori della crescita quali i geni GADD45 α e GADD45 β i cui prodotti genici interagiscono con altre proteine come p53, p21, Cdc2, MEKK4 e PCNA, innescando una serie di risposte cellulari che conducono all'arresto del ciclo cellulare. Le HDAC possono ancora determinare l'espressione di TGF β , responsabile della repressione di c-myc, un gene coinvolto nella progressione del ciclo cellulare nella fase G1, con conseguente arresto del ciclo.³⁷

L'arresto del ciclo nella *fase G2/M* è un evento più raro e non del tutto documentato. Molte cellule tumorali presentano un cattivo controllo nel checkpoint 1; esse, dunque, si fermano nella fase G2/M e, se trattate con inibitori delle istone deacetilasi, vanno incontro ad apoptosi. A conferma della selettività degli HDI nei confronti delle cellule tumorali, studi sperimentali dimostrano che cellule dotate di un buon controllo al checkpoint 2 non van-

no incontro ad apoptosi.³⁸ Il controllo degli HDI associato alla fase G2 può essere correlato all'iperacetilazione del centromero con conseguente anomala segregazione cromosomica e frammentazione nucleare.³⁹

Angiogenesi

Gli HDI presentano un'attività anti-angiogenica, anti-invasiva e immunomodulatoria; ciò contribuisce all'inibizione dello sviluppo e della progressione cancerosa. Tale attività è imputabile al decremento dell'espressione genica dei fattori responsabili della crescita vascolare. Gli HDI sono, infatti, responsabili della "downregulation" di molti fattori che interferiscono con il processo angiogenetico quali il VEGF (vascular endothelial growth factor), la NOS (endothelial nitricoxide synthase), e l'angiopoietina. Essi causano, inoltre, la soppressione della produzione di chemochine come la CXCR4, importanti per il trasporto dei precursori del midollo osseo e di cellule dell'endotelio circolanti al sito di angiogenesi. Infine, si è visto che gli HDI determinano soppressione della differenziazione cellulare dei precursori endoteliali.⁴⁰

Immuno modulazione

Gli HDI sono capaci di aumentare l'immunogenicità delle cellule tumorali tramite un aumento dell'espressione di molecole di adesione (come CD40, CD80, CD86), del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) del I e del II tipo e di MHC (class I chain-related molecole), MICA e

MICB. MHC, infatti, si lega al recettore NKG2D (natural killer cell protein group 2D) sulla superficie delle cellule natural killer, quali CD8, causando morte cellulare. I carcinomi epatocitari che, a differenza dei normali epatociti, mostrano una sovraespressione di MICA e MICB, sono lisati efficacemente.⁴¹

Gli HDI, come l'acido idrossammico della suberoilamide (SAHA), riescono anche a sopprimere le *citochine* pro-infiammatorie, quali TNF α , IFN γ (interferone γ) ed IL-1 (interleuchina 1), che hanno un ruolo centrale nella patogenesi di molti tumori.⁴² Non è ancora chiaro come essi causino un'iperacetilazione diretta sul promotore/enhancer dei geni codificanti le citochine. Si è visto, però, che STAT1, STAT3 ed NF-kB, che sono considerati i fattori di trascrizione più importanti nella regolazione espressiva dei componenti del sistema immunitario, sono regolati direttamente dall'acetilazione. Si suppone che l'alterazione dell'acetilazione di questi fattori, dovuta alla somministrazione di HDI, sia responsabile dell'effetto sulle cellule immunitarie e sulle citochine.⁴³

Apoptosi

Gli HDI attivano vari recettori della famiglia dei TNF ed i loro ligandi, responsabile del processo apoptotico estrinseco.⁴⁴ Basse concentrazioni di inibitori delle istone deacetilasi (come ad esempio il depsipeptide che da solo fallisce nell'induzione apoptotica), sensibilizzano marcatamente le cellule dei linfomi maligni primari all'apoptosi indotta dal TRAIL (recettore del-

la famiglia dei TNF). Questa combinazione causa una bassa o nulla tossicità verso i linfociti normali. Gli HDI sensibilizzano, inoltre, le cellule resistenti attivando un'apoptosi indotta dal TRAIL tramite la formazione del complesso DISC con l'attivazione della caspasi 9. Ciò conduce alla rapida attivazione della caspasi 8.⁴⁵

Per quanto riguarda il processo intrinseco, dati sperimentali mostrano come sia possibile mediare il blocco di geni antiapoptotici come Bcl2 e Bcl-X_L per trattamento delle cellule con HDI, indipendentemente dal tipo di cellula. Si è visto, infatti, che la regolazione della proteina BH3-only (della famiglia delle Bcl2) avviene grazie a modificazioni post-trascrizionali quali la scissione di Bid o la fosforilazione di Bad e Bim.⁴⁶ Infatti BID è clivato ed attivato in risposta alla somministrazione di vari HDI e ciò induce l'apoptosi.⁴⁷ L'induzione di BIM grazie all'azione degli HDI (quali SAHA e TSA) è selettiva per le cellule tumorali poiché si verifica in risposta ad una sregolata attivazione del processo che coinvolge pRb-E2F1. E2F1 si lega, infatti, al promotore di Bim attivando l'apoptosi cellulare.⁴⁸ BMF è, invece, indotto dagli HDI quali depsipeptide e CBHA (acido *m*-carbossicinnamico e bis-idrossammide).⁴⁹

L'espressione della proteina *wildtype* p53 non è necessaria per l'apoptosi indotta da HDI. Studi recenti dimostrano che gli inibitori delle istone deacetilasi inducono la degradazione specifica del mutante p53, grazie ad un'attività trascrizionale p53-like proveniente dall'induzione di p53 *wildtype*. Molti geni indotti dagli HDI (come CDKN1A e Bax) sono anche target

della proteina p53 e sono indotti sia dal *wild type* che dal mutante.⁵⁰

5. HDAC E MALATTIE NEURODEGENERATIVE E CARDIOVASCOLARI

Osservazioni cliniche più recenti, effettuate in modelli animali geneticamente modificati nei quali possono essere inattivate singole HDAC (soprattutto della classe I e II), hanno mostrato che essi controllano molte altre risposte biologiche rilevanti nella patogenesi di disordini non correlati con il cancro.⁵¹ Studi sperimentali indicano che le HDAC hanno un ruolo importante nei processi cognitivi ed in altre funzioni neurologiche.⁵² Sono stati identificati due principali meccanismi neuroprotettivi nei quali giocano un ruolo rilevante gli inibitori delle istone deacetilasi: l'attivazione trascrizionale di geni modificanti la malattia e la correzione delle perturbazioni nell'omeostasi dell'acetilazione istonica, intimamente coinvolti nella meccanismi neurodegenerativi di Huntington,⁵³ di Parkinson, della malattia di Kennedy,⁵⁴ della sclerosi laterale amiotrofica (ALS),⁵⁵ nella sindrome di Rubinstein-Taybi,⁵⁶ nonché nell'ischemia. Studi effettuati in vitro ed in vivo hanno valutato la sicurezza e l'efficacia degli HDI per il trattamento di malattie quali la corea di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica e l'atrofia muscolare spinale.⁵⁷ In alcuni casi HDAC1 e 2 sono state identificate come i maggiori responsabili di importanti processi regolatori neurologici (come la formazione di sinapsi) e sono finora gli obiettivi terapeutici più importanti individuati, anche se il loro ruolo in disturbi neurologici ancora attende di essere chiarito.⁵⁸ L'implicazione delle HDAC in molti di-

sordini neuromuscolari, quali atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA),⁵⁹ atassia di Friedreich (FRDA)⁶⁰ e sclerosi laterale amiotrofica (ALS),⁶¹ è provata da risposte positive in seguito al trattamento con gli HDI in modelli animali. In particolare nella FRDA si è visto che una serie di difenilammidi, una classe di HDI, aumenta la trascrizione del gene nucleare FXN ed i livelli di acetilazione di H3K14, H4K5 e H4K12.⁶² In particolare si è visto che la difenilammide forma un complesso stabile ed a lunga durata con HDAC3, l'isoforma prevalentemente coinvolta nella FRDA.⁶³ I risultati della fase I di sperimentazione clinica per la SBMA con fenilbutirrato sodico nei bambini o negli adulti sono ora in corso ed in fase di valutazione. In particolare, nessuno degli HDI più recenti, sia quelli con un ampio spettro di attività sia quelli selettivi per alcune isoforme, sono stati finora considerati in studi clinici non relativi al cancro.

Negli ultimi anni diverse linee di ricerca hanno indicato che differenti membri della classe HDAC I e II sono importanti nella fisiologia e patofisiologia cardiovascolare. L'iperespressione della classe I (HDAC1, 2 e 3) è direttamente coinvolta nella regolazione della proliferazione cardiomiocitica e nell'ipertrofia cardiaca.⁶⁴ Sorprendentemente, l'inattivazione genetica della classe II determina un fenotipo caratterizzato da ipertrofia cardiaca e scompenso cardiaco attraverso un meccanismo che, anche se non ancora bene interpretato, implica chiaramente un effetto sulla funzione delle HDAC di classe I.⁶⁵ In molti casi, infatti, gli HDI si sono mostrati efficaci nel migliorare la funzione cardiaca e/o nel prevenire l'ipertrofia.⁶⁶

È degno di nota il fatto che molti aspetti dell'omeostasi vascolare e cardiovascolare sembrano regolati dalle HDAC, le quali, infatti, manifestano una funzione pro-angiogenica. Infatti, è stato dimostrato che alcuni HDI causano una riduzione dell'angiogenesi tumorale sperimentale.⁶⁷ Inoltre è stato postulato un ruolo protettivo da parte delle HDAC nell'aterosclerosi alla luce delle prove che mostrano che il trattamento con TSA, di topi deficitari della apolipoproteina E (APOE), ha avuto un effetto negativo sulla deposizione lipidica o sulla formazione di ateromi.⁶⁸ Al tempo stesso, però, il trattamento con gli HDI, negli stessi topi, li protegge dall'aneurisma, suggerendo un complesso ruolo di regolamentazione per le HDAC nella risposta cardiovascolare nelle condizioni di stress.

Molti disordini neuromuscolari sono caratterizzati da alterazioni cardiovascolari; tra questi la distrofia muscolare di Duchenne, che è forse la sindrome neuromuscolare più studiata. Si è visto che in essa le HDAC giocano un ruolo importante.⁶⁹ Tale patologia è dovuta alla mancanza o alla mutazione di distrofina che compromette la funzionalità della muscolatura cardiaca e scheletrica dei pazienti affetti. Si è visto che inibitori delle HDAC quali SAHA, TSA ed MS275 promuovono la rigenerazione della muscolatura scheletrica inibendo l'HDAC2.⁷⁰

È interessante notare come una marcata diminuzione dell'attività della controparte dell'HDAC, l'istone acetiltransferasi (HAT), ed una disfunzione trascrizionale siano implicate in quasi tutte le condizioni neurodegenerative. Pertanto, aumentare l'attività totale delle HAT attraverso l'inibizione

delle HDAC si è dimostrata essere una strategia efficace per ritardare o arrestare la progressione della malattia neurologica in modelli cellulari e di roditori. Infatti, gli HDI sono attualmente testati in studi clinici di fase I e II per la corea di Huntington, la SBMA e la FRDA.

Evidenze recenti, tuttavia, hanno indicato che la follinostatina potrebbe essere un obiettivo importante per gli HDI poiché attiva la rigenerazione muscolare in topi mdx (topi modello per la distrofia muscolare) attraverso l'attivazione di cellule precursori.⁷¹ Questo effetto può essere correlato all'attività di trascrizione/regolazione degli HDI che comporta una modulazione dell'espressione genica e cambiamenti nel metabolismo cellulare. A questo proposito l'esempio fornito dalla regolazione del monossido di azoto (NO) dipendente dell'attività delle HDAC sembra particolarmente importante. Nei topi mdx, infatti, la riduzione della produzione di NO, come conseguenza della mancanza di distrofina, determina una disregolazione della funzione dell'HDAC2 a seguito di una mancanza dell'inibizione S-nitrosilazione dipendente. Degno di nota è che in altre condizioni fisiopatologiche, come quelle determinate dalla malattia polmonare ostruttiva cronica (COBP), nella quale un aumento dello stress ossidativo gioca un ruolo importante, è compromessa la funzione dell'HDAC2.⁷² Sono stati, inoltre, descritti effetti di non trascrizione legati agli HDI. In particolare, è noto che, in presenza di questi farmaci, possono essere acetilati o iper-acetilati filamenti intermedi e/o strutturali, così come proteine contrattili, determi-

nando cambiamenti nella motilità cellulare, nella contrattilità e/o in altre funzioni.⁷³

6. LE HDAC NELLE INFEZIONI VIRALI

Nonostante la terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART) sia estremamente efficace nel ridurre il carico del virus dell'immunodeficienza (HIV-1) al di sotto del limite di rilevazione, esso stabilisce un'infezione latente in un serbatoio delle cellule CD4⁺ T "memoria". L'HIV-1 latente si sottrae alla risposta immunitaria ed alle terapie antiretrovirali, e rappresenta il principale ostacolo per l'eradicazione del virus da pazienti infetti. Numerosi meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali contribuiscono allo sviluppo della latenza dell'HIV-1. Tra l'altro la mancanza o il sequestro di fattori di trascrizione nelle cellule CD4⁺T a riposo rappresenta un ulteriore blocco trascrizionale. Nelle cellule CD4⁺ di memoria, che costituiscono probabilmente il più importante dei compartimenti cellulari di riserva, il virus non è in grado di replicarsi, ma resta sempre presente con una copia del proprio genoma integrato nel DNA della cellula. Queste cellule hanno una vita molto lunga, considerando che la loro funzione biologica è quella di garantire all'organismo una protezione immunitaria nei confronti di antigeni incontrati in precedenza. Tali cellule, quando incontrano l'antigene per il quale sono "programmate", ritornano alla fase attiva, durante la quale permettono al virus di replicarsi. Dopo diversi cicli di replicazione, molte di esse vanno incontro a morte, mentre altre ritornano alla fase di latenza, con-

tribuendo, così, al mantenimento di una stabile riserva virale. Questo serbatoio virale sarebbe quindi il principale responsabile della persistenza dell'infezione anche in corso di un'efficace terapia antiretrovirale, rappresentando in questo modo il più importante ostacolo all'eradicazione dell'infezione.

Il sito d'integrazione del virus può anche avere un forte effetto sull'espressione trascrizionale dell'HIV. Una volta integrato, l'HIV è soggetto agli stessi meccanismi epigenetici di regolazione a cui sono sottoposti i geni cellulari. Alcuni enzimi responsabili di modifiche alla cromatina hanno dimostrato di mantenere la latenza dell'HIV. Questi includono le HDAC, che creano una forma più condensata della cromatina e rimuovono i segnali importanti per l'attivazione dei fattori di trascrizione. Inoltre, si è visto che le modifiche degli istoni e la metilazione del genoma provirale integrato controllano la resistenza delle infezioni latenti da HIV-1 riattivando i segnali e, quindi, determinando la stabilità della latenza dell'HIV-1.

Una futura strategia per l'eradicazione del serbatoio latente si basa sull'idea della riattivazione del virus latente in concomitanza con l'HAART. Le cellule infette potrebbero subire apoptosi dopo l'espressione del virus, e l'HAART impedirebbe l'infezione di nuove cellule. La risposta immunitaria antivirale potrebbe anche essere d'aiuto nella clearance delle cellule infette e prevenire la diffusione delle infezioni virali. La riattivazione del virus latente nelle cellule T memoria primarie richiede l'attivazione dell'Lck e NFAT, ma non dell'NF- κ B. La traslocazione dell'NFAT nel nu-

cleo è accompagnata dal reclutamento di fattori di rimodellamento della cromatina come SWI/SNF e delle istone acetiltransferasi come CBP e p300, seguite da cambiamenti nella struttura della cromatina.

Si è visto che le HDAC di classe I, in particolare le HDAC1, 2 e 3 sono espresse nei nuclei delle cellule CD4⁺ T e sono associate al promotore dell'HIV in modelli di linee cellulari di latenza. In accordo con ciò, l'inibizione chimica selettiva delle HDAC1, 2 e 3 può indurre escrescenza virale *ex vivo* dalle cellule CD4⁺ T a riposo di individui affetti da HIV più degli inibitori HDAC non selettivi, quali l'acido valproico. Per contro, gli inibitori delle HDAC selettivi per la classe II, quindi attivi nei confronti delle HDAC4, 5, 7 e 9 non inducono escrescenza dell'HIV latente. È stato riportato che questi nuovi inibitori delle HDAC, sono efficaci nel riattivare l'HIV-1 latente. Nella linea cellulare ACH2, tali HDI mostrano un'acetilazione della Lys27 e della Lys9 dell'istone H3 dose dipendente, un'attività di riattivazione più elevata dell'HIV-1 rispetto all'acido idrossamico della suberoilammina (SAHA) ed una minore tossicità rispetto ai PXD101. Tali inibitori saranno inclusi in sperimentazioni cliniche di riattivazione dell'HIV-1 dalle cellule CD4⁺ T a riposo di individui infettati dal virus. Recenti rapporti mostrano che alcuni inibitori delle HDAC sono in grado di riattivare in modo efficiente anche l'HIV da cellule latentemente infette. Inoltre, nel caso del virus dell'HIV, dopo il suo ingresso nella cellula, esso integra il suo genoma con quello della cellula ospite. Ciò induce a capire che l'attività virale è direttamente correlata allo stato della cromati-

na. Modificazioni epigenetiche e l'interruzione del Nuc-1, un nucleosoma localizzato a valle del sito di iniziazione della trascrizione che impedisce l'attività dell'LTR, sono prerequisiti necessari per l'attivazione della trascrizione guidata dall'LTR e per l'espressione virale. L'attivazione della trascrizione dipende dallo stato della cromatina, che a sua volta è determinata da modifiche istoniche quali acetilazione, metilazione, fosforilazione ed ubiquitinazione. Alcuni fattori di trascrizione, come l'YY1 e l'LSF, reprimono la trascrizione del virus mediata dall'LTR reclutando le HDAC1 al complesso di repressione. In accordo con ciò si è visto che la trascrizione dei geni dell'HIV-1 è attivata in seguito al trattamento con tricostatina A (TSA) e molti fattori di trascrizione legati all'LTR reclutano le HDAC I e II.⁷⁴

Le HDAC sono, inoltre, coinvolte nella regolazione della replicazione di numerosi virus, in particolare dell'epatite B (HBV) e dell'HIV. Esse potrebbero rappresentare nuovi agenti terapeutici in diverse infezioni virali. Infatti, giocano molti ruoli nella difesa dai virus; si pensa che esse possano riattivare il virus latente presente nelle cellule infette favorendo, dunque, la *clearance* del virus proveniente dalle riserve cellulari come accade nelle infezioni da HIV e da citomegalovirus (HCMV). In secondo luogo, gli HDI potrebbero favorire l'apoptosi delle cellule infette e, conseguentemente, condurre all'eliminazione di queste ultime. Questo meccanismo potrebbe essere utilizzato per uccidere le cellule trasformate infettate da virus come l'HIV ed il virus di Epstein-Barr (EBV).

7. HDAC ED INIBITORI DELLE ISTONE DEACETILASI (HDI)

Le HDAC sono overesprese nel cancro. In particolare le classi I e II sono quelle maggiormente coinvolte in questa patogenesi. La classe I è localizzata esclusivamente nel nucleo mentre la classe II fa da navetta tra il nucleo ed il citoplasma.⁷⁵ Le HDAC III sono, invece, responsabili della deacetilazione di fattori di trascrizione, della p53 e di proteine non istoniche.⁷⁶ Nella regolazione della proliferazione cellulare la classe HDAC I ha un ruolo più rilevante rispetto agli enzimi di classe II.⁷⁷ Si è visto, infatti, che la soppressione dell'apoptosi nelle cellule cancerose è probabilmente dovuta al ruolo esercitato dall'HDAC2;⁷⁸ nella differenziazione dei cardiomiociti, invece, giocano un ruolo importante le HDAC5 e 9.⁷⁹ La maggior parte degli inibitori delle istone deacetilasi sono, sfortunatamente, isoformospecifici.⁸⁰ Ad oggi, l'unica isoforma presente nei mammiferi della quale è nota la struttura cristallina è l'HDAC8 (Figura 8).⁸¹ Proprio a causa della mancanza della conoscenza delle forme cristalline delle altre HDAC, è difficile progettare strutture razionali.⁸²

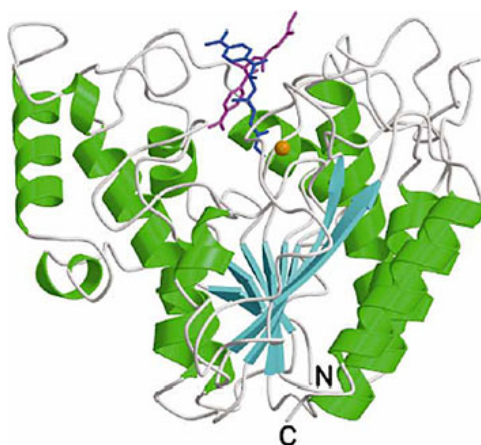
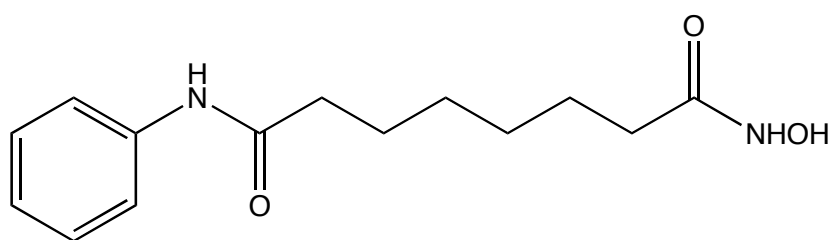


Figura 8

Il dominio catalitico delle HDAC consiste in una stretta tasca di forma tubulare avente una lunghezza equivalente ad una catena di 4–6 atomi di carbonio. Vicino al fondo della tasca dell'enzima è posizionato uno ione Zn^{2+} ,⁸³ il quale facilita la deacetilazione in collaborazione con due sistemi carichi di amminoacidi His-Asp. Stranamente, le HDAC6 e 10 presentano due domini catalitici ed entrambi i domini dell'HDAC6 sono coinvolti nell'attività di deacetilazione.⁸⁴ Il legame di un inibitore noto, come il SAHA, ha mostrato il sito catalitico delle HDAC (Figura 9).⁸⁵



SAHA

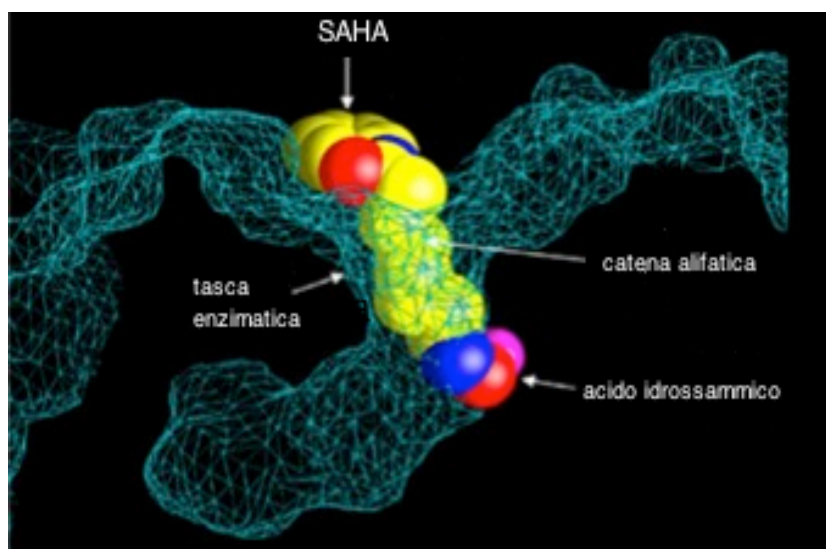


Figura 9

Il ruolo delle HDAC di classe I, nella sopravvivenza cellulare e nella proliferazione, e di quelle di classe II, nella specificità dei tessuti, è stato ottenuto attraverso analisi di “knock out”.⁸⁶

L'interazione diretta delle HDAC1 e 3 con i fattori di trascrizione migliora la stabilità del fattore ipossia-inducibile 1a.⁸⁷ L'HDAC2 modula l'attività trascrizionale tramite la regolazione delle attività di legame della p53.⁸⁸ In caso di repressione delle HDAC2, 5 e 9 sono stati riscontrati effetti cardiaci.⁸⁹ La soppressione dell'HDAC7 causa difetti nella manutenzione dell'integrità vascolare.⁹⁰ Il meccanismo dettagliato di come le disfunzioni delle HDAC causino vari disturbi non è chiaro, perché poco si sa circa la specificità della sequenza degli istoni che determinano l'attività delle diverse HDAC.⁹¹

Nel cancro, le mutazioni strutturali delle HDAC sono rare. Tuttavia, in

vari tipi di cancro, sono stati segnalati vari cambiamenti nell'espressione delle istone deacetilasi. Ad esempio, nei campioni di cancro al colon si è riscontrato un aumento dei livelli delle proteine HDAC2 ed HDAC3;⁹² nel cancro gastrico si hanno maggiori livelli dell'HDAC1; nel cancro del polmone si verifica una ridotta espressione delle HDAC5 e 10.

La capacità degli HDI strutturalmente diversi di andare a inibire l'attività di classi diverse di HDAC dipende dai domini della proteina a cui essi si legano (Figura 10):

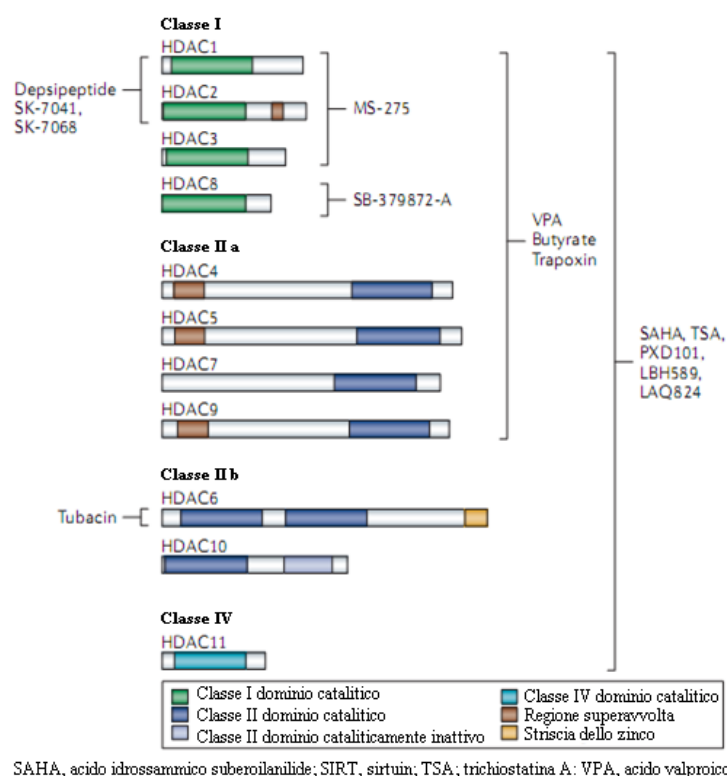


Figura 10

7.1 HDI: CLASSI CHIMICHE

Gli HDI, come visto sopra, hanno il ruolo di inibire la crescita cellulare e dar luogo a differenziazione ed apoptosi della cellula.

Essi sono generalmente costituiti da una porzione chelante lo zinco, da un linker e da un “cap” che interagisce con l’enzima mediante interazioni idrofobiche.

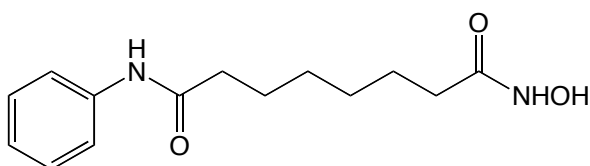
In base alla struttura chimica possiamo distinguere diverse classi di HDI:

- derivati dell’acido idrossammico (es: SAHA, TSA);
- benzammidi;
- corte catene di acidi grassi (es: acido valproico);
- tetrapeptidi ciclici;
- cheto derivati.

I più studiati sono i derivati dell’acido idrossammico e le benzammidi.

Qui di seguito sono riportati una serie di HDI che manifestano una buona attività.

*DERIVATI DELL’ACIDO IDROSSAMMICO*⁹³



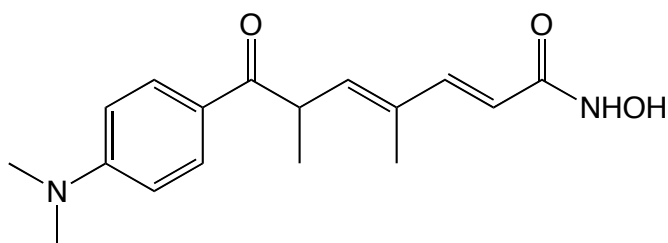
1(SAHA) Vorinostat

IC_{50} HD2 = 0,05 μ M

IC_{50} HD1-B = 0,05 μ M

Il SAHA è stato approvato il 6 ottobre 2006 dalla Food and Drug Admi-

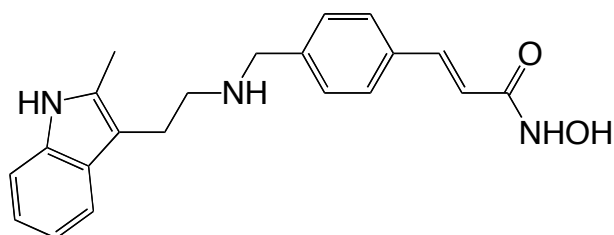
nistration con il nome di Zolinza e viene utilizzato in terapia combinata per il trattamento del linfoma alle cellule T.



2

TSA, Tricostatina A

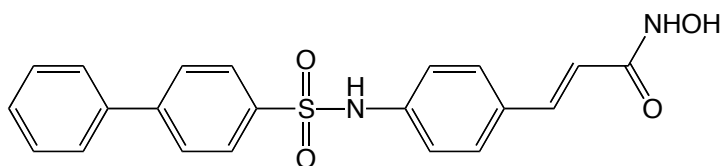
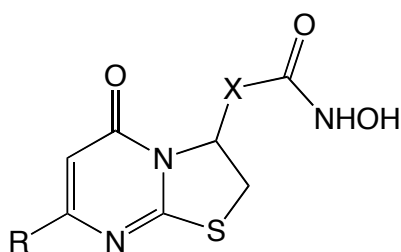
Il TSA inibisce le HDAC1, 3, 4, 6 e 10 con $IC_{50} = 20$ nM.



3

LBH-589, Panobiotat

L'LBH-589 ha manifestato di essere capace di indurre apoptosi delle cellule della leucemia acuta MV4-11. Esso presenta anche un effetto antitumorale nel mieloma multiplo.

*SOLFONAMMIDI*⁹⁴**4**IC₅₀ HDAC1 = 0,01 μM.*URACIL IDROSSAMMATI*⁹⁵**5**

R = Bz; sostituyente ideale

X = (CH₂)_nR = Bz, X = (CH₂)₅;IC₅₀ HDAC2 ed HDAC1-B = 0,018 μM, IC₅₀ HDAC1-A = 0,029 μM.

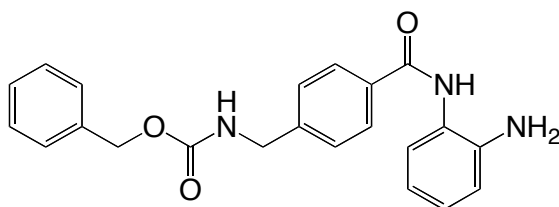
Gli acidi idrossammici rappresentano la più grande classe di inibitori delle HDAC con elevato potenziale terapeutico.⁹⁶ Il primo prodotto naturale scoperto, che appartiene al gruppo degli idrossammati, è la tricostatina A (TSA).⁹⁷ Il TSA è stato originariamente isolato dallo *Streptomyces hygroscopicus*, come antibiotico ed antimicotico attivo contro il fungo *Trichophyton*.⁹⁸ L'analogo strutturale del TSA, il SAHA, inibisce la crescita dei

tumori a basse concentrazioni (nM) e può indurre la differenziazione delle cellule con lievi effetti sulle cellule normali.⁹⁹ Recenti studi hanno dimostrato che sia il SAHA sia il TSA inibiscono l'attività delle HDAC I e II e sono in grado di indurre differenziazione delle cellule del linfoma.¹⁰⁰ Il TSA ha un'attività minore nei confronti dell'HDAC8 ed inibisce le HDAC1, 2, 3 e HDAC4, HDAC6, 7 e 9.¹⁰¹ La classe delle HDAC III (sir-tuin), che sono NAD^+ dipendenti, non è influenzata dal trattamento del TSA. La struttura chimica del TSA è caratterizzata da una frazione 4-(*N,N*-dimetilammino)fenilica collegata, attraverso un gruppo carbonile, ad una catena alifatica insatura (acido 4,6-dimetil-2,4-esandienoico) recante, nella parte finale, una porzione idrossammica. In posizione C6, il TSA possiede, inoltre, un centro chirale.¹⁰² Per quanto concerne il meccanismo biochimico di inibizione degli enzimi, la frazione 4-(*N,N*-dimetilammino)fenilica del TSA lavora come un "cap" che impacchetta l'inibitore all'esterno della tasca tubulare del sito attivo dell'enzima, mentre la funzione idrossammica chela lo ione zinco in modo bidentato al fondo della tasca, determinando l'effetto inibitorio.¹⁰³

Secondo gli ultimi studi, l'attività della telomerasi è anch'essa inibita dal TSA. Nonostante il TSA abbia una vasta gamma di effetti antitumorali, non è stato fino ad oggi utilizzato in studi clinici a causa dei suoi effetti collaterali.¹⁰⁴ Chimicamente il SAHA e gli HDI ad esso correlati contengono un gruppo idrofobo ("cap"), in grado di interagire con la parte esterna del tunnel catalitico dell'enzima, un'unità di connessione polare, presente nella

maggior parte degli HDI, che può formare legami a idrogeno con alcuni residui di amminoacidi nel tunnel, ed un linker idrofobo formato da 4–6 unità di carbonio, che consente al gruppo chelante lo zinco (ossia, il gruppo idrossammato, nel caso del SAHA e del TSA) di raggiungere e complessare lo ione zinco, e quindi di inibire l'enzima.¹⁰⁵ Il SAHA mostra una potenza minore verso l'HDAC8 ed inibisce in modo efficiente le HDAC1, 2, 3, 4, 6, 7 e 9, analogamente al TSA. I meccanismi alla base della sua attività antitumorale non sono stati ancora pienamente caratterizzati e sono molto complessi. Il Vorinostat (SAHA) determina un accumulo degli istoni acetilati con conseguente attivazione trascrizionale ed effetti antiproliferativi. Nella sua attività antitumorale, il Vorinostat utilizza anche proteine non istoniche e complessi di trascrizione, ed i suoi effetti su tali proteine possono essere molto importanti.¹⁰⁶ Il Panobinostat (LBH-589) è meno potente contro l'HDAC6 e meno attivo sull'HDAC8 di uno o due ordini di grandezza, ma è molto attivo contro le HDAC1, 2, 3, 4, 7, 9.

BENZAMMIDI

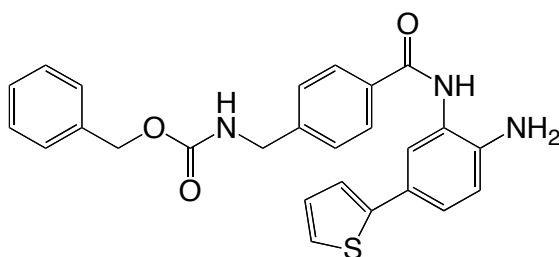


6

MS-275, Entinostat

L'entinostat inibisce la classe I delle HDAC in particolare l'HDAC1 e

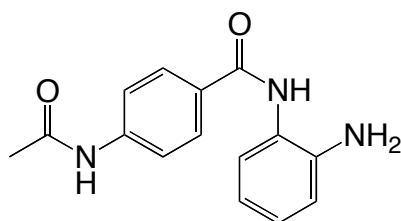
l'HDAC3 mostrando un IC_{50} di 0.51 e IC_{50} di 1.7 μM , rispettivamente. Studi recenti suggeriscono che MS-275 possa avere un ottimo utilizzo nelle neoplasie, in associazione ad altri farmaci quali l'adriamicina.



7

$IC_{50} = 0,02 \mu M$ HD-1

$IC_{50} = 0,01 \mu M$ HD-2



8

CI-994, Tacedinaline

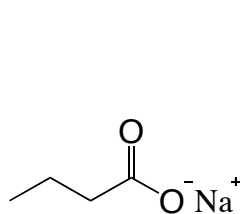
CI-994 (Tacedinaline) è un nuovo composto attivo per via orale con un ampio spettro di attività antitumorale in modelli preclinici in vitro e in vivo.

Come suggerito da studi di modellistica molecolare, questi composti mostrano come porzione caratteristica il gruppo 2-amminoanilide all'estremità destra della molecola. Esso probabilmente può funzionare come gruppo debolmente chelante lo zinco nel sito attivo tubolare dell'enzima,¹⁰⁷ oppure si

penza possa instaurare dei legami con gli amminoacidi chiave del sito attivo, senza che manifesti coordinazione con lo ione Zn^{2+} . L'MS-275 è inattivo verso le HDAC4, 6, 7 e 8 ed inibisce preferenzialmente le HDAC1 e 9, HDAC2 e 3.

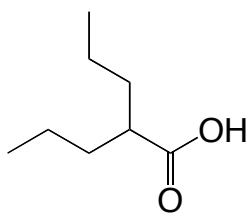
Somministrato per via orale, l'MS-275 inibisce fortemente la crescita in sette delle otto linee tumorali impiantate nei topi, la maggior parte delle quali non risponde, invece, al 5-fluorouracile.¹⁰⁸ Gli inibitori delle HDAC di classe III (sirtuin), in contrasto a quelli della classe I, II e IV, sono meno convalidati come agenti antitumorali e, in generale, meno sviluppati sotto il profilo farmacologico, ma svolgono un ruolo importante nella regolazione dei fattori di trascrizione, nel silenziamento genico, nell'estensione della durata della vita, nella regolazione del ciclo cellulare e nel metabolismo degli acidi grassi.¹⁰⁹ L'MS-275 e CI-994 sono in fase I e II degli studi clinici. MS-275 mostra uno scarso effetto sulla HDAC8 ed inibisce preferenzialmente HDAC1 e 3.¹¹⁰

CORTE CATENE DI ACIDI GRASSI



9

Butirrato di sodio

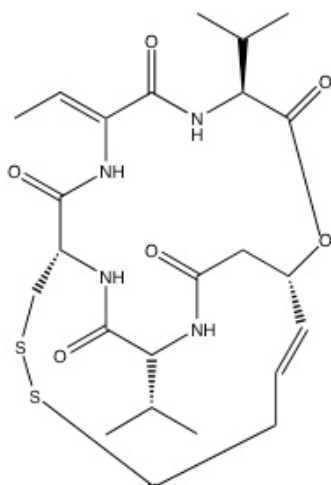


10

Acido Valproico

Il butirrato di sodio, appartenente ad una corta catena di acidi grassi naturali, è un prodotto della fermentazione dei batteri ed è stato il primo inibitore delle HDAC confermato con certezza. Il butirrato, l'acido valproico, il fenilbutirrato ed i loro derivati appartengono alla famiglia degli acidi alifatici. A livello clinico, questo gruppo ha avuto un uso limitato a causa della sua alta concentrazione efficace (mM) valutata nelle cellule. Il meccanismo d'azione degli acidi grassi a catena corta non è ancora stato completamente chiarito. A causa delle loro catene laterali brevi, che limitano il loro contatto con il catalizzatore nella tasca dell'enzima, essi hanno manifestato una bassa potenza.¹¹¹ I butirrati inibiscono la crescita cellulare nel cancro della prostata umana e nelle cellule di carcinoma della cervice uterina, ed inducono acetilazione degli istoni e maturazione dei granulociti nella leucemia mieloide acuta.¹¹² I butirrati sono stati oggetto di valutazione clinica nelle neoplasie ematologiche e nei tumori solidi.¹¹³ L'acido butanoico è attualmente in sperimentazione clinica nelle linee di cellule tumorali della leucemia ed ha mostrato una potenza dieci volte maggiore rispetto al butirrato di sodio.¹¹⁴ Nonostante l'attività degli acidi grassi a catena corta sia debole, alcuni di essi sono entrati in fase di sperimentazione clinica.

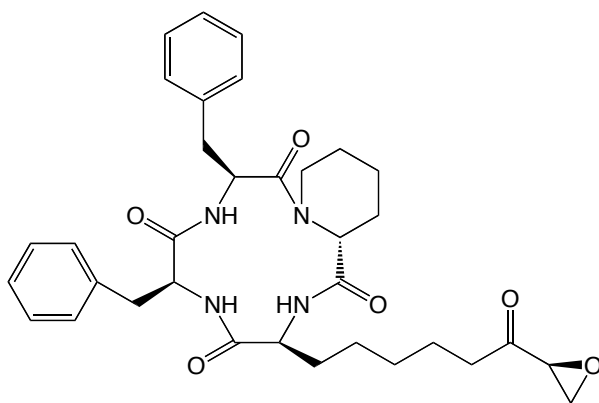
PEPTIDI CICLICI



11

Romidepsin, despeptide

Il Romidepsin è stato approvato il 5 Novembre 2009, dalla Food and Drug Administration per il trattamento del linfoma alle cellule T (CTCL).



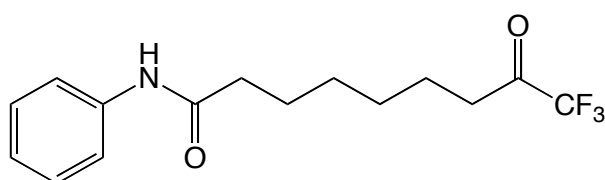
12

Trapoxin

Un certo numero di prodotti naturali con notevoli attività in vitro, come il Romidepsin e il Trapoxin A e B, sono inibitori delle HDAC che apparten-

gono a questa classe.¹¹⁵ Il Depsipeptide, un prodotto naturale estratto dal *Chromobacterium violaceum* è un altro inibitore delle HDAC che appartiene al gruppo dei peptidi ciclici.¹¹⁶ Il Trapoxin, chimicamente, è un ibrido tra un peptide ciclico ed una porzione di epossichetone.¹¹⁷ I peptidi ciclici vengono utilizzati nella terapia del cancro e sono nella fase di prove cliniche I e II poiché inibiscono le HDAC a concentrazioni nanomolari.

CHETODERIVATI



13

$$\text{IC}_{50_{\text{FB188 HDAH}}} = 11.19 \mu\text{M}$$

Il complesso inibitore 9,9,9-trifluoro-8-osso-*N*-fenilnonanammide è stabilizzato grazie alle interazioni dei tre atomi di fluoro in esso presenti con il sito catalitico dell'enzima, a differenza del SAHA, ed in generale degli acidi idrossammici, i quali sono stabilizzati, oltre che dal legame con lo zinco, anche grazie alla formazione di tre legami addizionali con l'His142, l'His143 e la Tyr312. Sebbene il SAHA presenti un valore di IC_{50} inferiore rispetto al chetoderivato **13**, quest'ultimo mostra una migliore selettività, soprattutto nei confronti delle HDAC1 e 2 dell'estratto nucleare di cellule K562 ($\text{IC}_{50} = 6.7 \mu\text{M}$).¹¹⁸

7.2 SITO ATTIVO DELLE HDAC

I derivati dell'acido idrossammico mostrano, in molti casi, un'attività maggiore rispetto alle benzammidi. Questo può essere spiegato studiando l'interazione della porzione idrossammica con lo zinco. Essa, infatti, interagisce con l'atomo di zinco, presente alla base del sito catalitico dell'enzima, grazie alla presenza del cheto gruppo e dell'ossidrile, responsabili della formazione di un complesso pentavalente con lo ione zinco; a volte partecipa al legame anche il gruppo NH. Infatti, nel caso del SAHA, studi effettuati sull'omologo archeobatterico dell'HDAC umano (HDLP) hanno evidenziato la presenza di tre addizionali legami idrogeno tra i gruppi CO, NH ed OH rispettivamente con la Tyr-297, l'His-132 e l'His-131.¹¹⁹ Comparando le strutture degli HDI conosciuti, quali il SAHA ed il TSA, si vede che tutti presentano una regione di legame con il metallo, legata, attraverso una catena carboniosa, ad un cap idrofobico; quest'ultimo interagisce con gli amminoacidi all'ingresso del canale responsabile del legame con l'*N*-acetil lisina.¹²⁰ Per dimostrare la maggiore attività dei derivati idrossammici rispetto alle benzammidi, sono stati effettuati studi biologici su un derivato del composto **1**, in cui la porzione idrossammica è stata sostituita con una benzammidica, con conseguente aumento dell'IC₅₀.¹²¹ Dunque, l'inserimento della porzione benzammidica diminuisce l'attività della molecola.

Inoltre studi di docking sono stati effettuati utilizzando l'HDAC8 ed il composto **7** (Figura 11).

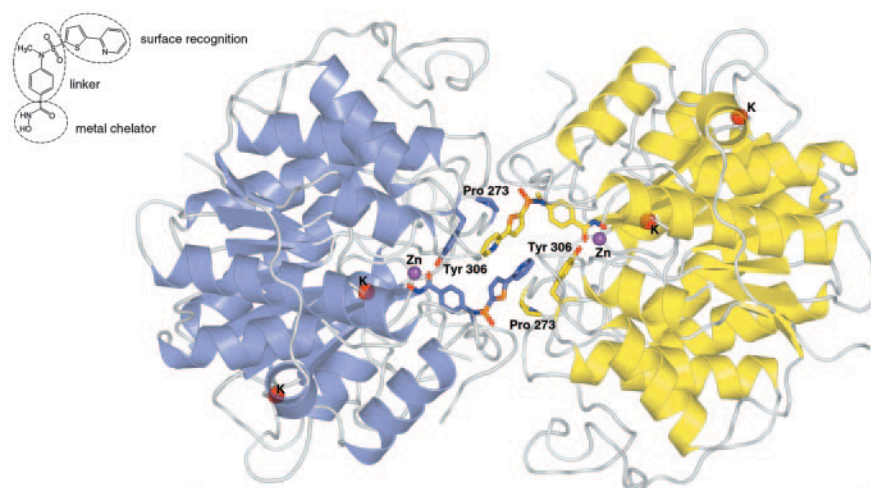


Figura 11

Si vede come esso sia costituito da due molecole impacchettate come un dimero “head-to-head” (testa a testa) dove ogni molecola è responsabile del legame con uno ione Zn^{2+} e due ioni K^+ . La formazione del dimero nel cristallo è mediata dagli inibitori che, con i loro gruppi “cap”, si impilano gli uni sugli altri. Infatti, ogni “cap” interagisce con residui proteici Pro273 e Tyr306 appartenenti, ciascuno, ad una delle due molecole opposte, formando un grande sandwich idrofobico e dando luogo ad un duplice asse, relativo alle due molecole, in un’unità asimmetrica. L’HDAC8, in forma monomerica, si presenta con un compatto dominio α/β composto da un foglietto β centrale, costituito a sua volta da otto catene parallele, e da undici α -eliche. Il foglietto β è affiancato da cinque eliche da un lato e tre dall’altro.

Uno ione Zn^{2+} è presente alla base della tasca enzimatica. Sia nell’HDAC che nell’HDLP il sito attivo dello ione Zn^{2+} è pentacoordinato, avendo come ligandi l’Asp178 (O δ 1), l’His180 (N δ 1), e l’Asp267 (O1), ol-

tre al gruppo idrossammico dell'inibitore (Figura 12).

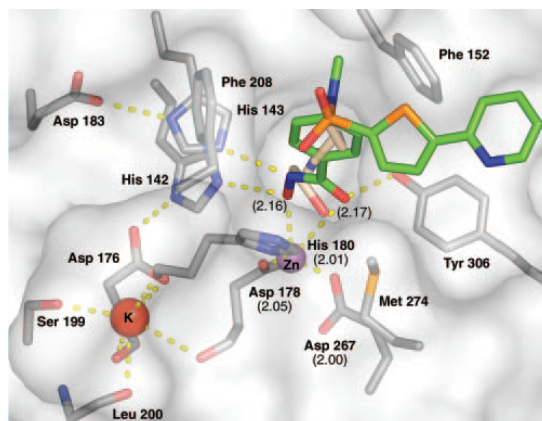


Figura 12

Dalla figura 12 si vede come i due ioni K^+ siano legati a due siti: uno in prossimità del sito di legame dello zinco (sito 1) e l'altro attorno alla molecola (sito 2). Il sito 1 di legame del potassio è direttamente connesso con il sito di legame dello zinco in quanto lo ione K^+ è coordinato dall'ossigeno carbonilico della catena principale dell'Asp178 e dell'His180, amminoacidi coinvolti anche nella chelazione dello zinco. La presenza di K^+ nel sito attivo dell'enzima potrebbe influenzare il meccanismo catalitico della deacetilazione. In primo luogo, il K^+ aumenta il potenziale elettrostatico nel sito e questo potrebbe contribuire a stabilizzare l'ossanione che si forma nello stato di transizione della reazione di deacetilazione e/o a stabilizzare la carica positiva dello ione acetato che si libera. Inoltre, esso potrebbe aumentare il pK_a dell'His42, facilitando probabilmente la protonazione del prodotto formatosi.¹²²

Studi di docking mostrano come molecole di composti inibitori, quali il SAHA, si inseriscano perfettamente nella cavità dell'enzima a livello del sito catalitico, con la porzione idrossammica che si posiziona all'interno, lasciando all'esterno la parte idrofobica, la quale, attraverso interazioni idrofobiche, stabilizza il legame dell'inibitore (Figura13).

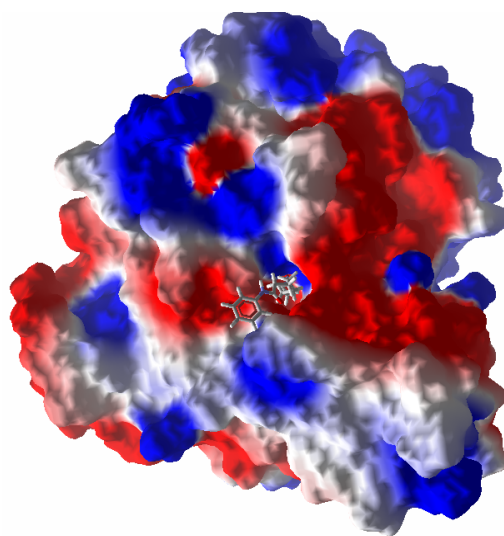


Figura 13

8. DEACETILAZIONEDELLE HDAC

Finnin fu il primo a proporre una spiegazione riguardo l'attività catalitica delle HDAC; in particolare i suoi primi studi furono effettuati sulle HDLP (istone deacetilasi del lievito) mediante cristallografia a raggi X. Finnin sostiene che nelle HDLP l'atomo di zinco sia circondato da due coppie di residui istidina-aspartato (His131-Asp166 e His132-Asp173) e da una tirosina (Tyr297), che fornisce assistenza protonica; inoltre, sembra che esso sia coordinato in maniera stabile da due residui di acido aspartico (Asp258 ed Asp168) e da un residuo di istidina (His170) (Figura 14).

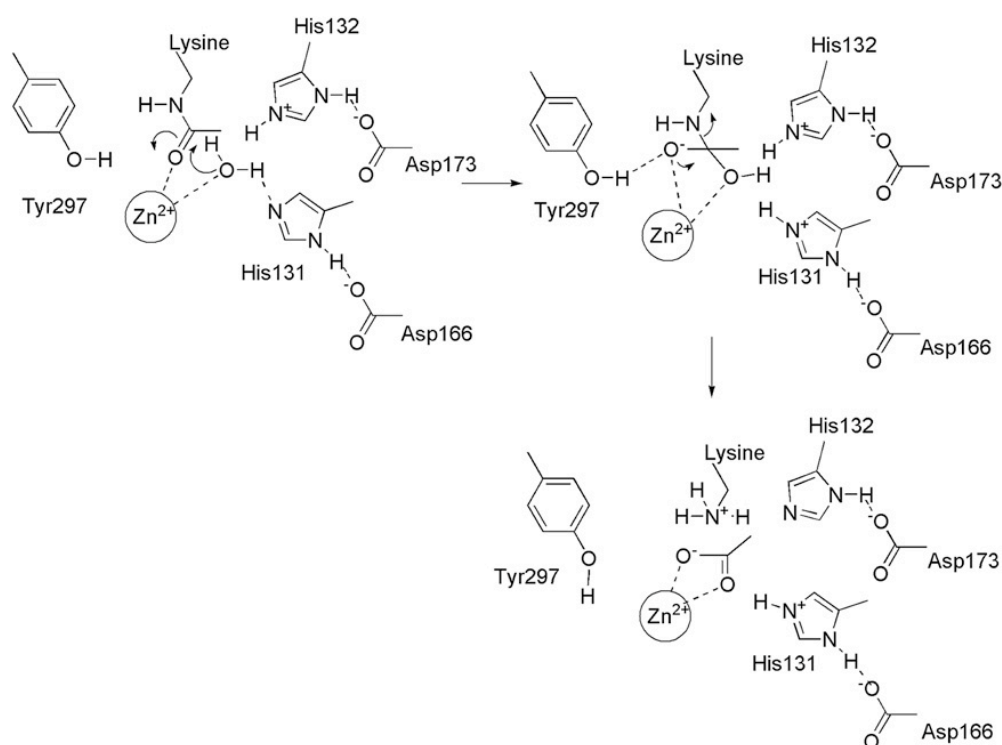
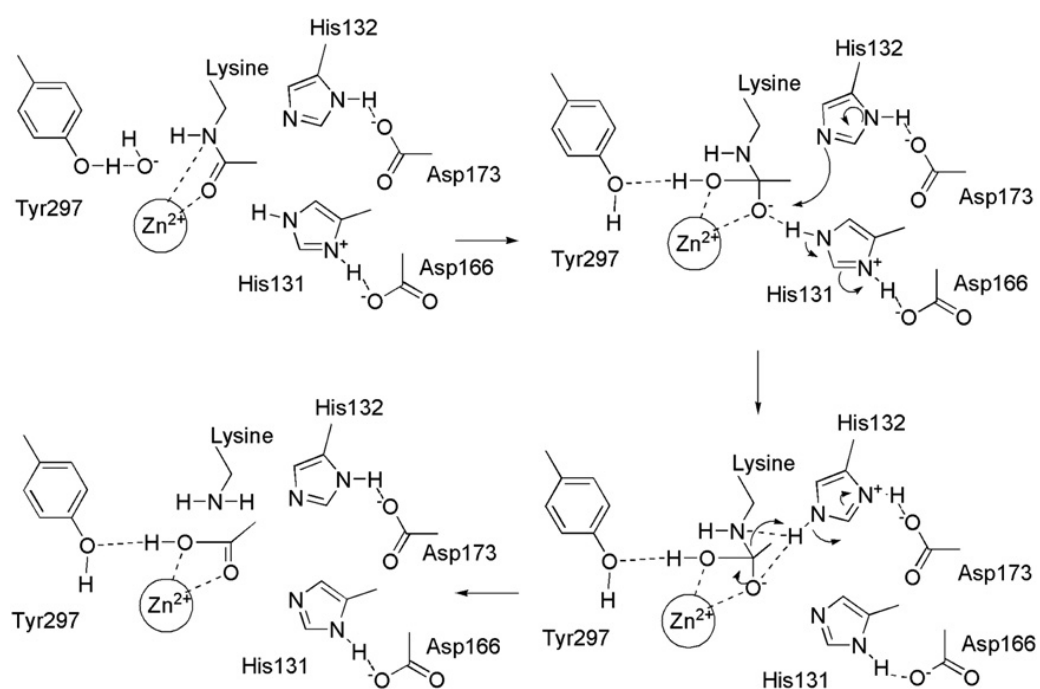


Figura 14

Secondo Finnin il distacco del gruppo acetile ha inizio con l'attacco nucleofilo dell'ossigeno dell'acqua sul carbonio ammidico della lisina. Grazie all'assistenza della stessa lisina, responsabile della formazione di un legame idrogeno con l'ossigeno ammidico, si verifica uno spostamento elettronico che determina il rilascio del gruppo acetile della lisina, la quale, a sua volta, acquista un protone dall'His 132.

Dopo aver perfezionato la spiegazione del meccanismo catalitico della deacetilazione zinco–assistita delle HDAC (Figura 15), Vanommeslaeghe et al.¹²³ hanno spiegato come dovrebbe essere manipolata la struttura del gruppo chelante bidentato, al fine di migliorarne l'attività, considerando cinque elementi strutturali:

- dovrebbe essere un debole donatore di elettroni di non legame, in modo da coordinare lo ione zinco, ed un accettore di legami idrogeno, per essere in grado di accettare gli idrogeni dall'ossidrile della tirosina (Tyr297);
 - dovrebbe legare la porzione chelante lo zinco allo spacer;
 - dovrebbe essere almeno trivalente;
 - dovrebbe essere un donatore di idrogeno per donare un legame idrogeno all'His132. Di conseguenza è necessario che sia almeno trivalente;
 - dovrebbe essere un donatore di protoni per protonare l'His131 e, successivamente, accettare un legame idrogeno non ionico da quest'ultima e stabilire una forte interazione con lo ione zinco.
-

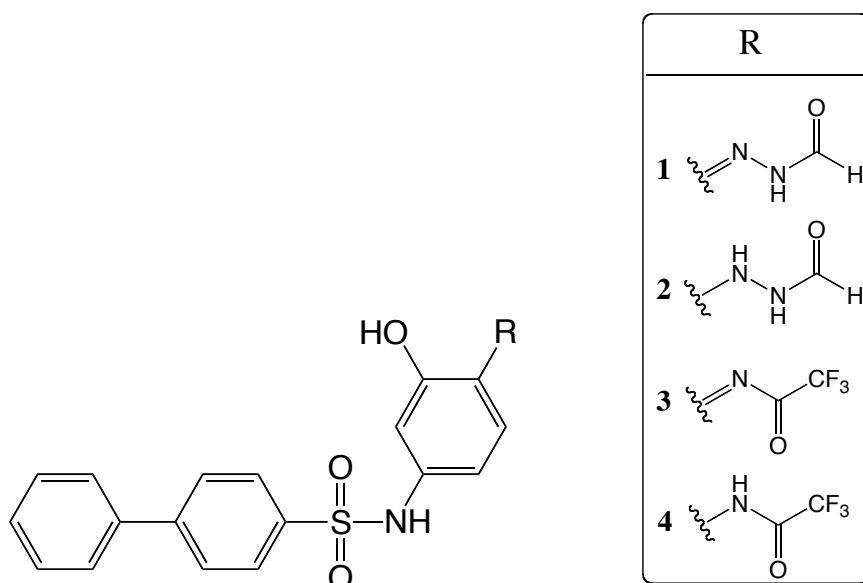
**Figura 15**

9. SCOPO DEL LAVORO

Al giorno d'oggi si conoscono sette classi distinte di HDI e tutte contengono, nel farmacoforo, tre elementi strutturali comuni:¹²⁴

- a) un gruppo legante lo zinco (R), che coordina gli ioni zinco al fondo della lunga e stretta cavità del sito attivo;
- b) un cappuccio o “cap” (nel nostro caso la funzione solfonammidica), che interagisce sia con gli amminoacidi, sul margine del sito di legame, sia con la superficie della proteina;
- c) un dominio di legame, il cui ruolo è assicurare il corretto posizionamento dei gruppi precedenti e di interagire con il canale di legame lipofilo.

Seguendo il nostro recente interesse nella ricerca di inibitori più potenti delle HDAC abbiamo progettato e sintetizzato una nuova serie di composti contenenti quattro nuove porzioni chelanti lo zinco, la formilidrazonometilica, la 2-formilidrazinocarbonilica, la 2,2,2-trifluoro-*N*-metilacetamidica e la 2,2,2-trifluoro-*N*-metilacetamidica, legate attraverso uno spaziatore ad una solfonammide (Schema 1), responsabile dell'interazione idrofobica con l'HDAC.



Schema 1

Si pensa che la chelazione dello zinco avvenga attraverso lo spostamento elettronico che favorisce il legame tra il CO, l'N e l'OH con lo zinco stesso. Sono stati effettuati studi computazionali che riguardano il composto contenente la funzione formilidrazonometilica. Tali studi sembrano dimostrare che la molecola in questione sia in grado di chelare lo ione Zn^{2+} (Figura 16).

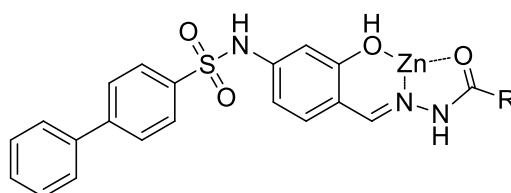


Figura 16

Il nostro interesse verso le solfonammidi deriva dallo studio di una serie di HDI. Tra questi il composto **4** si è mostrato particolarmente interessante

poiché presenta un IC_{50} molto basso (su HDAC1 $IC_{50} = 0.04 \mu M$). Abbiamo dunque pensato di lasciare inalterata la porzione solfonammidica della molecola di riferimento poiché responsabile di ottime interazioni idrofobiche con la porzione idrofobica dell'enzima ed abbiamo deciso di variare la porzione chelante lo zinco prendendo come riferimento un noto inibitore, per incrementarne l'affinità verso il metallo.

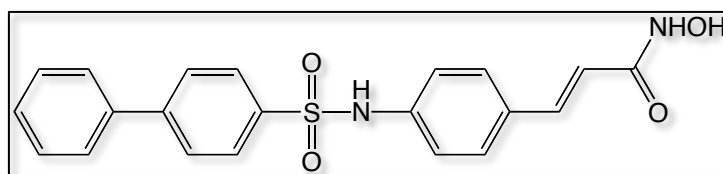


Figura 17

Per quanto concerne la porzione idrofobica del composto in figura 17, studi SAR hanno mostrato che sostituenti all'anello aromatico, come gli analoghi del *p*-metil ed il *p*-*terz*-butil fenile, così come altre sostituzioni con gruppi elettrondonatori come il *p*-metossi, sono equipollenti, nell'attività inibitoria verso le HDAC1, al composto senza sostituenti all'anello benzenico. La sostituzione del difenile con un sistema policiclico aromatico è ben tollerata ma l'attività nei confronti delle HDAC aumenta con la presenza di un gruppo bifenilico. È stata anche studiata la porzione solfonammidica e si è visto che la sostituzione di tale funzione con l'urea diminuisce l'attività enzimatica ed è dannosa per l'acetilazione istonica. Tutti i derivati idrosammici sono più attivi dei corrispondenti acidi carbossilici, probabilmente

perché essendo dei chelanti bidentati, a differenza degli acidi carbossilici che sono chelanti monodentati, esibiscono una migliore coordinazione con lo Zn^{2+} . Dunque, l'utilizzo di idrossammati come ligandi per lo Zn^{2+} garantisce un maggiore effetto inibitorio nei confronti delle HDAC. Di contro, però, i derivati idrossammici si sono manifestati biologicamente labili e ciò ne determinandone una limitata efficacia in vivo; ciò ha portato alla ricerca di nuovi gruppi chelanti.¹²⁵ I derivati benzammidici (MS-275), che differiscono strutturalmente dai noti inibitori delle HDAC, mostrano una minore efficacia nei saggi enzimatici rispetto al TSA, in quanto presentano una IC_{50} pari a 2 μM a differenza del TSA che ha $\text{IC}_{50}=5\text{nM}$. Nonostante ciò l'MS-275 è attivo come HDI e manifesta una buona attività antitumorale in vivo in molti tumori umani.¹²⁶ Il gruppo amminico della porzione benzanilidica può agire come donatore di legami idrogeno o può essere coinvolto in altre interazioni elettrostatiche che sono necessarie per l'attività inibitoria. È stata valutata la distanza ottimale tra la porzione solfonammidica e quella chelante lo zinco nei confronti dell'inibizione enzimatica e si è visto che la sostituzione del fenile con una piridina o un alchino diminuisce l'attività di tre o quattro volte; invece, l'introduzione di un gruppo metilenico alla porzione solfonammidica mostra una diminuzione dell'attività di due volte.

Inoltre, la scelta dell'anello aromatico come linker garantisce delle ottime interazioni idrofobiche nella tasca tubulare dell'enzima. La scelta di introdurre un gruppo ossidrilico in orto alla funzione chelante lo zinco è da attribuire al possibile coinvolgimento dell'ossidrile stesso nella chelazione.

La presenza dell'ossidrile come sostituyente di un anello fenilico conferisce alla molecola una certa planarità che gioca un ruolo molto importante nella chelazione grazie alla perfetta disposizione spaziale degli atomi coinvolti in tale processo.

10. MOLECULAR DOCKING

Dato che il meccanismo di inibizione del TSA e delle strutture correlate è stato già dimostrato attraverso studi ai raggi-X, il modello di legame per tutti i composti è stato costruito usando come modello di riferimento il TSA. Per aumentare l'affinità di questi nuovi ligandi verso lo zinco, abbiamo condotto studi simulativi di “molecular docking” nella tasca dello zinco. Quest'ultimo, infatti, è localizzato alla fine di un canale di 12 Å nel sito attivo della proteina. La struttura 3D del complesso TSA-HDAC è stata recuperata dal Protein Data Bank (codice 1T64), il TSA è stato rimosso dal modello e gli atomi mancanti sono stati ricostruiti ed ottimizzati localmente. Quindi, utilizzando il MolProbity Web server, sono stati aggiunti gli atomi di idrogeno e sono state ottimizzati gli idrogeni ossidrilici dei residui Ser, Thr e Tyr, i gruppi tiolici delle Cys ed i gruppi metilici delle Met. Al tempo stesso sono state assegnate le posizioni degli idrogeni dei residui di istidina, asparagina e glutammina garantendo gli stati di ionizzazione adatti. Infine, sono state assegnate le cariche secondo lo schema di Gasteiger-Marsili e l'intera proteina, con il TSA riposizionato nel sito di legame, è stata ottimizzata fino a raggiungere un'energia di gradiente di 0.005 kcal-Å/mol ed utilizzando come campo di forza AMBER 96. Gli studi computazionali di docking sono stati condotti applicando l'algoritmo genetico di Lamarckian (LGA), implementato in AutoDock 4.0. Per un buon Docking abbiamo usato i parametri seguenti: grid spacing = 0.261 Å, number of runs = 100, npts

= 80-80-80 centrato sul TSA, ga_num_evals = 20.000.000, ga_pop_size = 150, e ga_num_generations = 27.000.

Gli studi computazionali mostrano che i composti **13** e **14** sono buoni candidati come HDI, poiché mostrano un ΔG_{bind} di -7.9 kcal/mol; questo valore è intermedio tra i due inibitori più famosi, SAHA ($\Delta G_{\text{bind}} = -6.9$ kcal/mol) ed il TSA ($\Delta G_{\text{bind}} = -8.2$ kcal/mol) (Tabella 1, Figure 18–20).

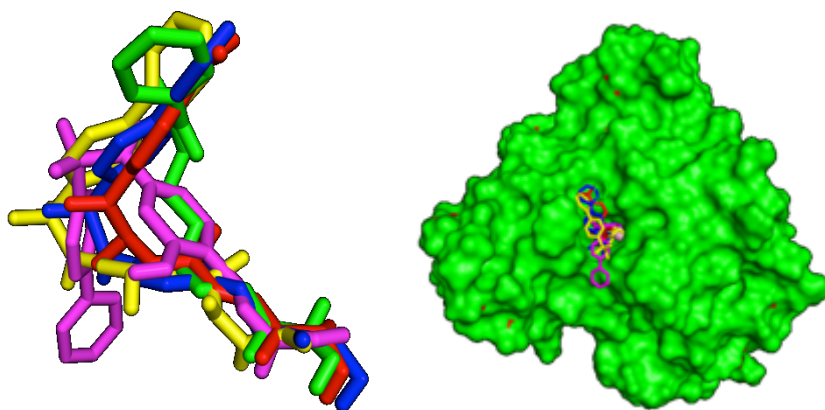


Figure 18 e 19

HDI	IC ₅₀ (nM)	ΔG_{bind} (kcal/mol)	IC ₅₀ (nM)	Colore
TSA	25	-8.2	969	Rosso
SAHA	143	-6.9	8704	Verde
4	50	-9.3	151	Blu
1	—	-7.9	1608	Magenta
2	—	-7.9	1608	Giallo

Tabella 1

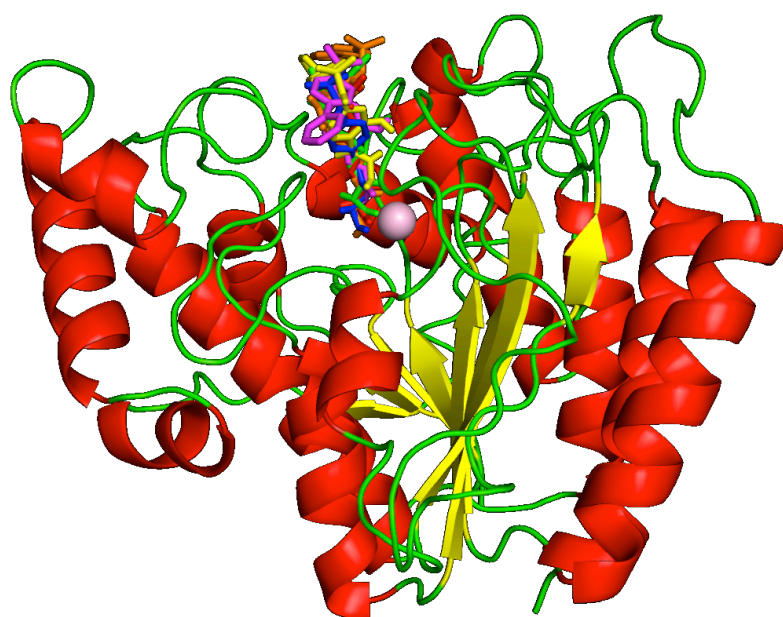
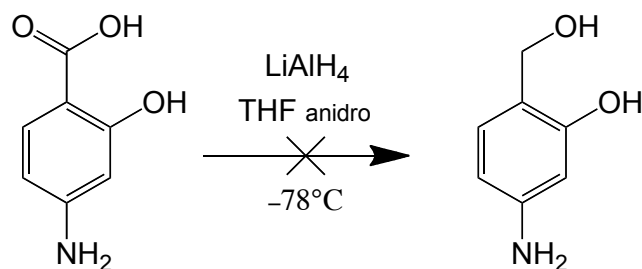


Figura 20

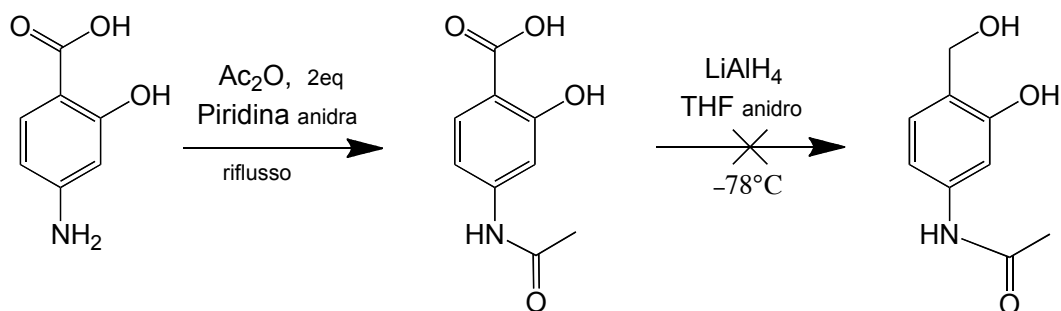
11. RISULTATI E DISCUSSIONE

All'inizio del mio triennio di dottorato avevo progettato una sintesi, in pochi stadi, dei prodotti desiderati che aveva come punto di partenza la riduzione dell'acido carbossilico a gruppo alcolico che sarebbe stato sottoposto, in seguito, ad una reazione di ossidazione per ottenere l'aldeide *p*-amminosalicilica. La reazione è stata condotta con LiAlH_4 in THF anidro ad una temperatura di -78°C ma, nonostante le forti condizioni di reazione (fino a 4 equivalenti di LiAlH_4 a riflusso), quest'ultima non è avvenuta. Ho supposto che il motivo fosse imputabile alla presenza dell'ossidrile, in orto alla funzione carbossilica, responsabile della formazione di legami a idrogeno con il carbossile, rendendo dunque più difficoltoso l'attacco dell'agente riducente.



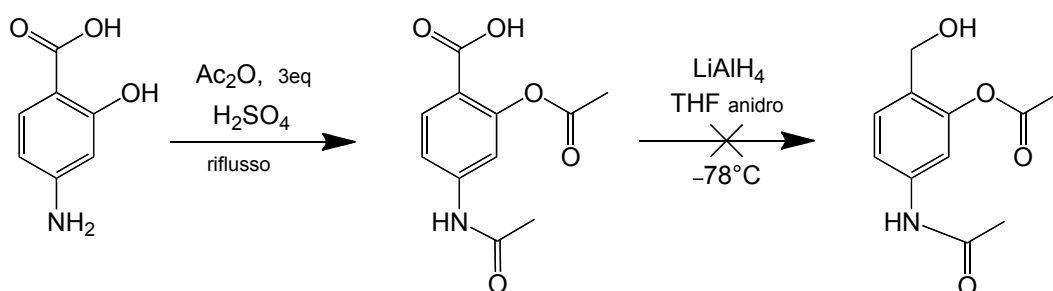
Schema 2

Ho effettuato, dunque, la protezione del gruppo ossidrilico con una funzione acetilica e provato nuovamente a ridurre, usando le condizioni descritte precedentemente. Effettuando l'acetilazione in presenza di anidride acetica, però, si verifica la sola protezione della funzione ammidica. Ho comunque provato la reazione di riduzione con esito negativo.



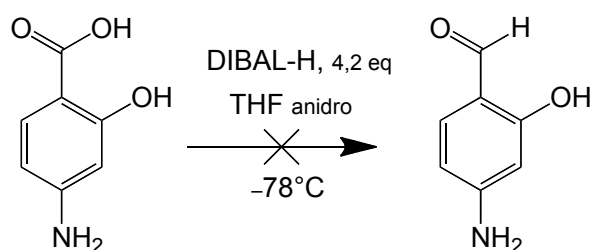
Schema 3

In contrasto con la maggior parte delle pubblicazioni scientifiche, ho verificato che l'acetilazione dell'ossidrile in orto alla funzione carbossilica avviene solo in condizioni fortemente acide. Anche in questo caso la successiva reazione di riduzione non è avvenuta.



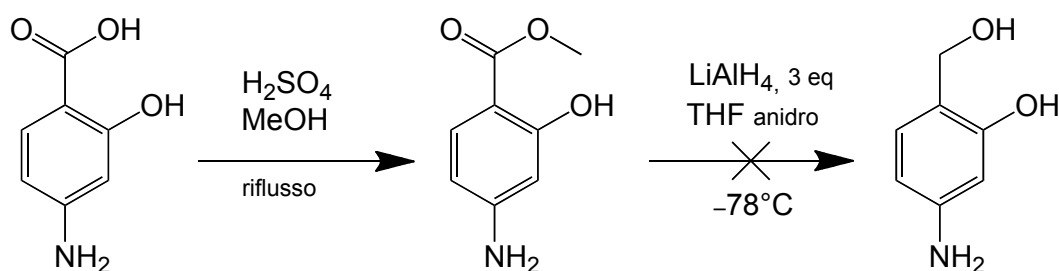
Schema 4

Come ultimo tentativo, ho provato a ridurre il gruppo carbossilico con DBAL-H ma, probabilmente a causa dell'ingombro sterico del riducente, la reazione non è andata a buon fine.



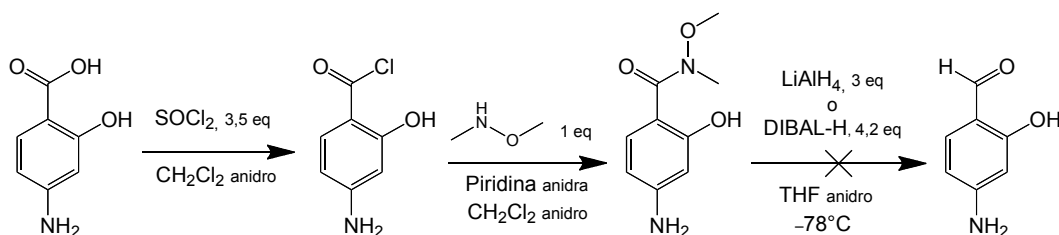
Schema 5

Data la difficoltà nel ridurre l'acido carbossilico ho convertito la funzione carbossilica in esterea in presenza di metanolo ed H_2SO_4 a refluxo ed effettuavo un ulteriore tentativo di riduzione (Schema 6), anche questa con esito negativo.



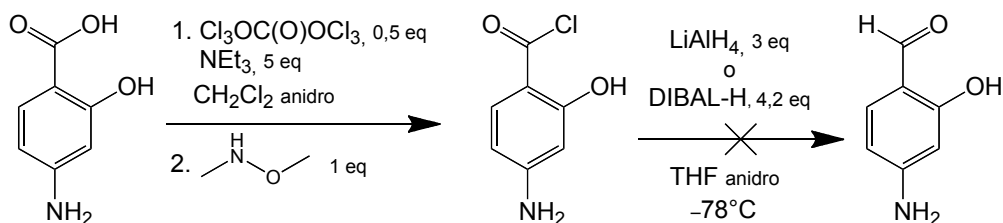
Schema 6

Dopo un'accurata ricerca bibliografica ho tentato di sintetizzare l'aldeide attraverso la sintesi dell'ammide di Weinreb, che, per semplice riduzione, avrebbe portato al composto carbonilico desiderato. L'ammide è stata sintetizzata a partire dal cloruro acilico, a sua volta ottenuto per reazione dell'acido carbossilico con cloruro di tionile distillato. Ma anche in questo caso la riduzione non è avvenuta.



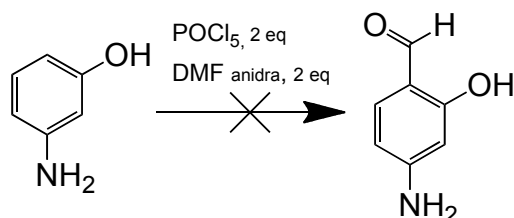
Schema 7

Date le scarse rese, il cloruro di tionile è stato sostituito dal trifosgene, senza, però, riscontrare miglioramenti.

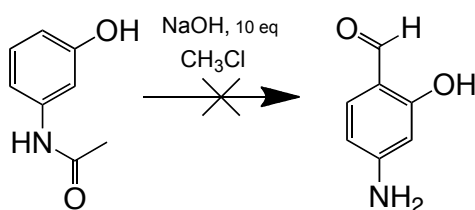


Schema 8

Anche i due tentativi di formilazione secondo Vilsmeier–Haack¹²⁷ e Reimer-Tiemann a partire dal 2-amminofenolo o dalla 3-idrossiacetanilide, rispettivamente, hanno dato esito negativo

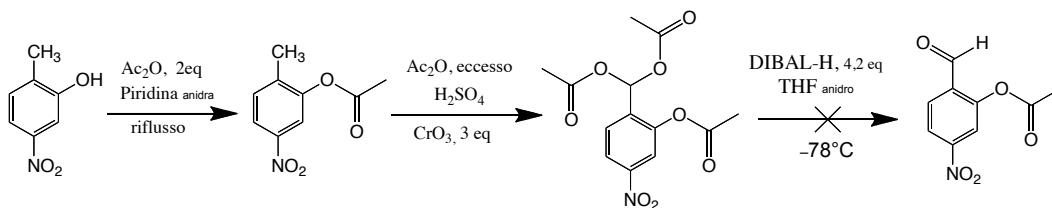


Schema 9



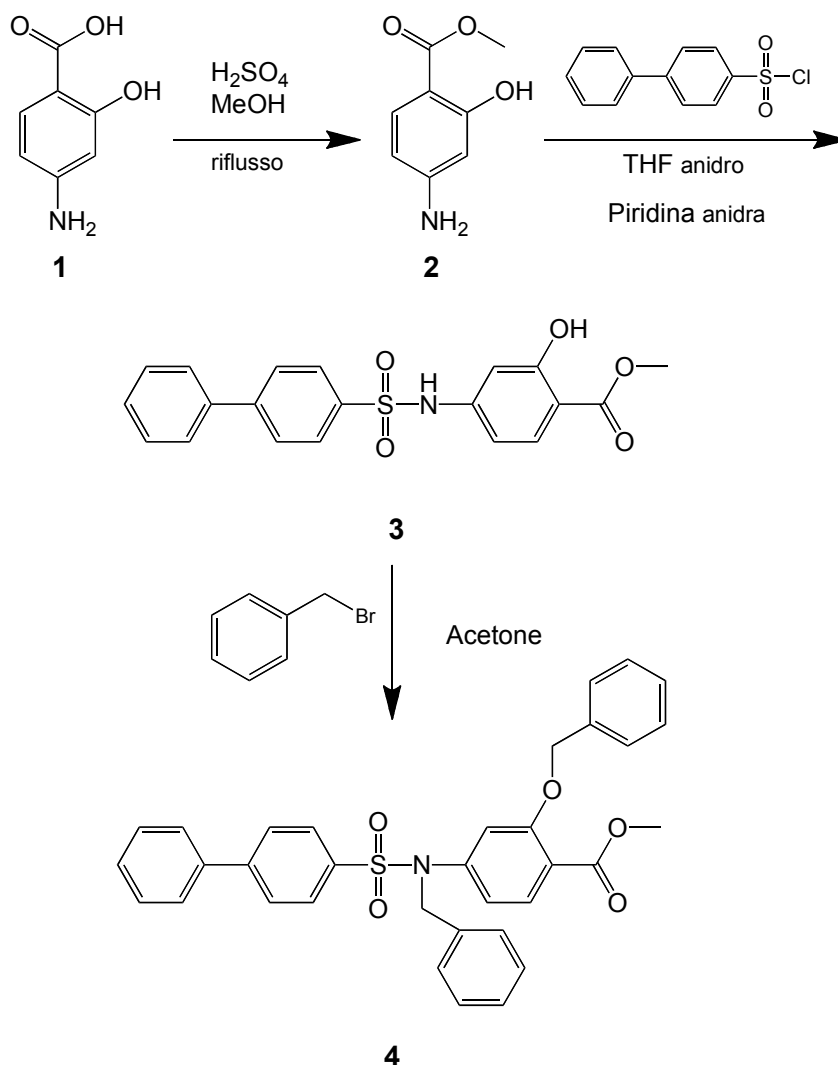
Schema 10

Ho provato, ancora, ad effettuare una potente reazione ossidativa con cromo¹²⁸ a partire dal 2-metil-5-nitrofenolo per poi ridurre il prodotto diacetilato ad aldeide, ma ancora una volta senza risultati.



Schema 11

Dati gli scarsi risultati, nonostante i molteplici tentativi, nel ridurre la funzione carbossilica o esterea e nell'introdurre un gruppo formilico in orto alla funzione ossidrilica, ho ottimizzato il processo di sintesi secondo gli schemi seguenti. L'acido *p*-amminosalicilico **1** è stato esterificato, come visto in precedenza (Schema 6), in presenza di metanolo ed acido solforico concentrato. L'estere **2** viene fatto reagire con il difenilsolfonilcloruro, in presenza di piridina, come base, e THF al fine di ottenere il composto **3** (schema 12). Quest'ultimo è stato esaurientemente benzilato, con bromuro di benzile in acetone, per dare il composto **4**.

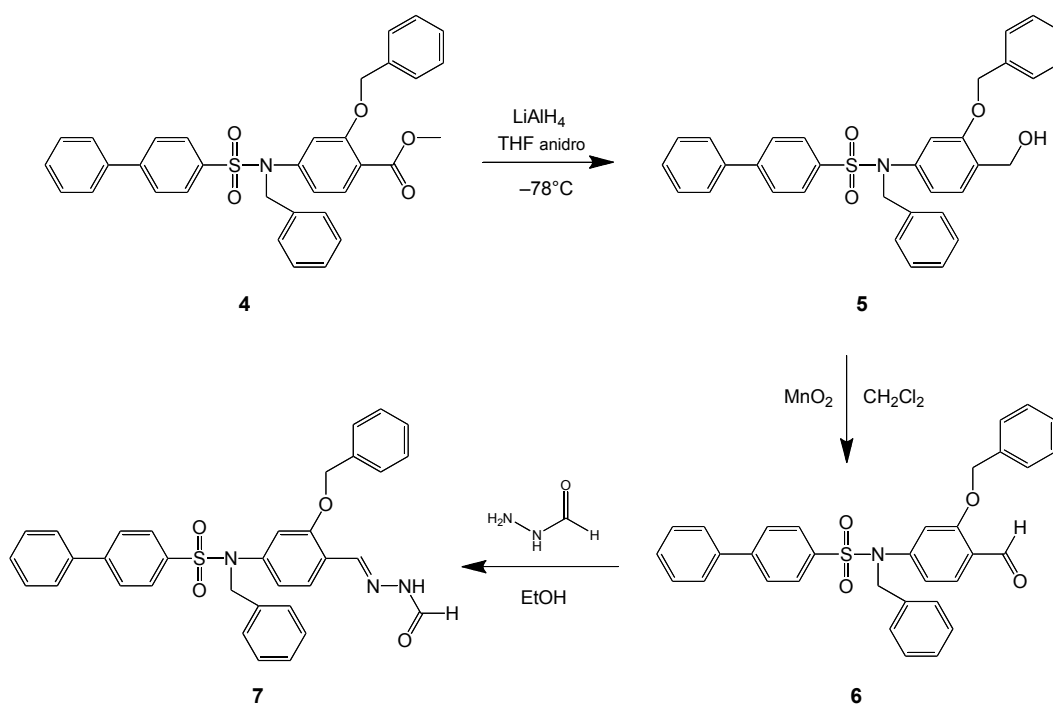


Schema 12

Il composto **4** benzilato viene trattato in diversi modi al fine di ottenere i prodotti precedentemente descritti con i diversi gruppi chelanti lo zinco.

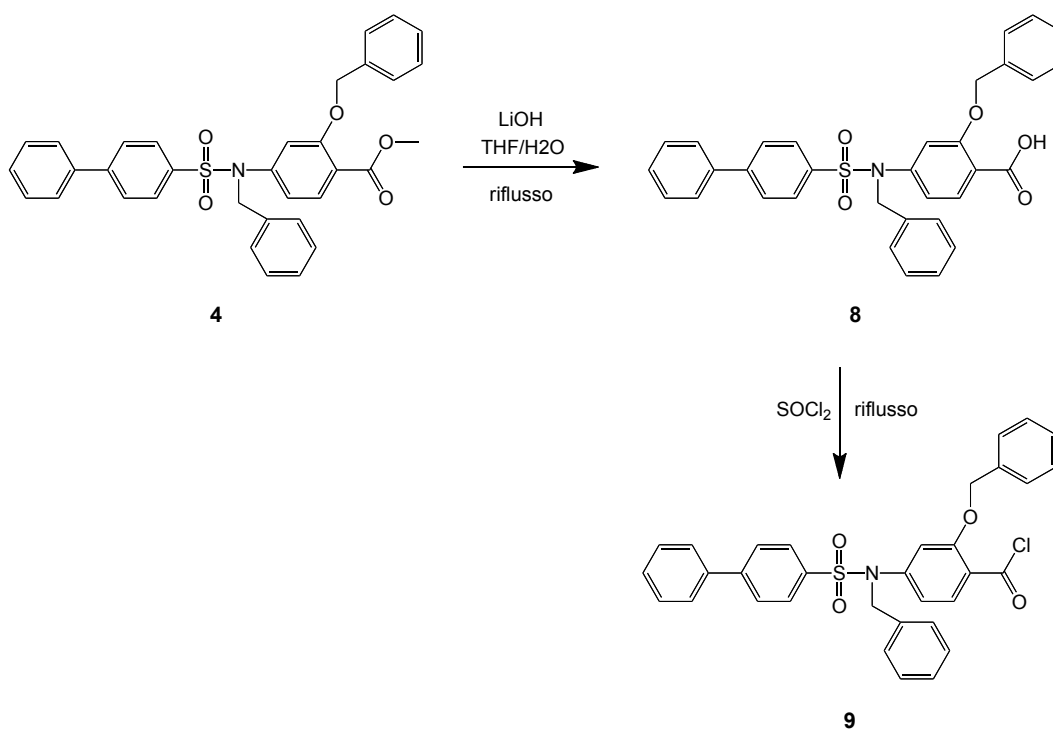
L'estere **4** viene ridotto al alcol in presenza di LiAlH_4 in THF a -78°C per ottenere il composto **5** (Schema 13), che viene successivamente ossidato ad aldeide con MnO_2 in CH_2Cl_2 generando l'aldeide **6**. L'aldeide è stata fatta reagire con formilidrazina in etanolo a refluxo per ottenere il semicarbazone **7**. L'alta temperatura, oltre a favorire la reazione, è necessaria per migliorare la solubilità del composto **6** in EtOH. Infine, in presenza di Pd/C ed

acetato di etile anidro, ho effettuato la reazione di debenzilazione. Il prodotto ottenuto è il composto **8**, che, a differenza delle aspettative, si presenta debenzilato solo all'ossigeno fenolico.

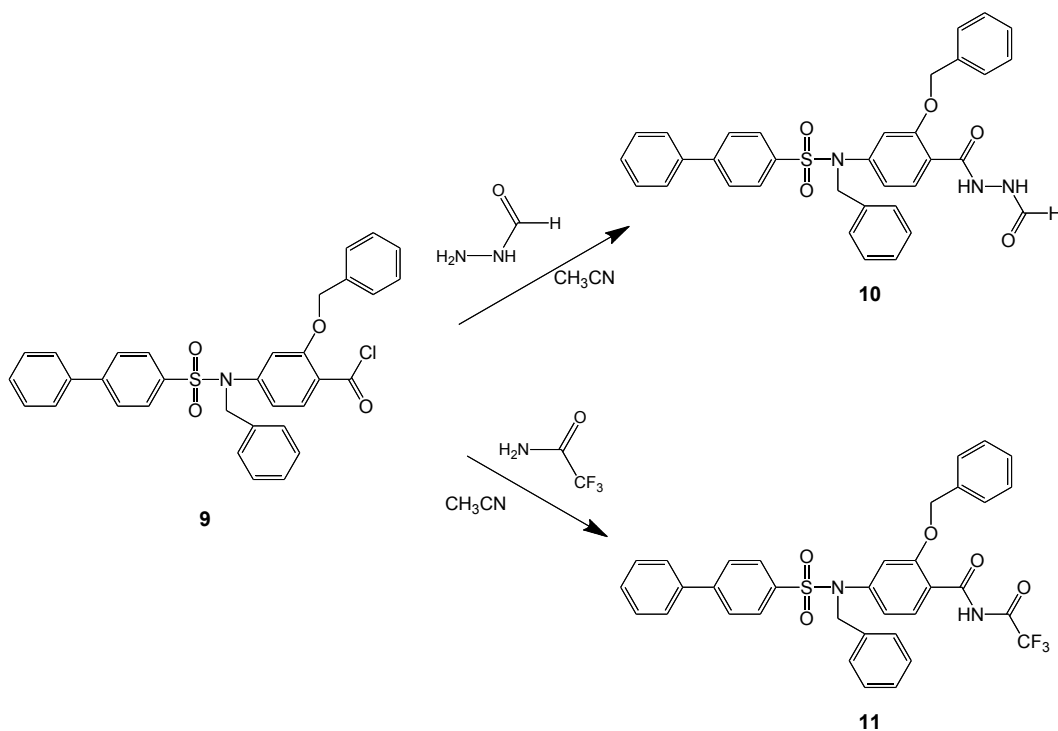


Schema 13

L'estere **4** viene idrolizzato in presenza di LiOH idrato in una miscela di THF/ H_2O in rapporto 1:1 e ad alte temperature per ottenere l'acido **8** (Schema 14). Il prodotto **8** viene, dunque, convertito nel corrispondente cloruro acilico mediante reazione con cloruro di tionile a refluxo, formando il composto **9**.

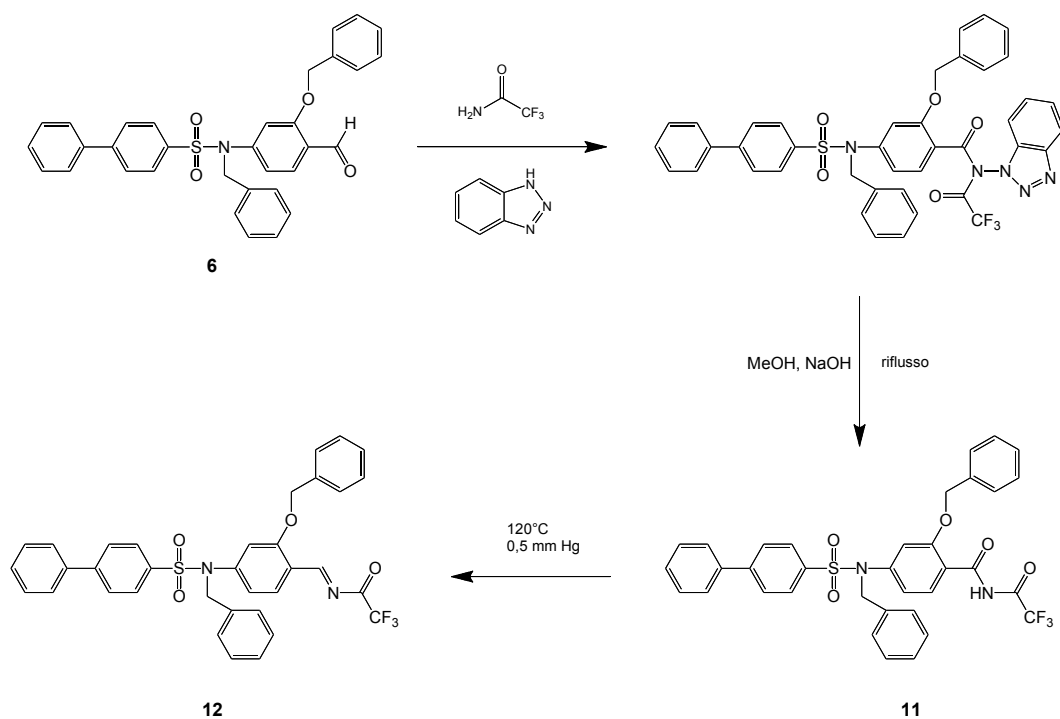
**Schema 14**

Il cloruro **9** viene trattato sia con formilidrazina sia con trifluoracetamide in acetonitrile per formare, tramite reazioni di sostituzione nucleofila, i composti **10** e **12** (Schema 15).

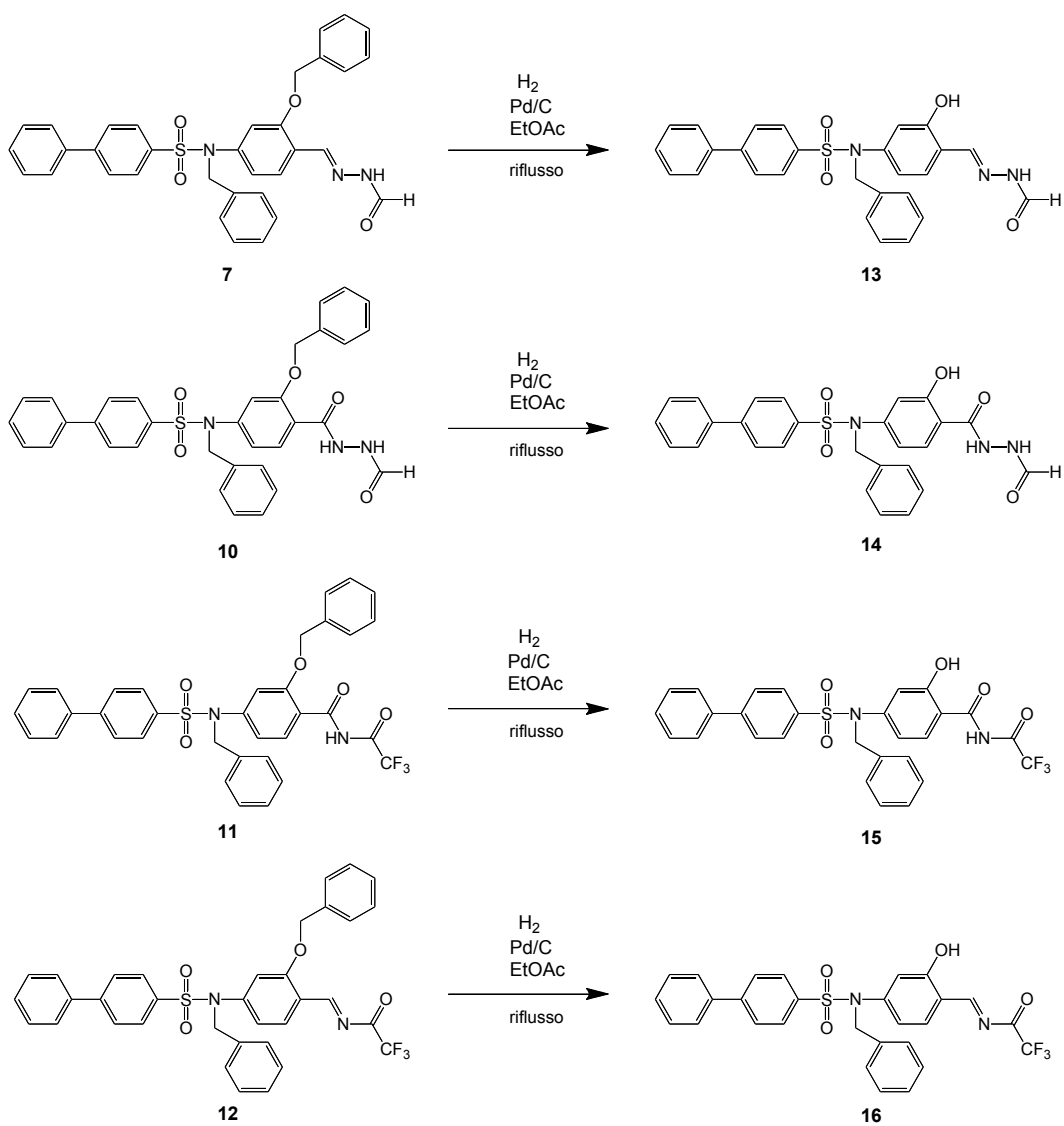


Schema 15

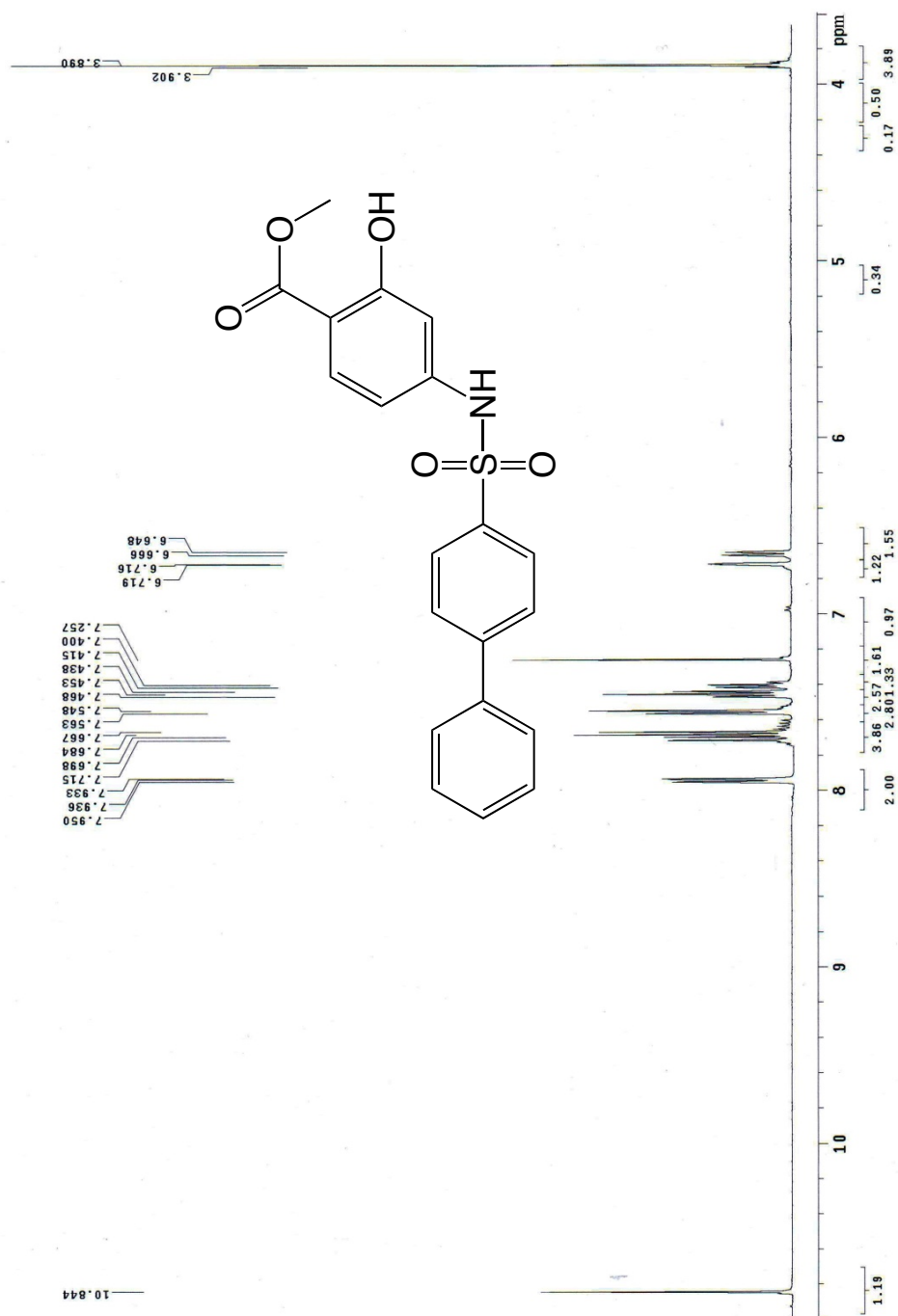
L'aldeide **6** viene fatta reagire con la trifluoroacetammide in presenza di benzotriazolo, per formare un intermedio che, in presenza di metanolo e metossido di sodio, viene convertito nel prodotto **12** (metodo di Katritzky).¹²⁹ Il composto **12**, in particolari condizioni di temperatura e pressione, forma il prodotto **13** (Schema 16).

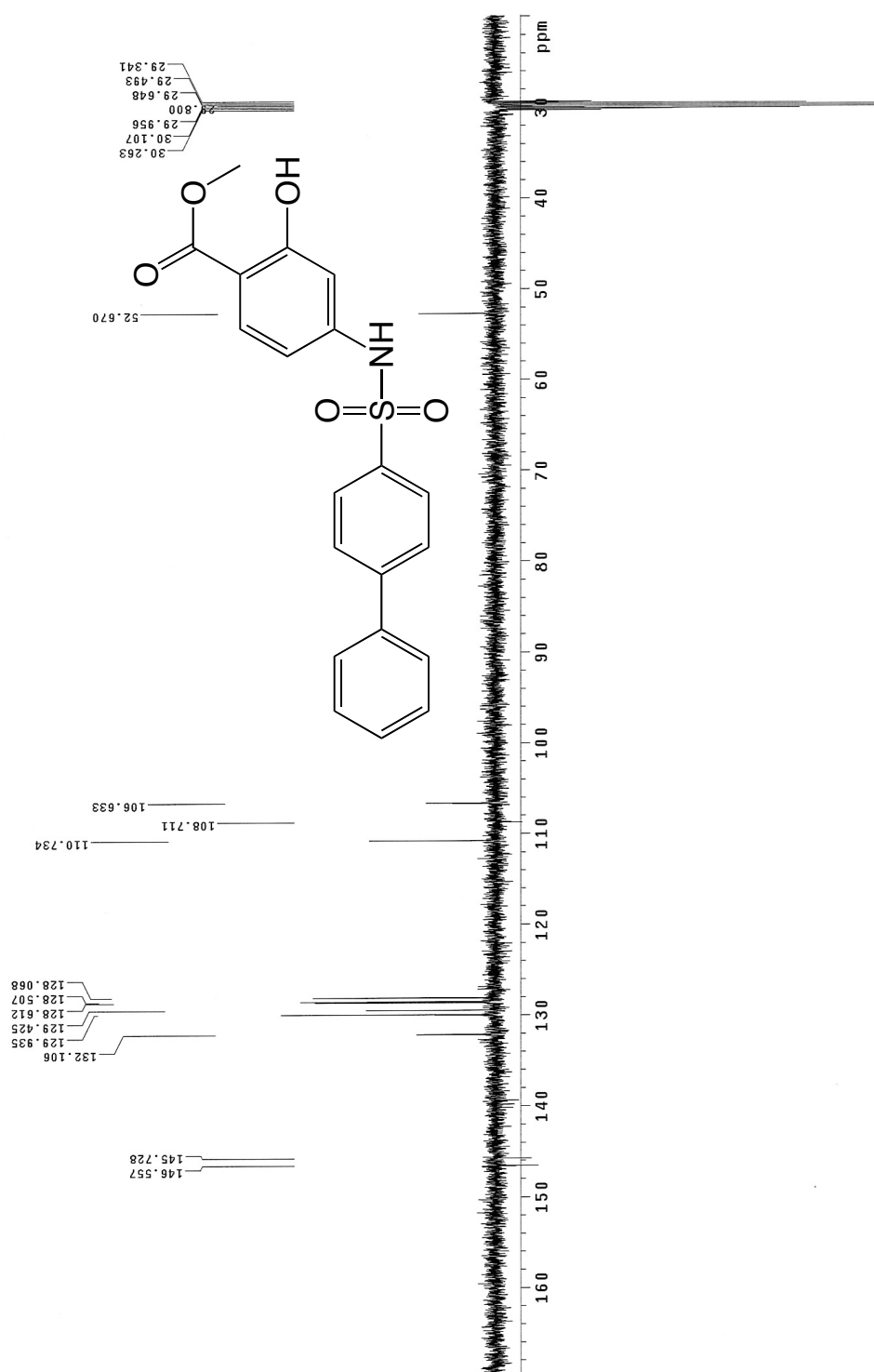
**Schema 16**

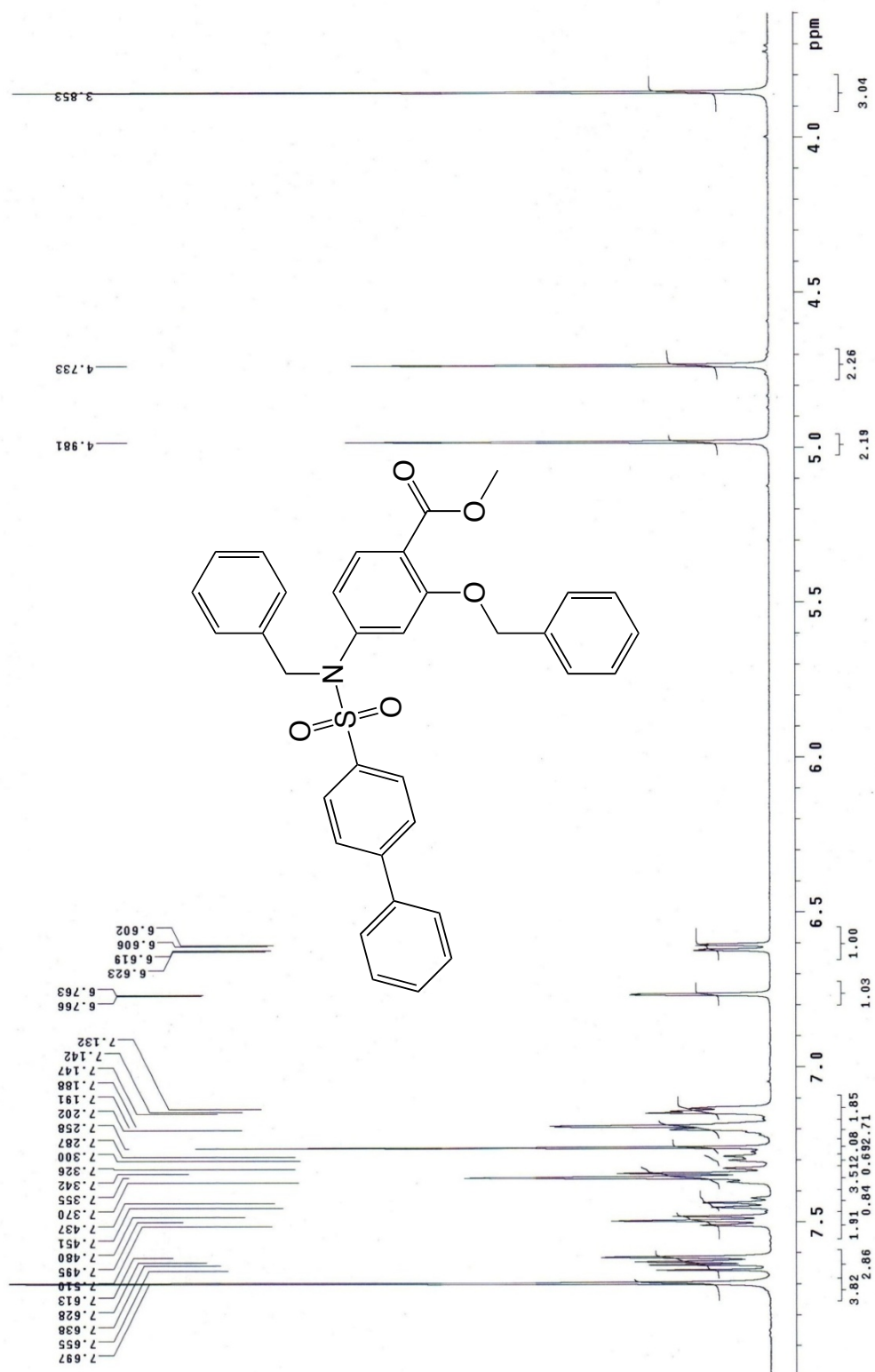
Gli schemi sintetici terminano con la debenzilazione, tramite idrogenazione, delle funzioni alcoliche, con l'ottenimento dei prodotti **13–16** (Schema 17).

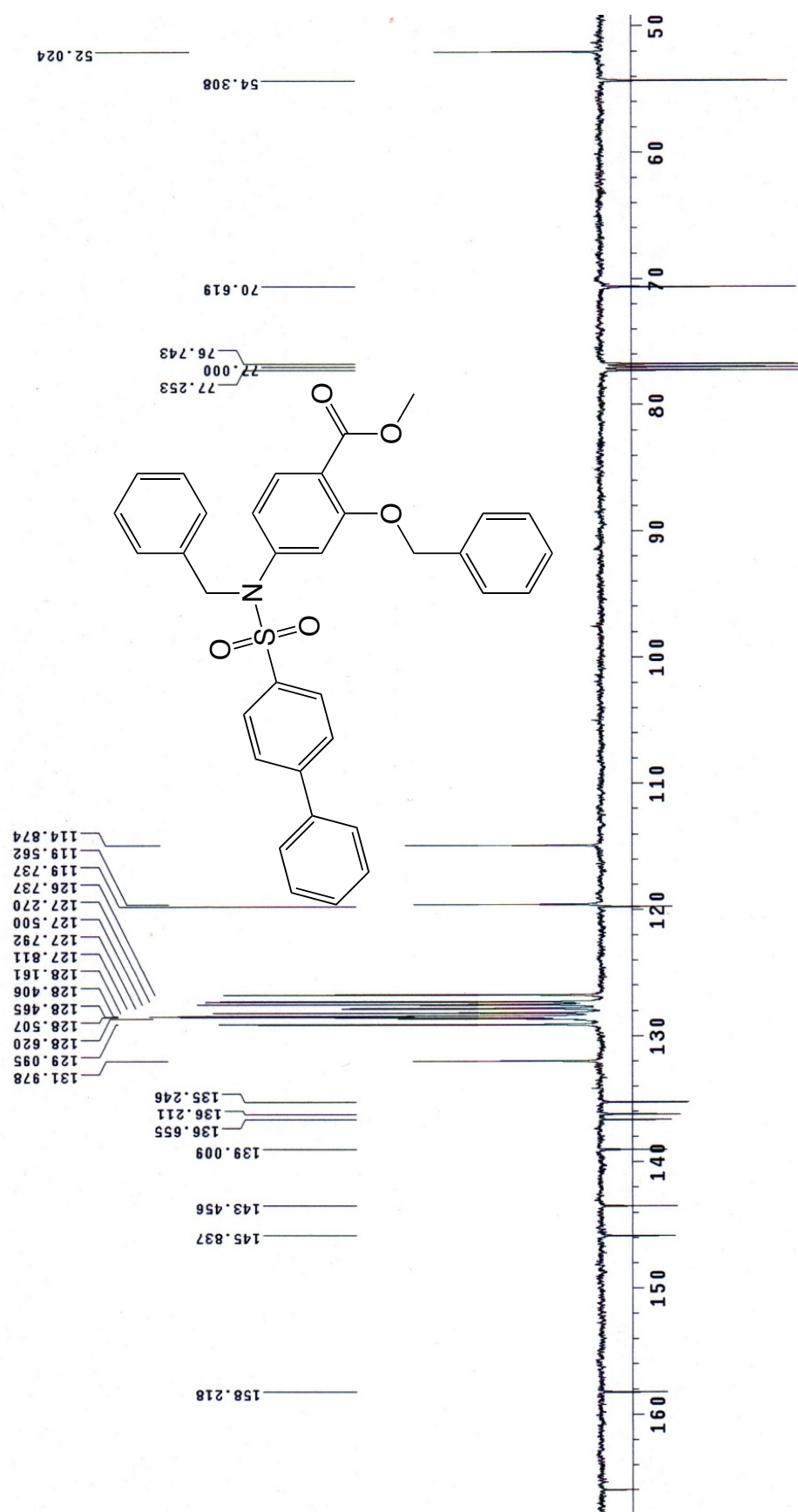


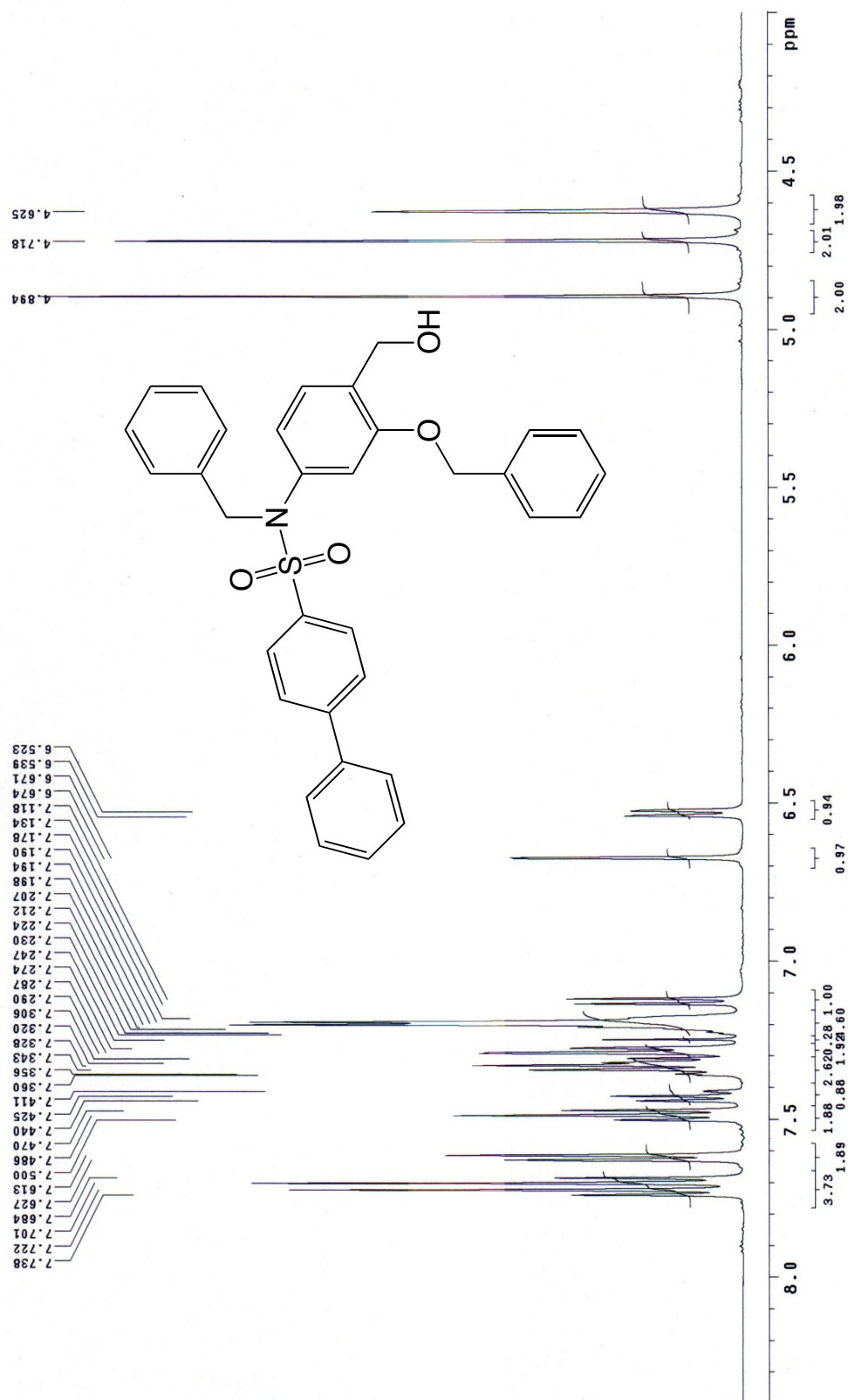
Schema 17

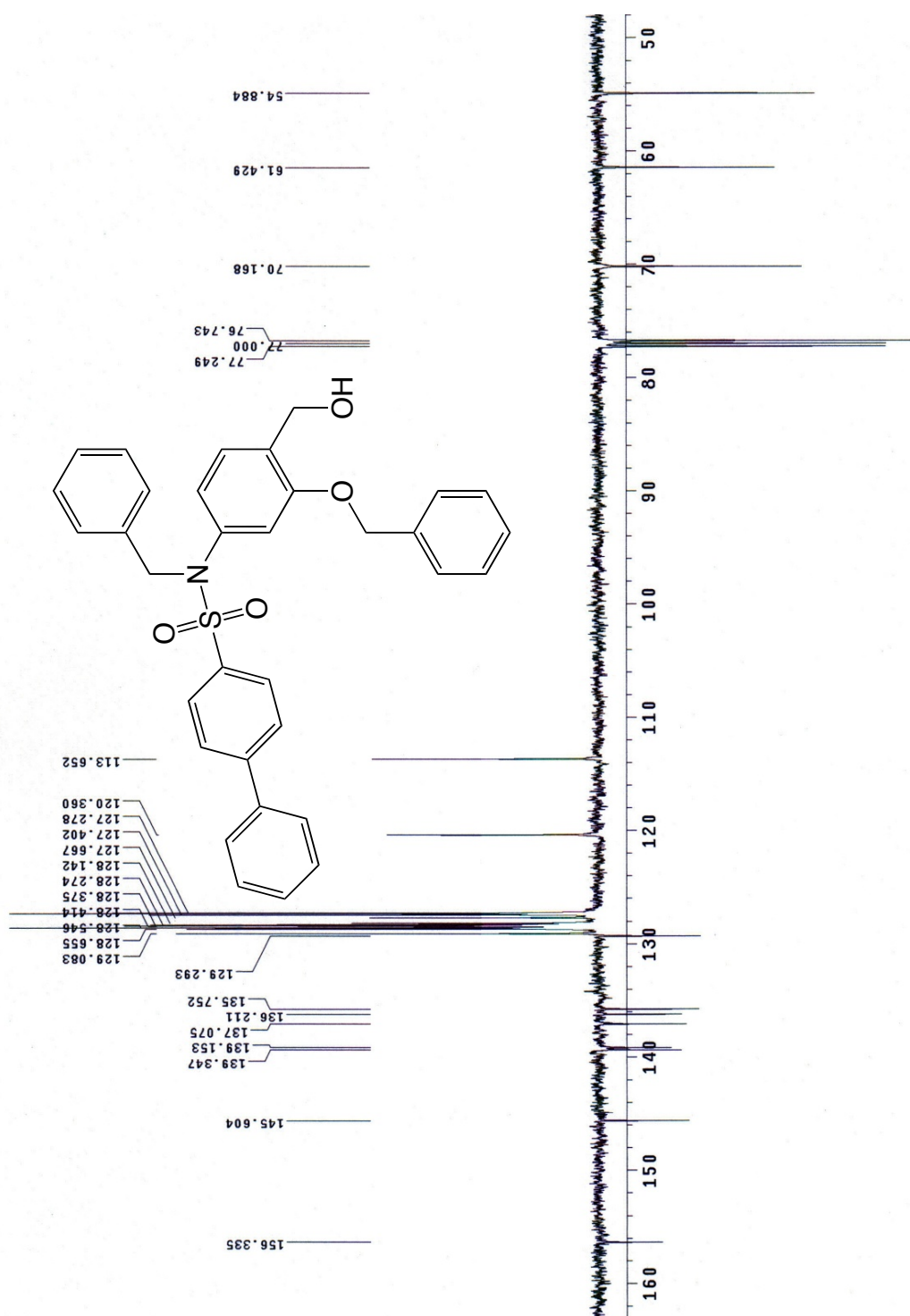
Spettro ^1H NMR del composto **3**

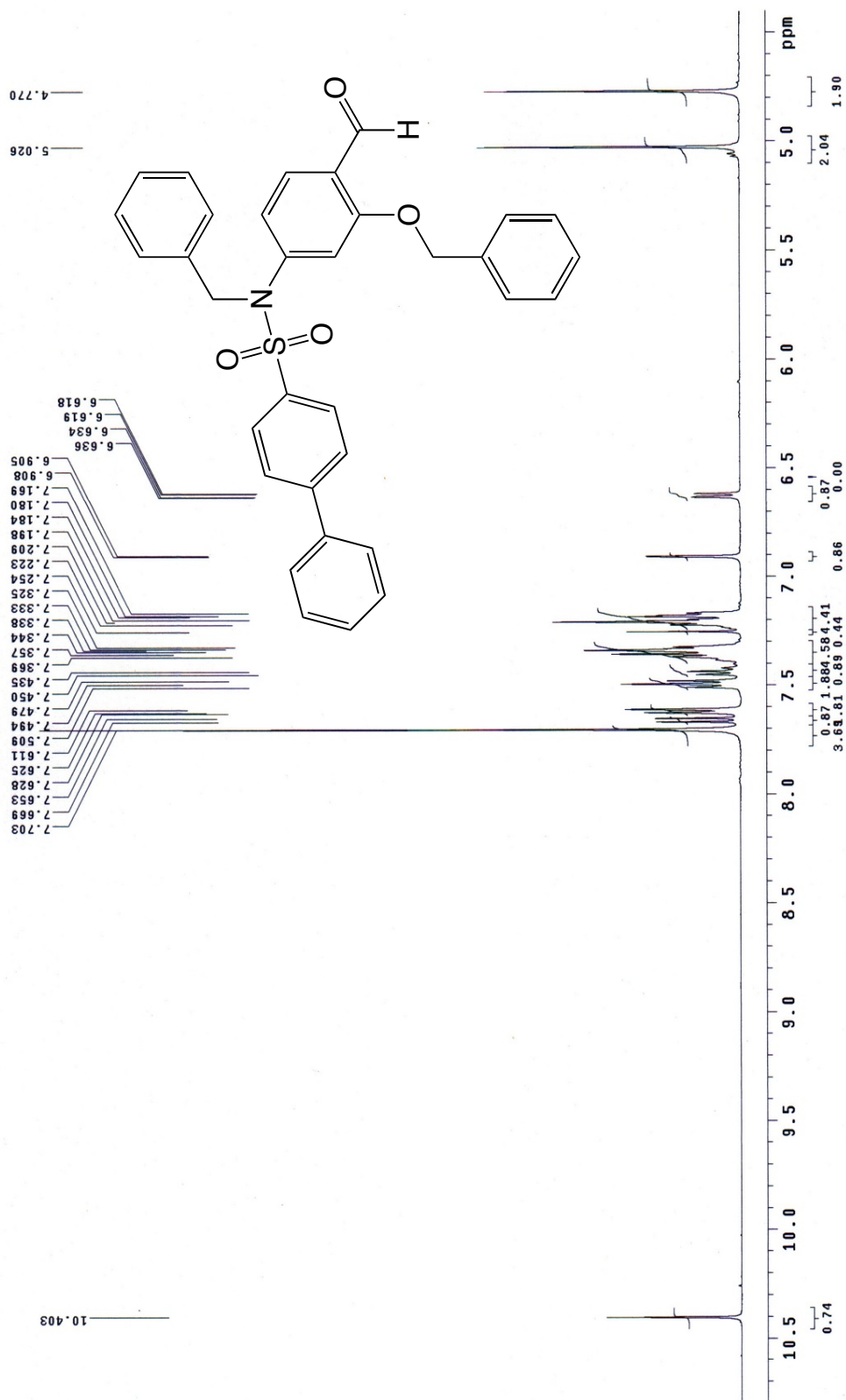
Spettro ^{13}C NMR del composto 3

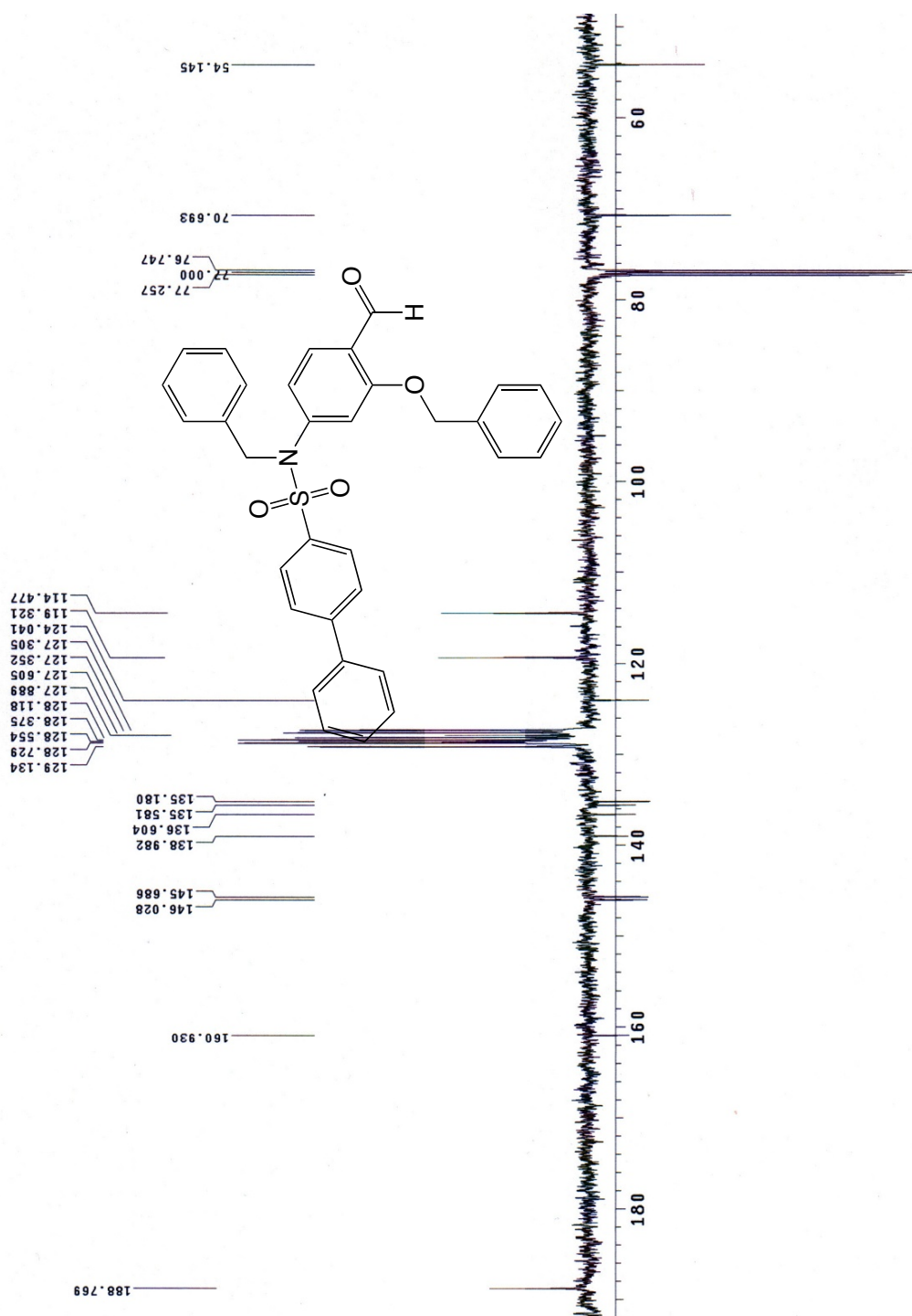
Spettro ^1H NMR del composto 4

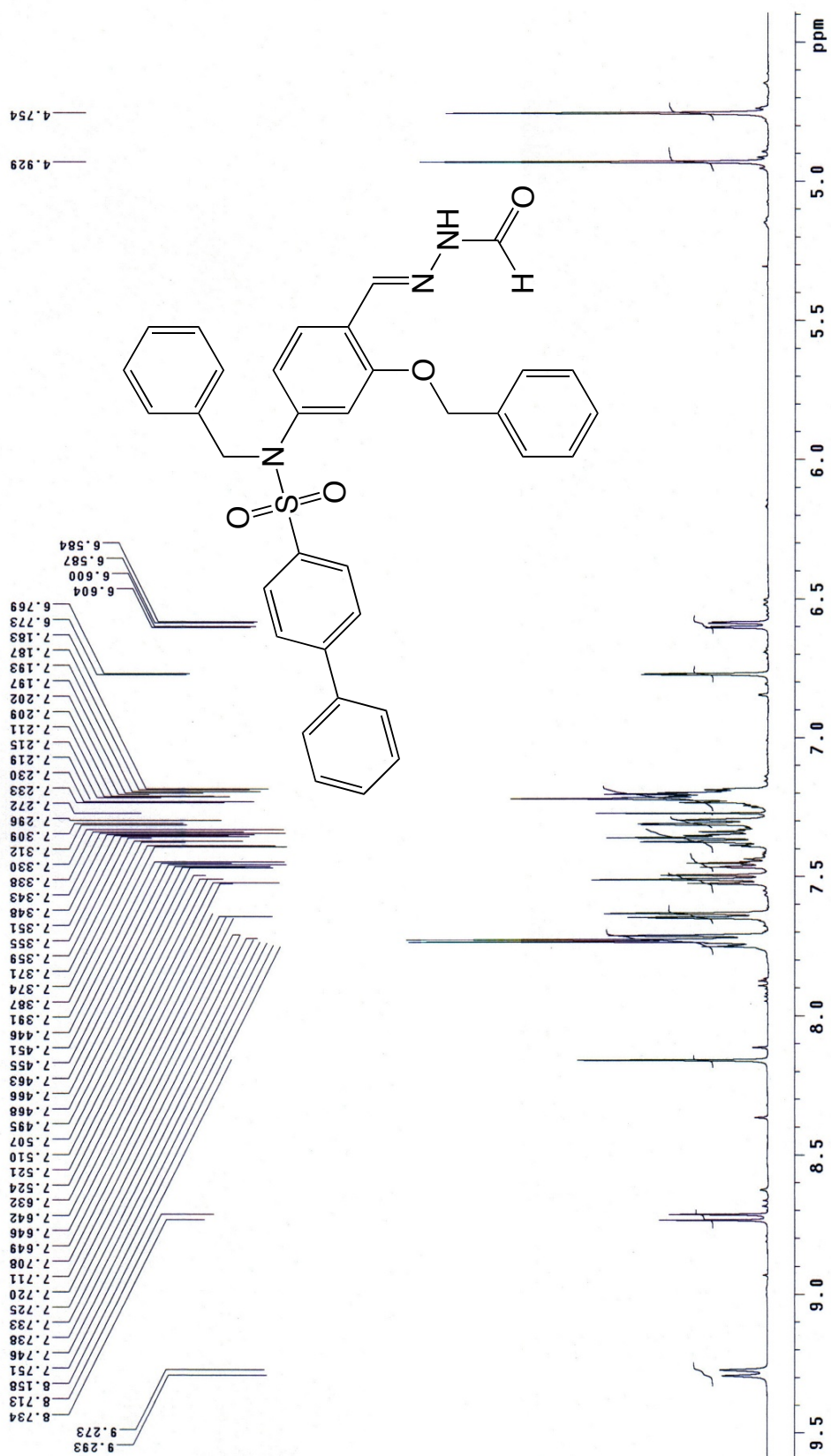
Spettro ^{13}C NMR del composto 4

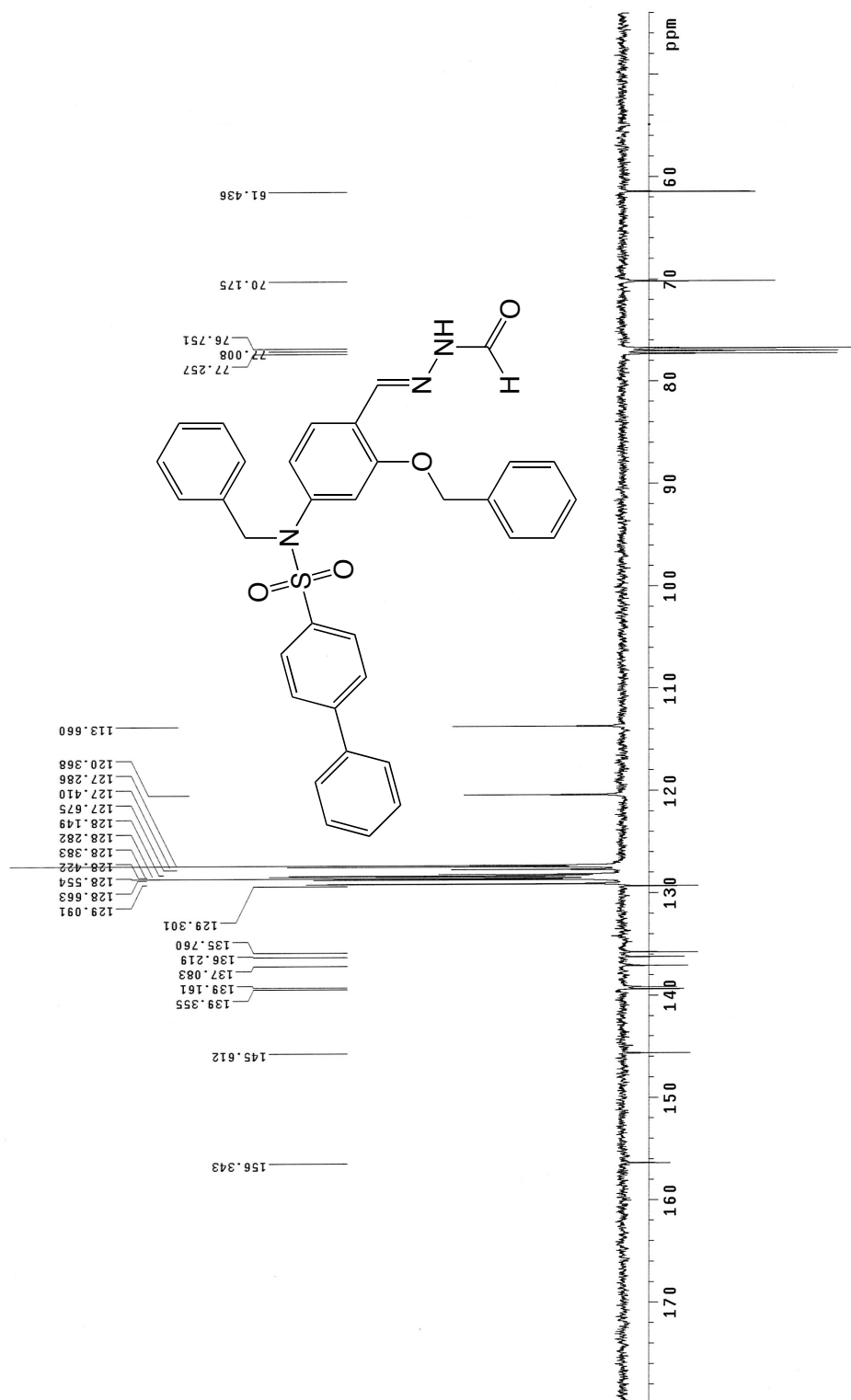
Spettro ^1H NMR del composto **5**

Spettro ^{13}C NMR del composto **5**

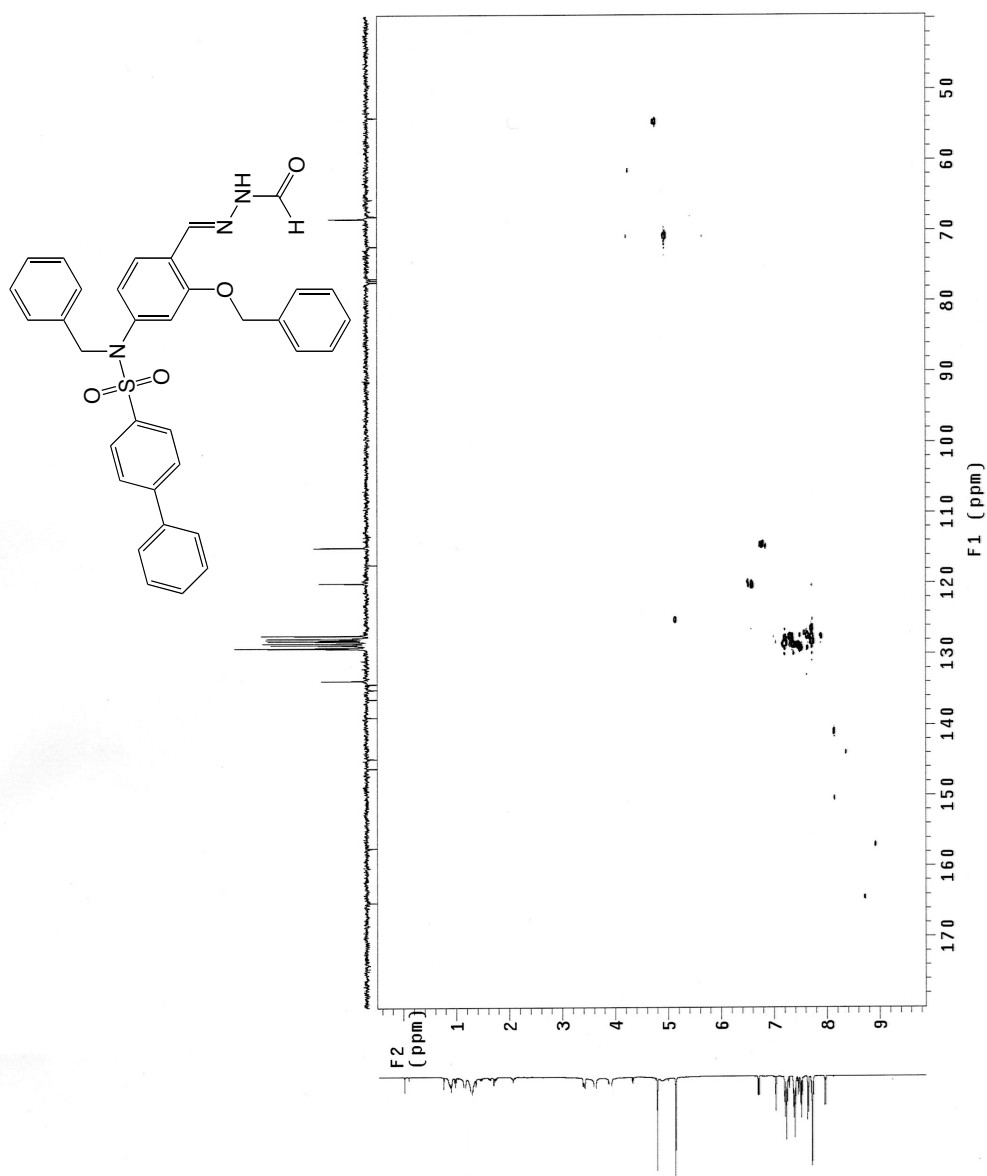
Spettro ^1H NMR del composto **6**

Spettro ^{13}C NMR del composto 6

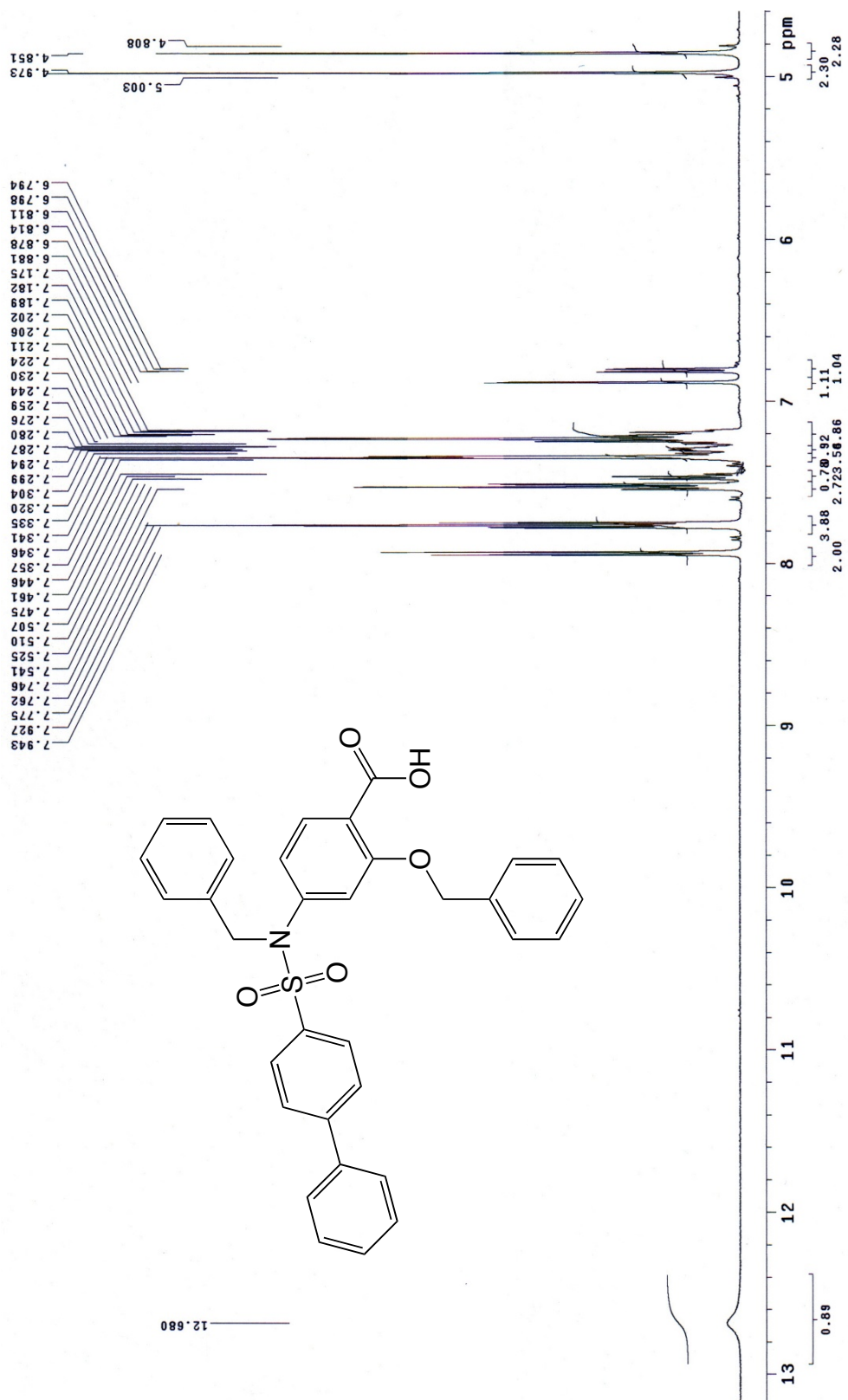
Spettro ^1H NMR del composto 7

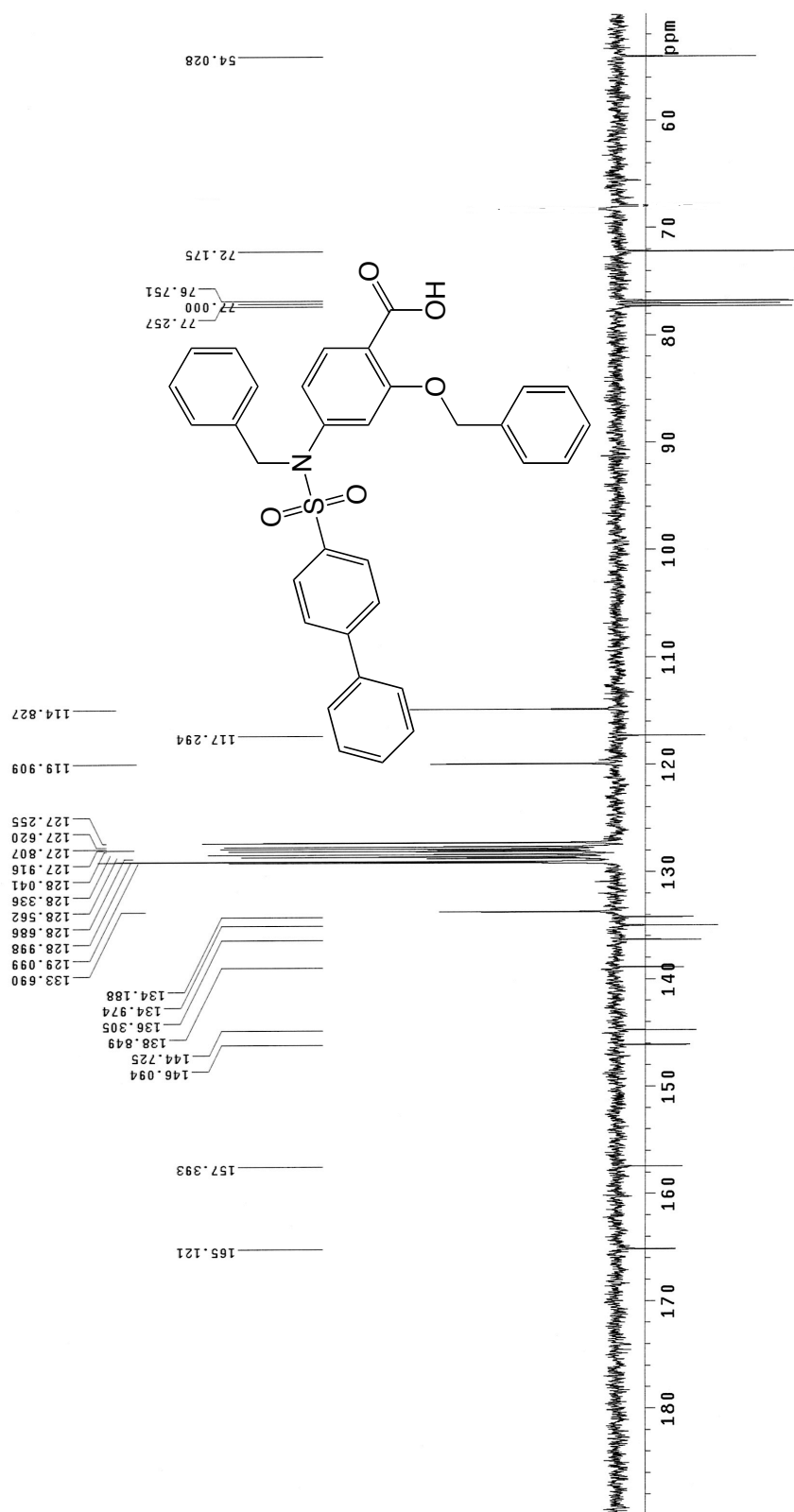
Spettro ^{13}C NMR del composto 7

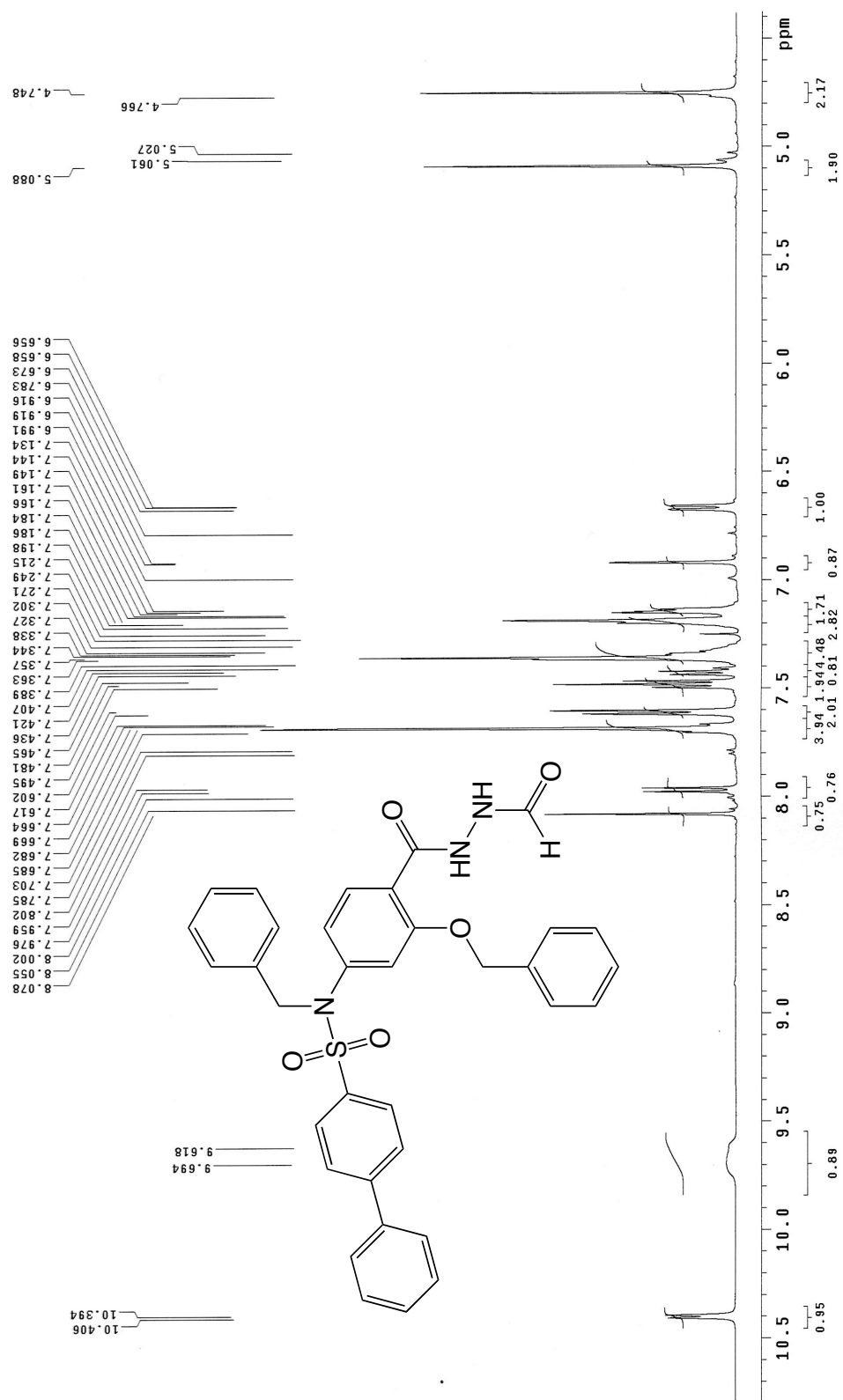
Spettro HSQC NMR del composto 7



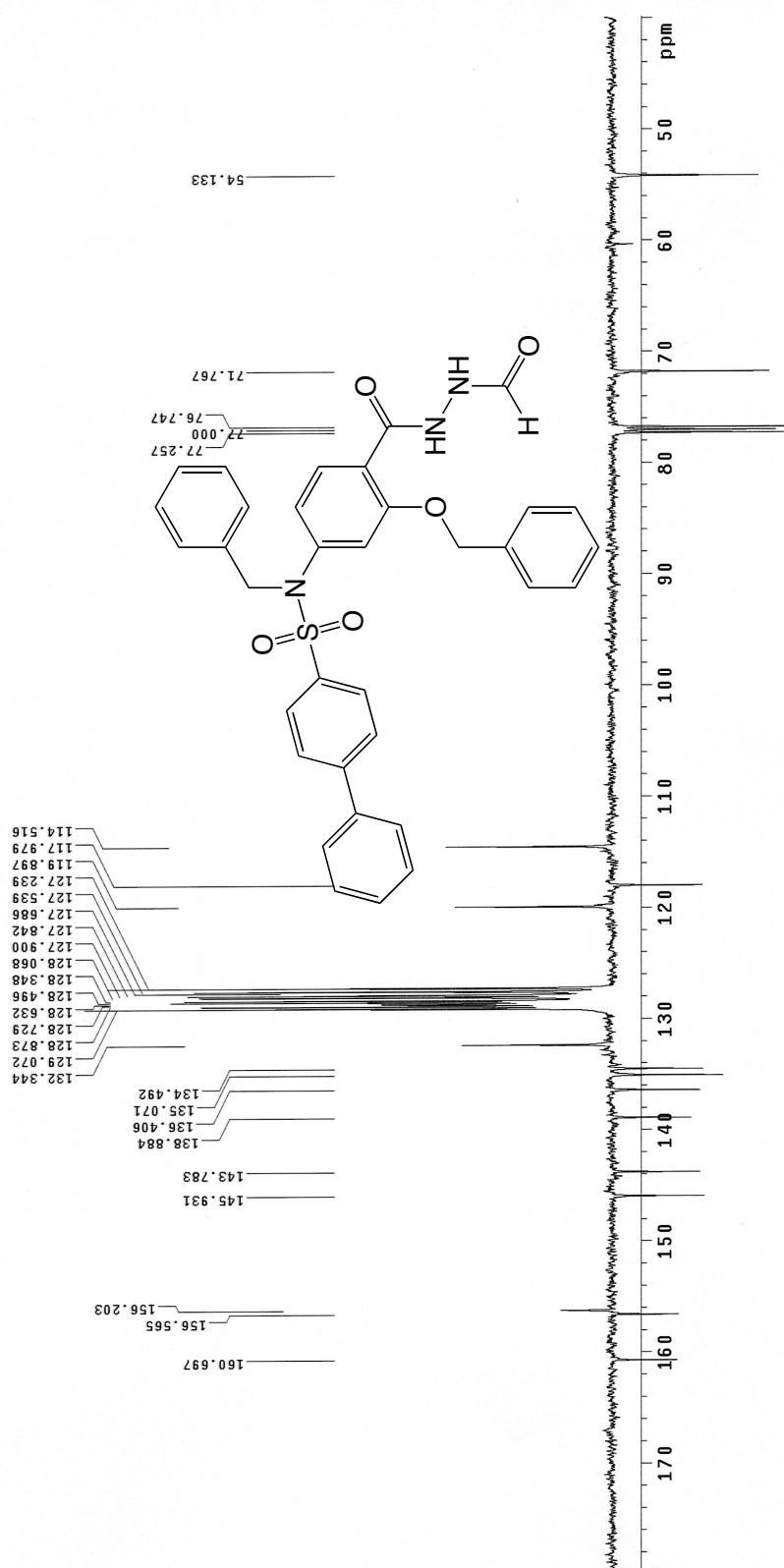
Spettro ^1H NMR del composto **8**

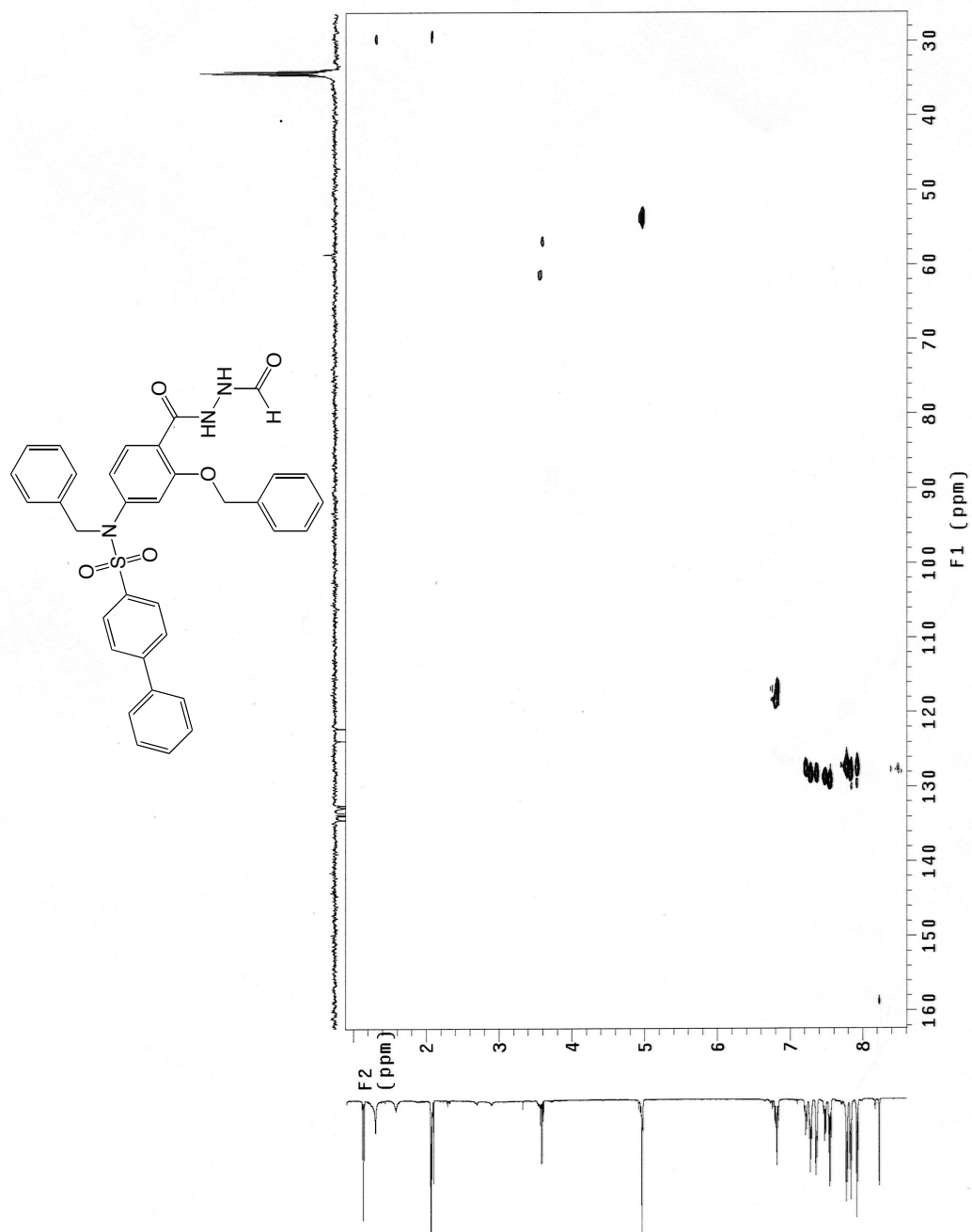


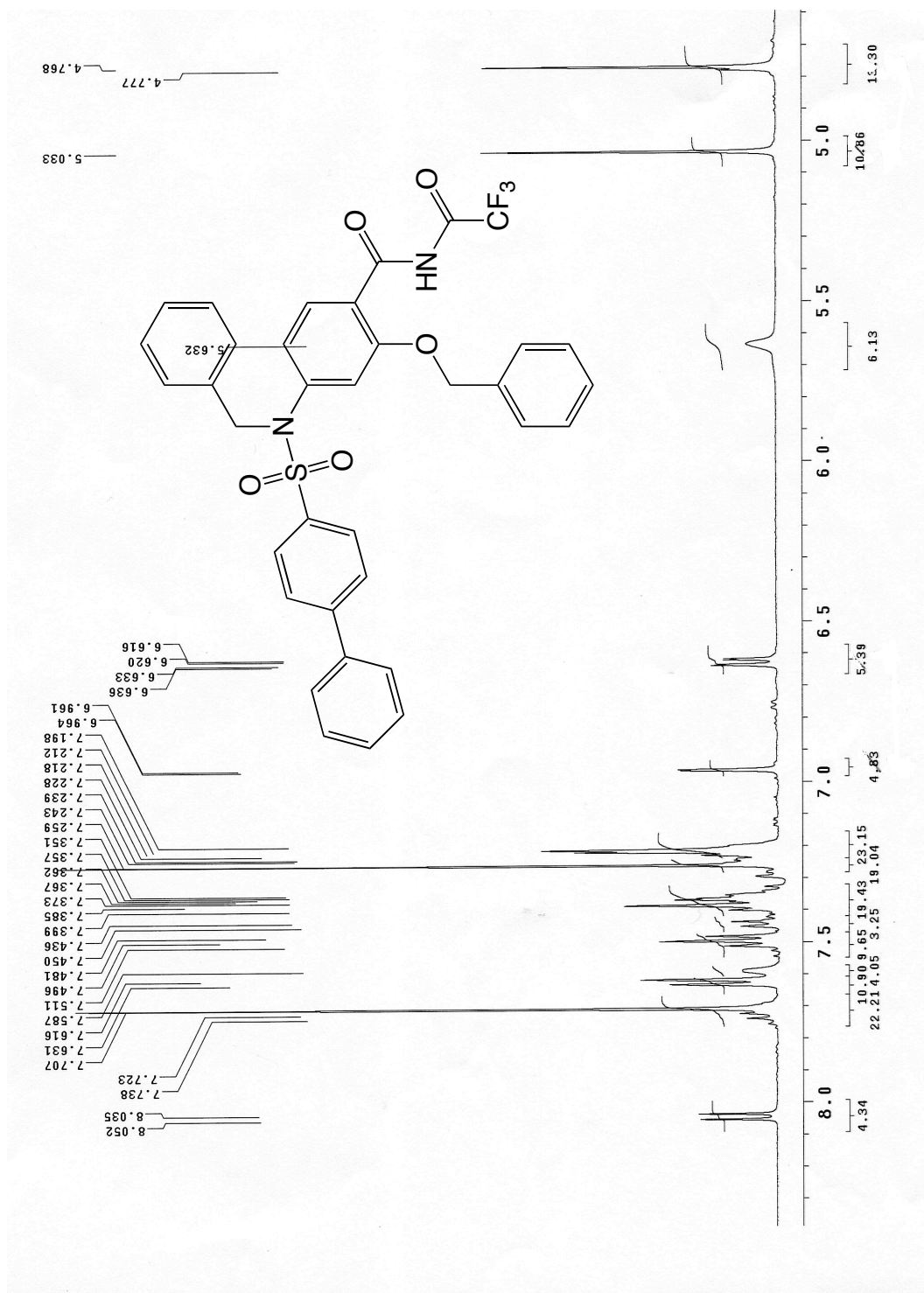
Spettro ^{13}C NMR del composto **8**

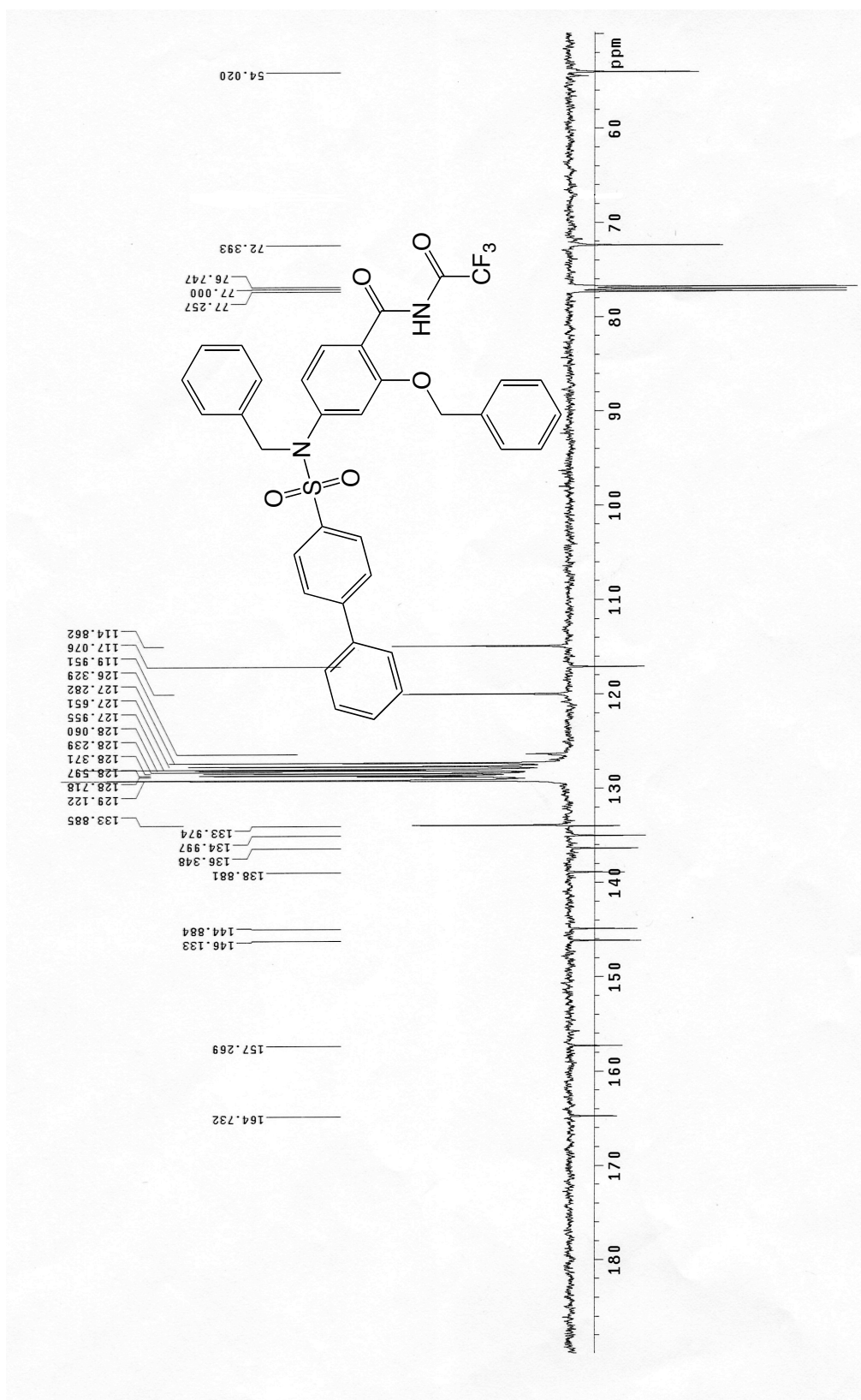
Spettro ^1H NMR del composto **10**

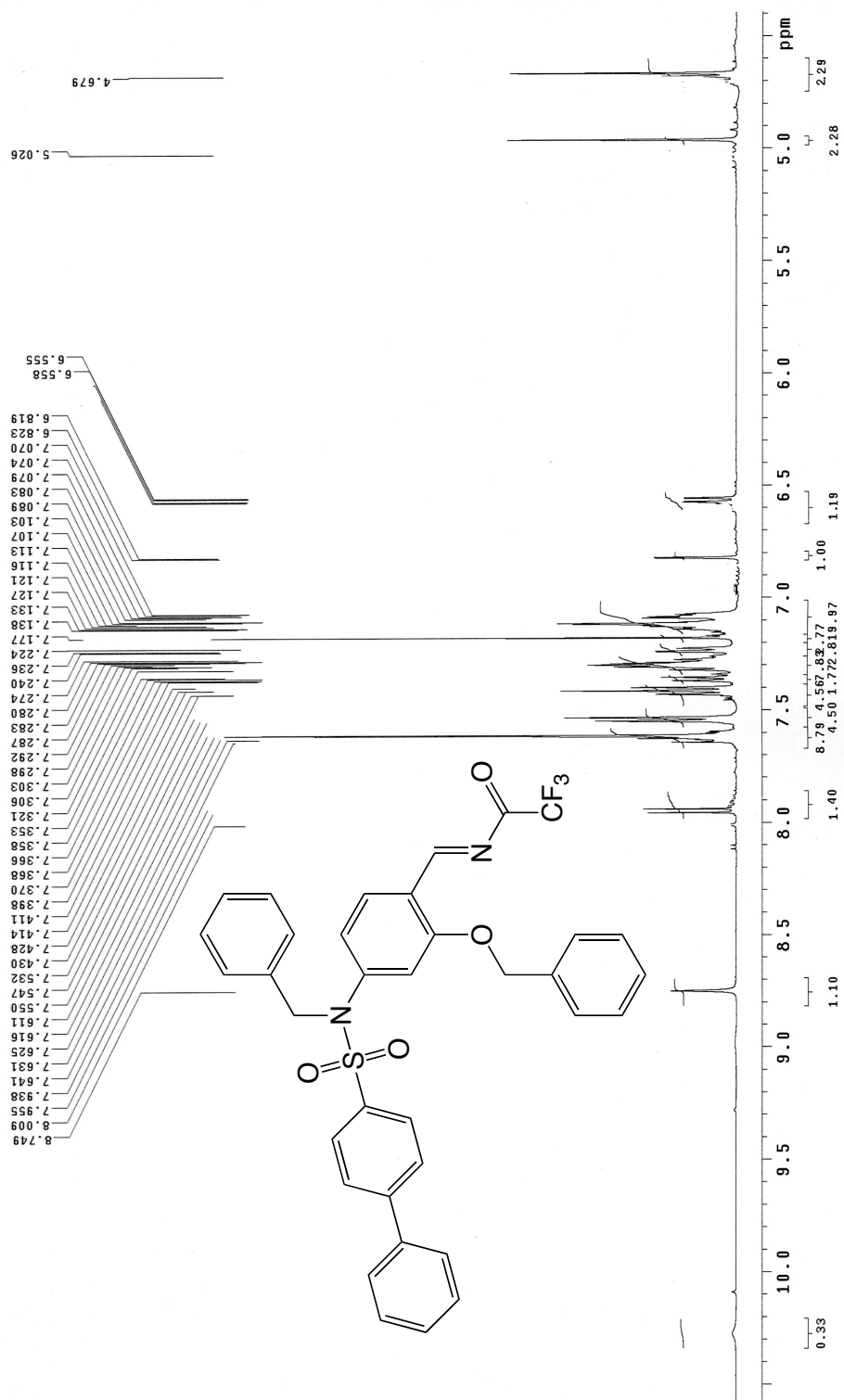
Spettro ^{13}C NMR del composto **10**

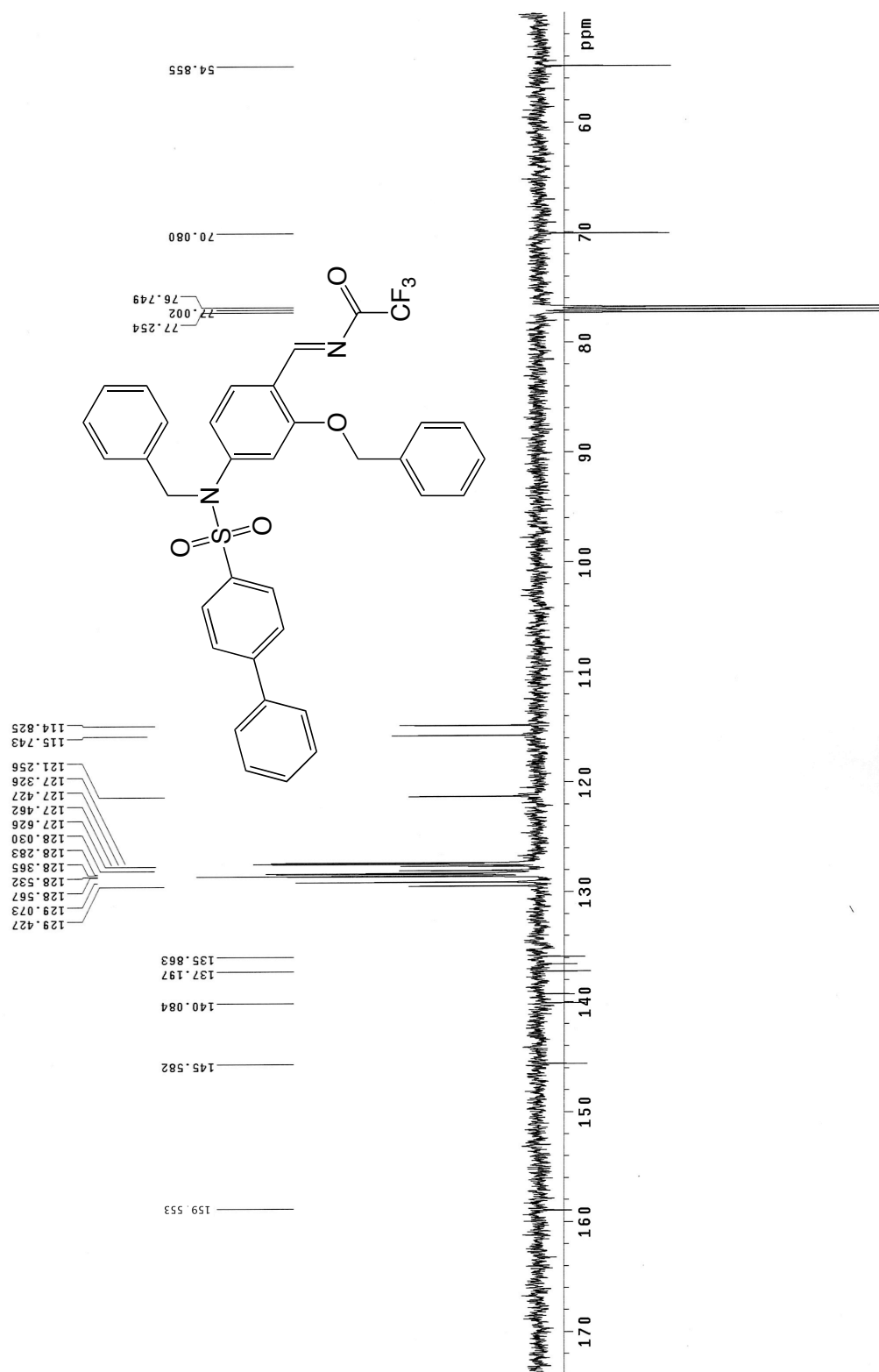


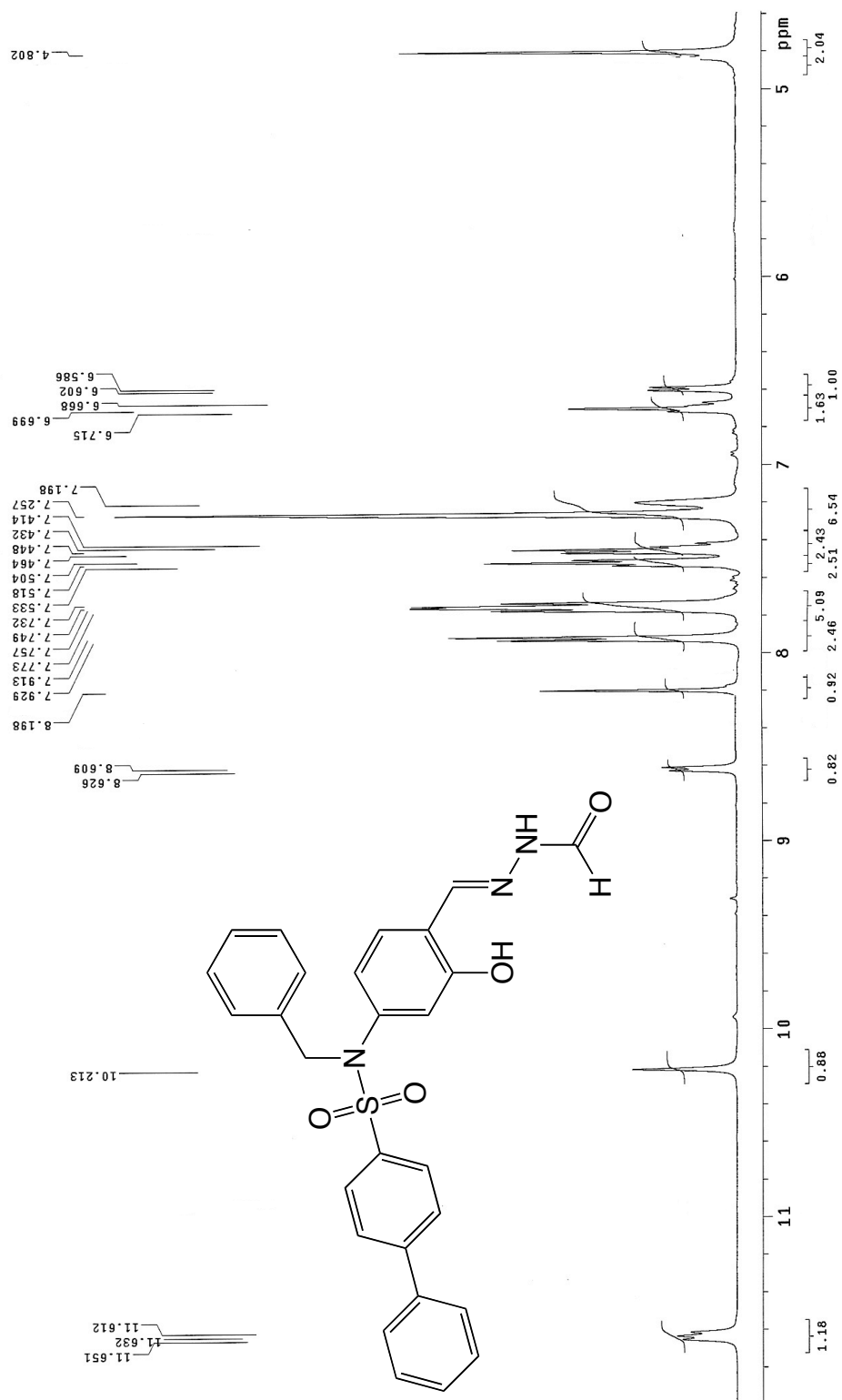
Spettro HSQC NMR del composto **10**

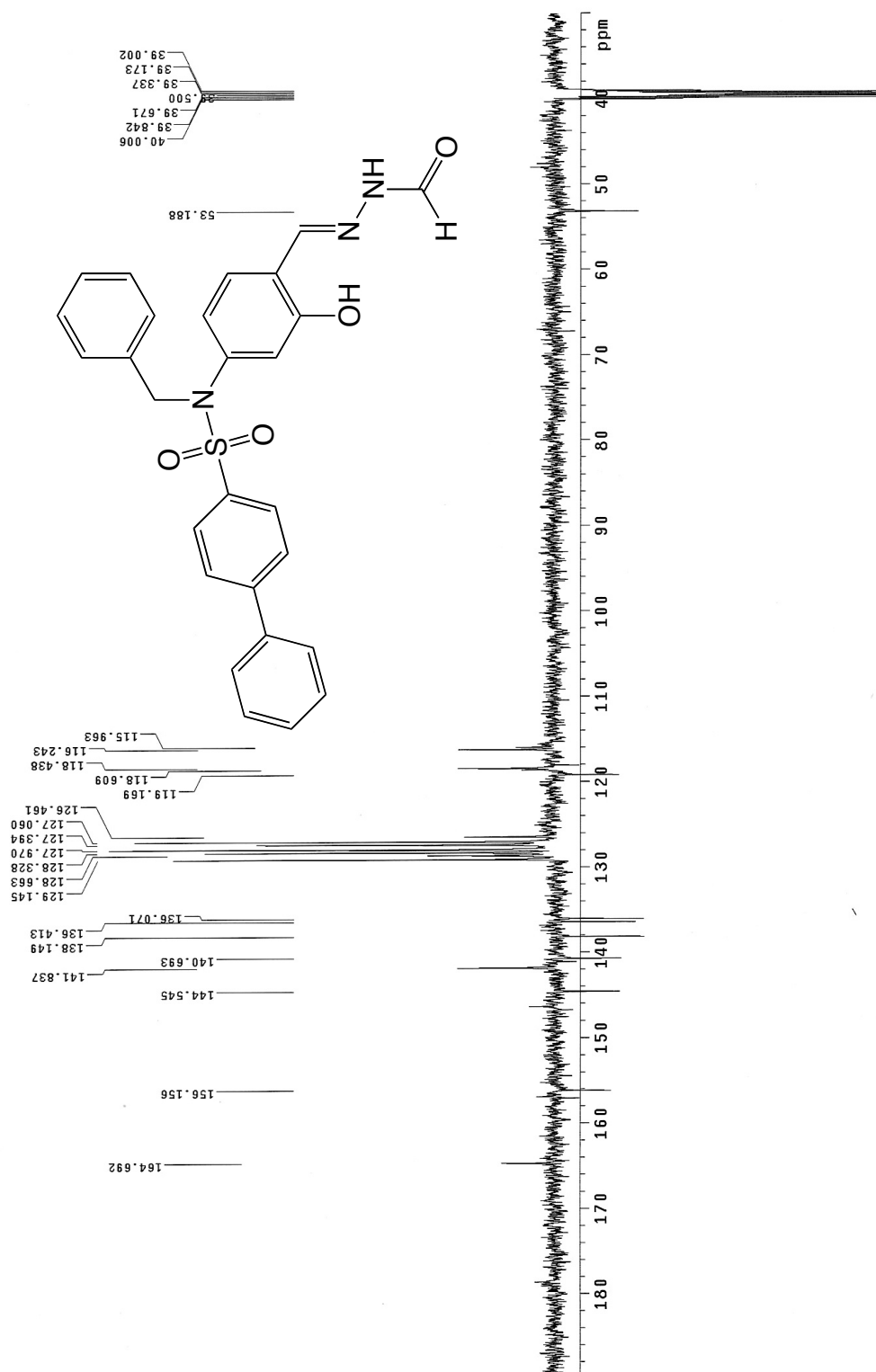
Spettro ^1H NMR del composto **11**

Spettro ^{13}C NMR del composto **11**

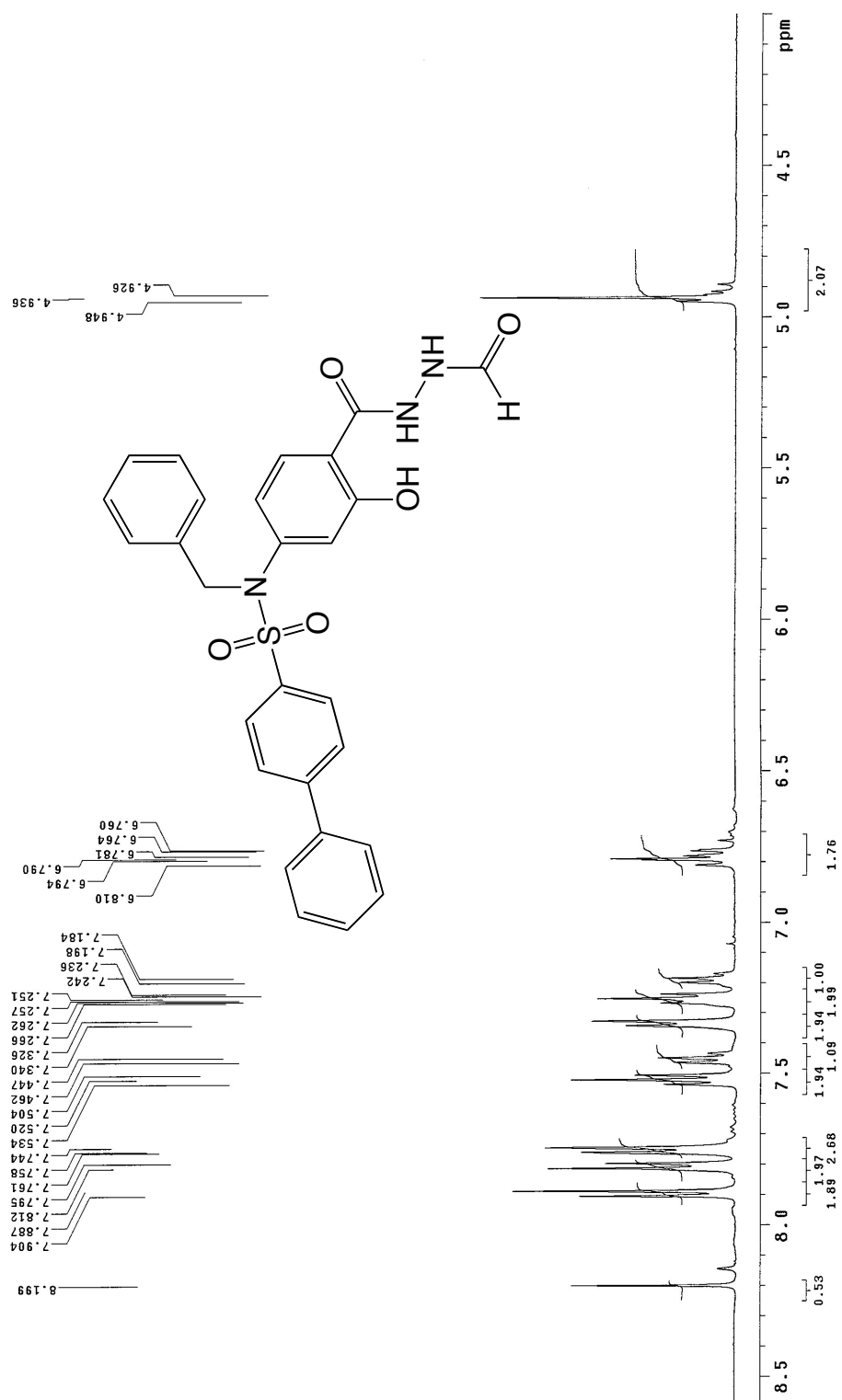
Spettro ^1H NMR del composto **12**

Spettro ^{13}C NMR del composto **12**

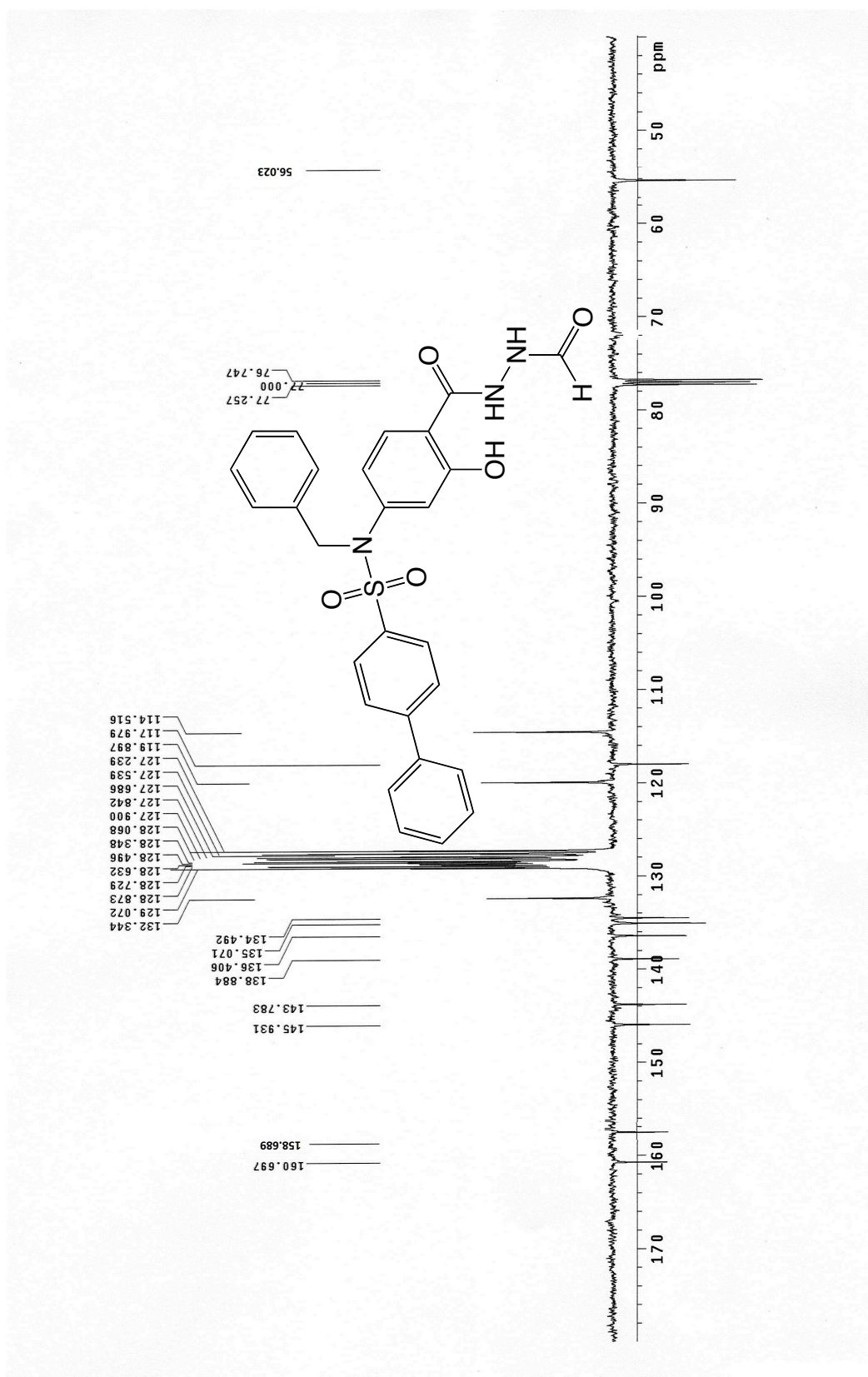
Spettro ^1H NMR del composto **13**

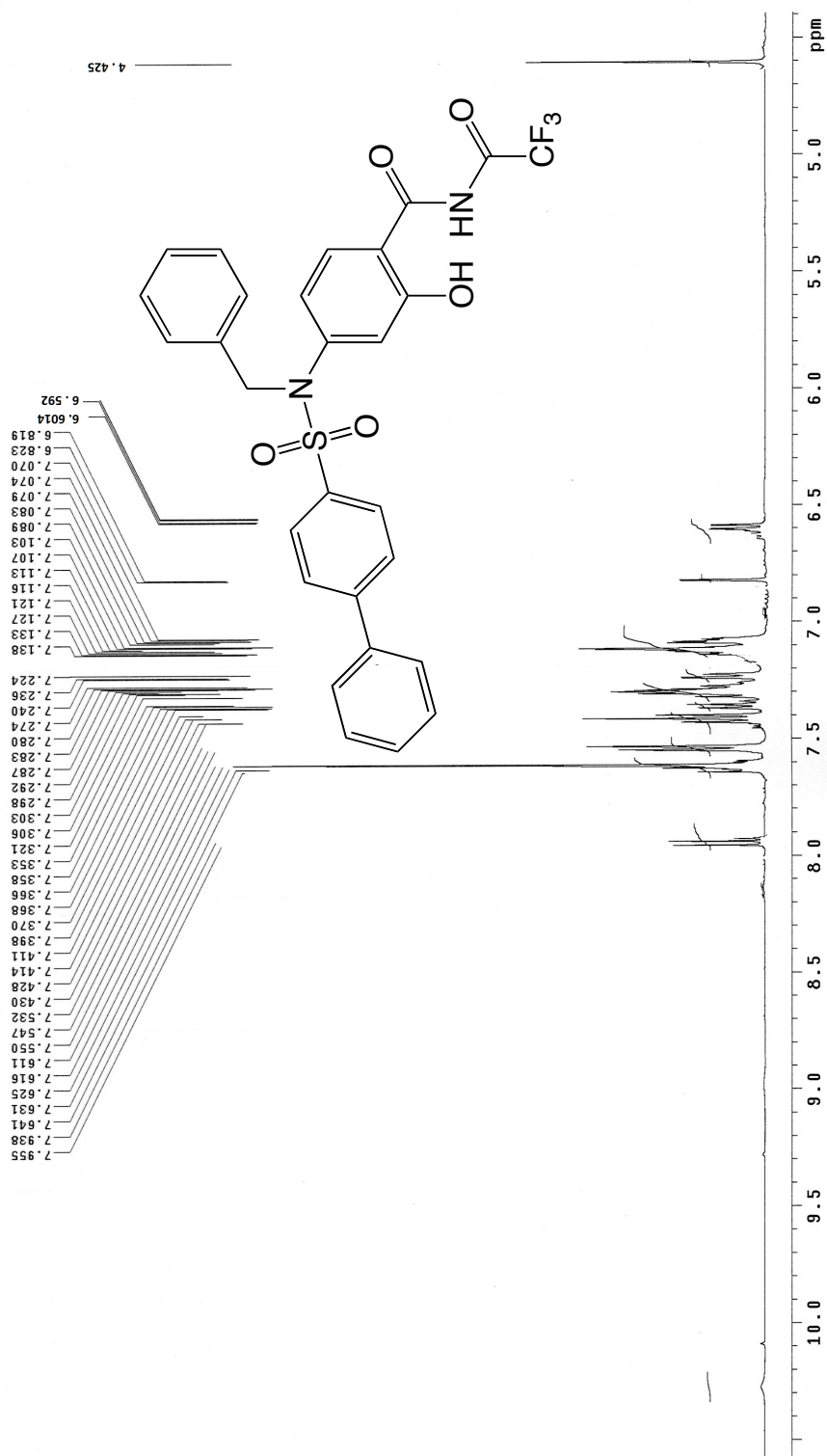
Spettro ^{13}C NMR del composto 13

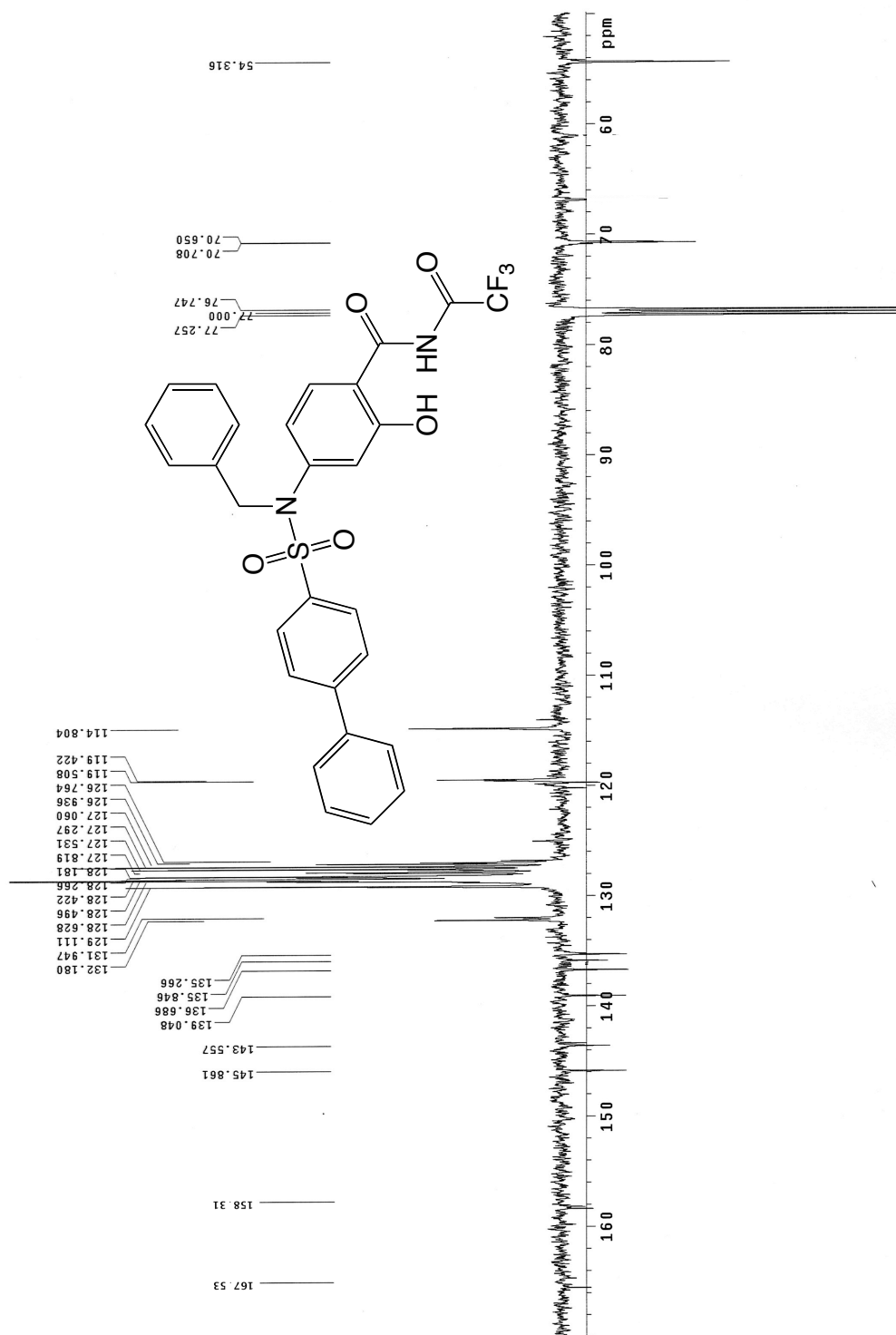
Spettro ^1H NMR del composto **14**

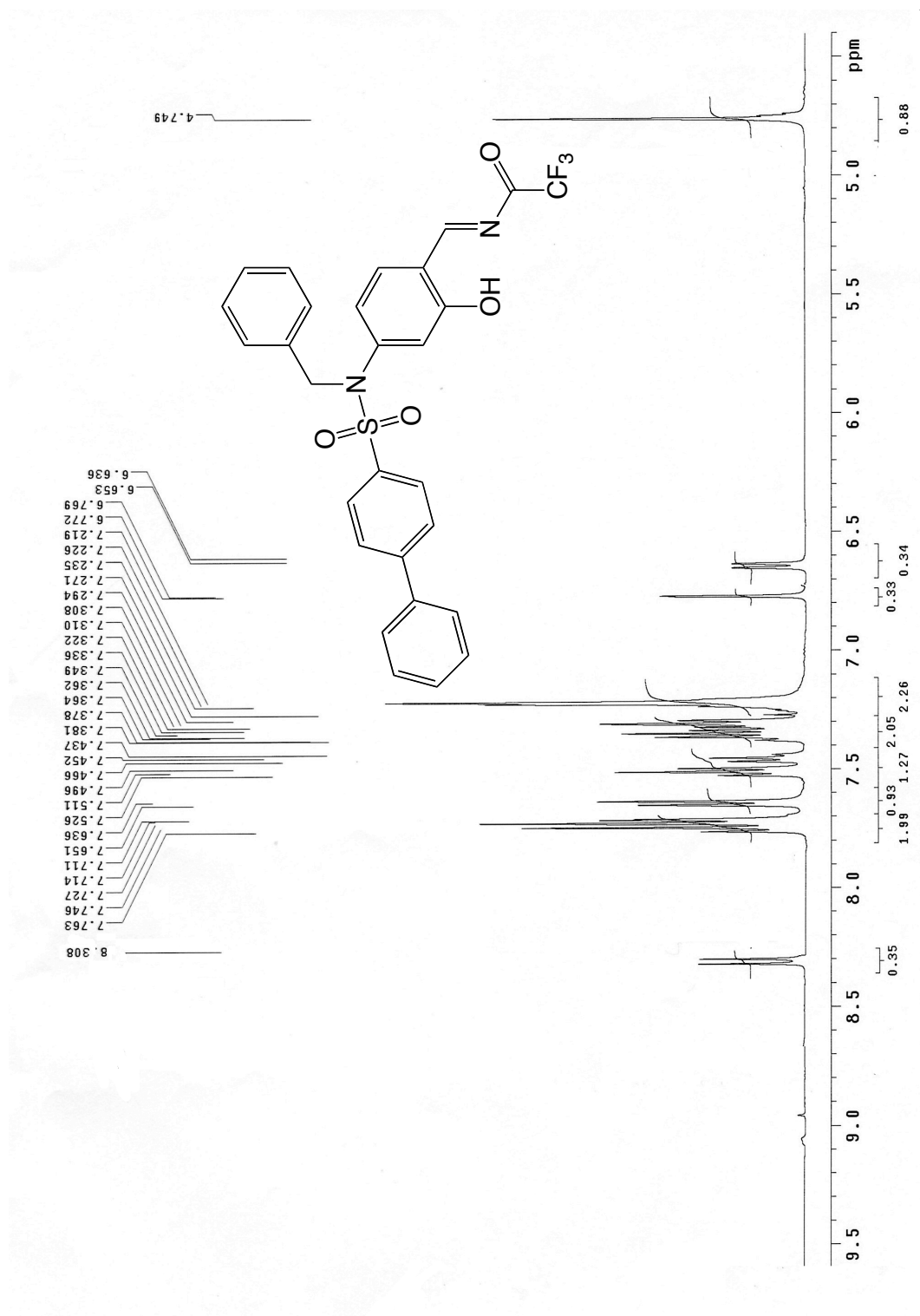


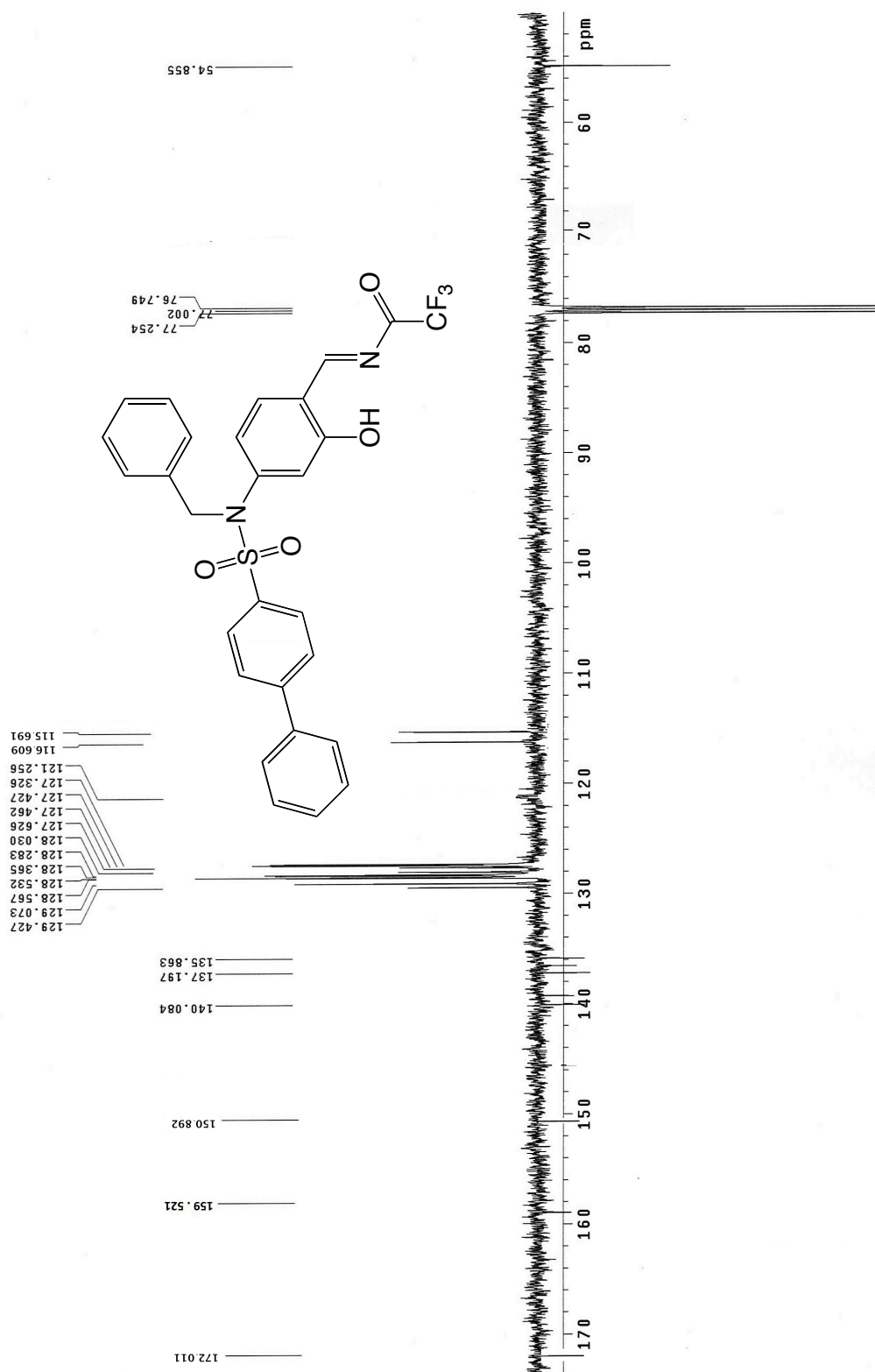
Spettro ^{13}C NMR del composto **14**



Spettro ^1H NMR del composto **15**

Spettro ^{13}C NMR del composto **15**

Spettro ^1H NMR del composto **16**

Spettro ^{13}C NMR del composto 16

12. STUDI SPETTROSCOPICI

Al fine di stabilire se il composto **13** sia in grado di chelare lo ione Zn^{2+} , sono state eseguite misure spettroscopiche UV-vis e ^{13}C NMR.

12.1 SPETTROSCOPIA UV

Non essendoci in letteratura dati inerenti l'assorbimento di composti metilenformilidrazinici coniugati con sistemi aromatici, per individuare la banda di assorbimento dovuta alla porzione formilidrazonometilica sono stati effettuati e confrontati gli spettri UV-vis del difenilsolfoncloruro, del composto **4** e del composto **13** (Figure 21, 22 e 23, rispettivamente).

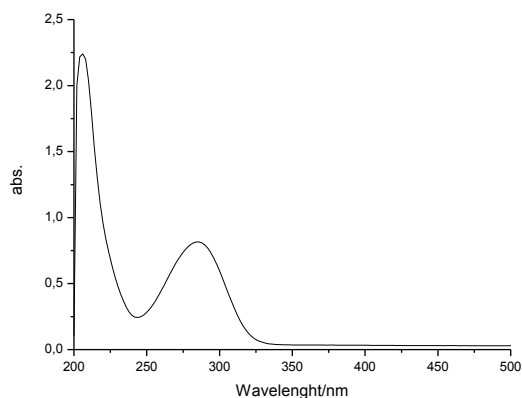
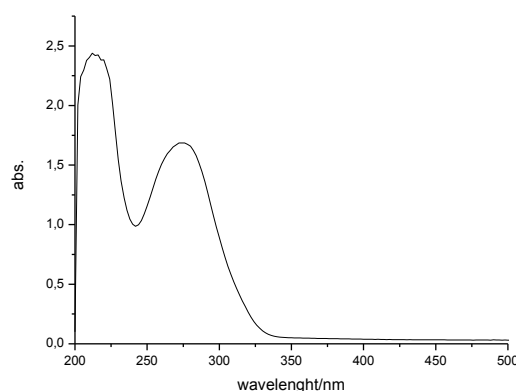
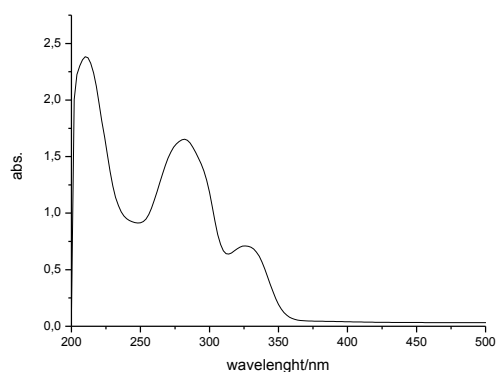
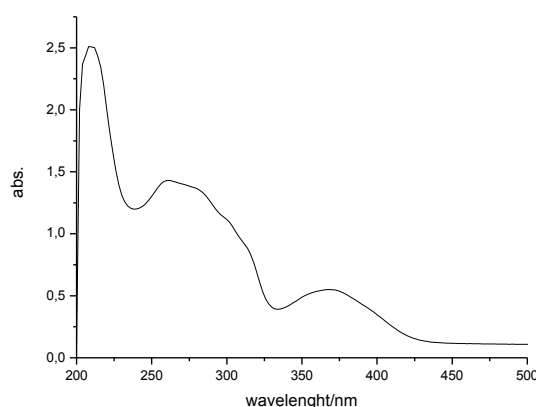


Figura 21

**Figura 22****Figura 23**

Da tale confronto emerge che la banda di assorbimento a 330 nm è imputabile alla presenza della porzione formilidrazonometilica.

Quindi è stato eseguito uno spettro di assorbimento su un campione del composto **13** in presenza di ioni Zn^{2+} (~10 eq.). Come si può osservare, in presenza dello ione metallico, la banda a 280 nm subisce uno spostamento ipsocromico a 255 nm e quella a 330 nm uno spostamento batocromico a 375 nm (Figura 24). Tale fenomeno è imputabile alla coordinazione dello ione metallico da parte dei gruppi formilico e fenolico.

**Figura 24**

12.2 SPETTROSCOPIA NMR

I risultati Uv-vis sono stati ulteriormente convalidati tramite studi NMR. Dopo aver registrato lo spettro ^{13}C NMR del composto **13**, in dimetilsolfossido, nello stesso tubicino sono state effettuate due aggiunte successive di due equivalenti di ZnCl_2 , in modo tale da registrare due spettri contenenti, rispettivamente, due e quattro equivalenti di ione Zn^{2+} . I risultati ottenuti mostrano un notevole spostamento dei valori a campi alti (Tabella 2), indicando che il composto **13** è capace di chelare lo ione zinco. In particolare lo spostamento dei valori coinvolge in misura maggiore il carbonio imminico ed il carbonio carbonilico della porzione formilidrazonometilica, insieme al carbonio adiacente all'OH fenolico; ciò dimostra il coinvolgimento di questi due gruppi nella chelazione dello zinco (Tabella 2).

Tabella 2. Valori di spostamento chimico, in ppm rispetto al TMS, degli spettri ^{13}C NMR del composto **13** da solo ed in presenza di 2 e 4 equivalenti, rispettivamente, di ZnCl_2 , e differenze rispetto al composto da solo.

13	53,188	116,243	118,438	119,169	126,461	127,060	127,394
13 + 2 Zn^{2+}	53,126	116,150	118,383	119,084	126,414	126,982	127,324
$\Delta\delta$	-0,062	-0,093	-0,055	-0,085	-0,047	-0,078	-0,070
13 + 4 Zn^{2+}	53,126	116,119	118,375	119,052	126,422	126,966	127,309
$\Delta\delta$	-0,062	-0,125	-0,063	-0,117	-0,039	-0,094	-0,095

13	127,970	128,328	128,663	129,145	136,071	136,413
13 + 2 Zn^{2+}	127,892	128,258	128,601	129,075	135,985	136,336
$\Delta\delta$	-0,078	-0,070	-0,062	-0,070	-0,086	-0,077
13 + 4 Zn^{2+}	127,869	128,243	128,585	129,068	135,954	136,305
$\Delta\delta$	-0,101	-0,095	-0,078	-0,077	-0,117	-0,108

13	138,149	140,693	141,837	144,545	156,156	164,692
13 + 2 Zn^{2+}	138,063	140,623	141,798	144,474	156,078	164,622
$\Delta\delta$	-0,086	-0,070	-0,039	-0,071	-0,078	-0,070
13 + 4 Zn^{2+}	138,040	140,592	141,806	144,452	156,062	164,599
$\Delta\delta$	-0,109	-0,101	-0,031	-0,093	-0,094	-0,093

13. CONCLUSIONI

Studi *in vitro*, su cellule tumorali, hanno già dimostrato un'alta specificità degli inibitori delle istone deacetilasi ed un'attività a concentrazioni dieci volte inferiori rispetto ad altre molecole tossiche. Studi clinici sono in atto per minimizzarne la tossicità in modo da sintetizzare HDI con una maggiore selettività nei confronti delle varie isoforme di HDAC. È stata, inoltre, confermata la loro efficacia come agenti antitumorali in terapie accoppiate ad altri farmaci classici ed altri studi sono in corso per dimostrare la loro attività nelle malattie neurodegenerative e cardiovascolari, nonché come antivirali.

Grazie alle conoscenze che sono state acquisite nell'ultimo decennio sugli HDI, ho potuto progettare una sintesi razionale di composti che hanno un buon ΔG_{legame} sull'HDAC, partendo dallo studio di composti sulfonamidici noti in letteratura. È stata investigata la capacità di tali composti di chelare lo zinco tramite studi di assorbimento Uv-vis e spettroscopia ^{13}C NMR; inoltre, grazie a studi di docking, è stata verificata la loro capacità di inserimento nella tasca dell'enzima. A breve, saranno effettuati saggi biologici sugli enzimi, nella speranza di confermare i risultati predetti dai calcoli computazionali.

14. PARTE SPERIMENTALE

Procedure generali. I punti di fusione non sono stati corretti. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UNITY Inova operante a 500 MHz per il protone ed a 125 MHz per il carbonio 13 e sono stati riportati in ppm rispetto al TMS. Gli spettri di assorbimento UV-Vis sono stati registrati con uno spettrofotometro Beckman DU 680. Gli spettri di emissione ed eccitazione di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro Spex Fluorolog Mod F-11. Gli spettri di assorbimento risolti nel tempo sono stati ottenuti con un sistema di *laser flash photolysis* eccitando il campione con la terza armonica di un laser Nd-YAG Continuum Surelite II-10 ($\lambda = 355$ nm con larghezza di impulso di 6 ns). La soluzione eccitata è stata analizzata a 90°C utilizzando un sistema mini mLFP-111 sviluppato dalla Luzchem Research. L'ossigeno è stato rimosso dalla soluzione mediante un costante flusso di azoto. La cromatografia su strato sottile è stata eseguita con lastre Merck 60 F₂₅₄. Per la cromatografia su colonna abbiamo usato il gel di silice della Macherey-Nagel 60 M (0.040–0.063 mm). La cromatografia preparativa radiale è stata eseguita su piatto di vetro ricoperto con gel di silice Merck 60 PF₂₅₄ (spessore da 1 a 4 mm). Tutte le reazioni che coinvolgono agenti sensibili all'aria, sono state condotte sotto atmosfera d'azoto. Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Aldrich o dalla Acros Chimica e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi per cromatografia sono stati distillati sotto pressione atmo-

sferica prima di essere utilizzati ed anidrificati con le procedure standard. L'acqua è stata purificata attraverso un sistema Millipore Milli-Q. Il tampone è stato preparato con reagenti al più alto grado di purezza e il pH risultante è stato misurato con un elettrodo a vetro.

Sintesi del metil 4-amino-2-idrossibenzoato (2)

Procedura generale. Ad una sospensione di acido *p*-amminosalicilico **1** (6,65 g, 49,57 mmol) in H₂SO₄ (9,31 mL, 4eq) si aggiunge MeOH anidro (120 ml). La reazione procede a refluxo (65°C), sotto agitazione, per 4 ore. La miscela di reazione è neutralizzata con KOH e, successivamente, filtrata. Il metanolo è rimosso a pressione ridotta e la miscela viene estratta con etere dietilico (o con acetato di etile). La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente organico viene eliminato a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto è purificato tramite flash-cromatografia, utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 40:70. Resa: 98%.

Sintesi del metil 4-metil-4-([1-1'-bifenil]-4-ilsolfonammido)-2-idrossibenzoato (3)

Procedura generale. All'(1-1'-bifenil)-4-solfonil cloruro (10,58 g, 41,88 mmol) in THF anidro (100 ml), alla temperatura di 0°C, si aggiunge goccia a goccia il substrato **2** (7 g, 41,88 mmol) solubilizzato in THF anidro (50 ml) e piridina anidra (16,94 ml, 5 eq). La reazione procede per 12 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è evaporata a pressione ridot-

ta e purificata tramite cromatografia flash, utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 30:70. Resa: 88%. ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz): 3.87 (s, 3H, CH_3), 6.80-6.87 (m, 2H, CH), 7.38-7.99 (m, 10H, CH), 10.81 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 52.67, 106.63, 108.71, 110.73, 128.07, 128.51, 128.61, 129.42, 129.93, 132.11, 145.73, 146.59. Anal. Calc. Per $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S}$: C, 62.65; H, 4.42; N, 3.65%. Trovato: C, 62.57; H, 4.47; N, 3.43%.

Sintesi del metil-(*N*-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsolfonamido)-2-(benzilossi) benzoato (4)

Procedura generale. Ad una soluzione della solfonammide **3** (2,87 g, 78,11 mmol) in acetone (100 ml) si aggiunge K_2CO_3 (5,4 g, 39,06 mmol, 5 eq) e si lascia la miscela ad agitare per 15 minuti. Si aggiunge, quindi, benzilbromuro (4,64 ml, 5 eq) e si lascia la reazione a refluxo, sotto agitazione, per 12 ore. La miscela di reazione viene trattata con una soluzione 1 M di HCl ed il solvente viene eliminato a bassa pressione. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia flash utilizzando una miscela eluente a gradiente, dal 100% di cicloesano ad una miscela di acetato di etile/cicloesano 20:80. Resa: 93%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 3.85 (s, 3H, CH_3), 4.73 (s, 2H, CH_2), 4.98 (s, 2H, CH_2), 6.60-7.70 (m, 22H, CH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 52.02, 54.31, 70.62, 114.87, 119.56, 119.74, 126.74, 127.27, 127.37, 127.50, 127.79, 127.81, 128.16, 128.41, 128.46,

128.51, 128.62, 129.09, 131.98, 135.25, 136.21, 136.66, 139.01, 143.46, 145.84, 158.22, 165.99. Anal. Calc. per $C_{34}H_{29}NO_5S$: C, 72.45; H, 5.19; N, 2.48%. Trovato: C, 72.40; H, 5.17; N, 2.49%.

Sintesi del *N*-benzil-*N*-(3-(benzilossi)-4-(idrossimetil)fenil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (5)

Procedura generale. All'estere **4** (1,75 g, 31,05 mmol) si aggiunge, alla temperatura di -78°C , LiAlH_4 (0,35 g, 9,31 mmol, 3 eq) e THF anidro (60 ml). La reazione procede per 12 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione viene trattata con una soluzione di HCl 1M ed estratta con AcOEt ed una soluzione satura di NaHCO_3 prima e di NaCl dopo. La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 e filtrata. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il prodotto purificato tramite cromatografia flash, utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 15:85. Resa: 71%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.62 (s, 2H, CH_2), 4.72 (s, 2H, CH_2), 4.89 (s, 2H, CH_2), 6.52-7.74 (m, 22H, CH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 54.88, 61.43, 70.17, 113.65, 120.36, 127.28, 127.40, 127.67, 128.14, 128.27, 128.37, 128.41, 128.55, 128.65, 129.08, 129.29, 135.75, 136.21, 137.07, 139.15, 139.36, 145.60, 156.33. Anal. Calc. per $C_{33}H_{29}NO_4S$: C, 73.99; H, 5.46; N, 2.61%. Trovato: C, 73.97; H, 5.47; N 2.49%.

Sintesi dell'*N*-benzil-*N*-(3-(benzilossi)-4-formilfenil)-[1,1'-bifenil]-4-il-solfonammido)-2-idrossibenzoato (6)

Procedura generale. All'alcool **5** (0,870 g, 1,63 mmol) si aggiunge MnO₂ (1,42 g, 16,30 mmol, 10 eq) in CH₂Cl₂ anidro (50 ml). La reazione procede a refluxo, sotto agitazione, per 12 ore. La miscela è evaporata a pressione ridotta e filtrata su celite utilizzando come solvente l'acetato di etile. Il prodotto è purificato mediante cromatografia flash, utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 10:90. Resa: 63%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 4.77 (s, 2H, CH₂), 5.03 (s, 2H, CH₂), 6.62-7.70 (m, 22H, CH), 10.40 (s, 1H, CHO). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 54.14, 70.69, 114.48, 119.32, 124.04, 127.30, 127.35, 127.60, 127.89, 128.12, 128.38, 128.55, 128.73, 129.13, 135.18, 135.58, 136.60, 138.98, 145.69, 146.03, 160.93, 188.77. Anal. Calc. per C₃₃H₂₇NO₄S: C, 74.27; H, 5.10; N, 2.62%. Trovato: C, 74.26; H, 5.12; N 2.60%.

Sintesi dell'*N*-benzil-*N*-(3-(benzilossi)-4-((2-formilidrozino)metil)fenil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (7)

Procedura generale. All'aldeide **6** (0,2 g, 0,3755 mmol) in EtOH (20 ml) si aggiunge la formilidrazina (0,06 g, 1,126 mmol, 3 eq) e si lascia la reazione a riflusso e sotto agitazione per 12 ore. La miscela di reazione viene estratta con AcOEt ed una soluzione satura di NaCl. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente viene eliminato a bassa pressione ed il prodotto purificato tramite cromatografia flash utilizzando una

miscela a gradiente AcOEt/Cicloesano dal 20% al 50% con qualche goccia di trietilammina. Resa: 83%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.75 (s, 2H, CH), 4.93 (s, 2H, CH), 6.58-8.15 (m, 22H, CH), 8.72 (d, 1H, CHO), 9.28 (bs, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 61.44, 70.17, 113.66, 120.37, 127.29, 127.41, 127.67, 127.49, 128.15, 128.28, 128.38, 128.42, 128.55, 128.66, 129.01, 129.30, 135.76, 136.22, 137.08, 139.16, 139.35, 145.61, 156.34. Anal. Calc. per $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C, 69.02; H, 4.94; N, 7.10%. Trovato: C, 69.00; H, 4.92; N 7.80%.

Sintesi dell'*N*-(4-((2-formilidrazono)metil)-3-idrossifenil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (13)

Procedura generale. Al substrato **7** (1 g, 2,529 mmol) si aggiunge Pd/C (0,2 g, 1,689 mmol) ed acetato di etile anidro (40 ml). La reazione è posta a refluxo e sotto agitazione per 48 ore. La miscela di reazione viene filtrata su celite con metanolo e purificata mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 40:60. Resa: 79%. ^1H NMR (DMSO, 500 MHz): 4.80 (s, 2H, CH_2), 6.59-8.20 (m, 17H, CH_2), 8.63 (s, 1H, CHO), 10.21 (s, OH). 11.63 (s, NH). ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz): 53.19, 116.24, 118.44, 119.17, 126.46, 127.06, 127.39, 127.97, 128.33, 128.66, 129.14, 136.07, 136.41, 138.15, 140.64, 141.84, 144.54, 156.16, 164.69. Anal. Calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C, 64.66; H, 4.62; N, 8.38%. Trovato: C, 69.01; H, 4.95; N 7.82%.

Sintesi dell'acido 4-(N-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsolfonammido)-2-(benzilossi)-benzoico (8)

Procedura generale. Ad una soluzione dell'estere **4** (2,46 g, 4,364 mmol) in THF e H₂O (1:1, 50 ml), si aggiunge LiOH (1,22 g, 21,82 mmol, 5 eq). La reazione procede a refluxo per 24 ore. La miscela di reazione viene neutralizzata con una soluzione di HCl 6M ed estratta con AcOEt. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente viene eliminato a bassa pressione ed il prodotto purificato mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 30:70. Resa: 76%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 4.82 (d, 2H, CH₂), 4.99 (d, 2H, CH₂), 6.79-7.94 (m, 22H, CH), 12.68 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 54.03, 72.17, 114.83, 117.29, 119.91, 127.25, 127.62, 127.81, 127.92, 128.04, 128.34, 128.56, 128.67, 129.00, 129.01, 133.69, 134.19, 134.97, 136.35, 139.35, 144.72, 146.09, 157.39, 165.12. Anal. Calc. per C₃₃H₂₇NO₅S: C, 72.11; H, 4.95; N, 2.55%. Trovato: C, 72.09; H, 4.93; N 2.57%.

Sintesi del 4-(N-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsolfonammido)-2-(benzilossi)-benzoil cloruro (9)

Procedura generale. All'acido **8** (0,850 g, 2,301 mmol) si aggiunge SOCl₂ (8 ml). La reazione è posta a refluxo per 4 ore. Il solvente viene rimosso a pressione ridotta ed il prodotto viene utilizzato senza ulteriore puri-

ficazione.

Sintesi dell'*N*-benzil-*N*-(3-(benzilossi)-4-(2-formilidrazinocarbonil)fenil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (10)

Procedura generale. Al cloruro **9** (0,6 g, 1,056 mmol), in CH₃CN anidro (30 ml), si aggiunge la formilidrazina (0,13 g, 2,112 mmol, 3 eq) e si lascia reagire per 24 ore a refluxo e sotto agitazione. Il prodotto è purificato tramite cromatografia flash utilizzando una miscela a gradiente AcOEt/Cicloesano dal 40% al 60%. Resa: 64%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 4.76 (d, 2H, CH₂), 5.02 (d, 2H, CH₂), 6.66-8.05 (m, 22H, CH), 8.07 (s, 1H, CHO), 9.65 (bs, NH), 10.40 (bs, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 54.13, 71.77, 114.52, 117.98, 119.90, 127.24, 127.54, 127.69, 127.84, 127.90, 128.07, 128.35, 128.50, 128.63, 128.73, 128.87, 129.07, 132.34, 134.49, 135.07, 136.41, 138.88, 143.78, 145.93, 156.56, 160.70. Anal. Calc. per C₃₄H₂₉N₃O₅S: C, 69.02; H, 4.94; N, 7.10%. Trovato: C, 69.04; H, 4.91; N 7.15%.

Sintesi dell'*N*-(4-(2-formilidrazinocarbonil)-3-idrossifenil)-[1,1'-bifenil] 4-solfonammide (14)

Procedura generale. Al substrato **11** (0.5 g, 0,997 mmol) si aggiunge Pd/C (0,08 g, 0,665 mmol) ed acetato di etile. La reazione è posta a refluxo e sotto agitazione per 48 ore. La miscela di reazione viene filtrata su celite e

purificata mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 40:60. Resa: 81%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.78 (s, 2H, CH_2), 6.71-7.75 (m, 17H, CH), 8.19 (s, 1H, CHO). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 53.02, 114.52, 117.98, 119.90, 127.24, 127.54, 127.69, 127.84, 127.90, 128.07, 128.35, 128.50, 128.63, 128.73, 128.87, 129.07, 132.34, 134.49, 135.07, 136.41, 138.88, 143.78, 145.93, 158.68, 160.69. Anal. Calc. per $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C, 64.66; H, 4.62; N, 8.38%. Trovato: C, 64.63; H, 4.58; N 8.36%.

Sintesi del 4-(*N*-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsulfonammido)-2-(benzilossi)-*N*-(2,2,2-trifluoroacetil)benzammide (11)

Procedura generale. Al cloruro **9** (0,4 g, 0,931 mmol), in CH_3CN anidro (30 mL), si aggiunge la trifluoroacetammide (0,11 g, 1,863 mmol, 2 eq) e si lascia reagire per 24 ore a refluxo e sotto agitazione. Il prodotto è purificato tramite cromatografia flash utilizzando una miscela a gradiente AcOEt/Cicloesano dal 40% al 60%. Resa: 64%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.77 (s, 2H, CH_2), 5.03 (s, 2H, CH_2), 5.63 (bs, NH) 6.61-8.05 (m, 22 H, CH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 52.02, 72.39, 114.86, 117.08, 119.95, 126.33, 127.28, 127.65, 127.95, 128.06, 128.24, 128.37, 128.60, 128.72, 129.12, 133.88, 133.97, 135.00, 136.35, 138.88, 144.88, 146.13, 157.27, 164.73. Anal. Calc. per $\text{C}_{35}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 65.21; H, 4.22; N, 4.35%. Trovato: C, 66.04; H, 4.12; N 4.18%.

Sintesi *N*-(4-(*N*-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsulfonammido)-2-(benzilossi)-benzilidene)-2,2,2-trifluoroacetammide (**12**)

Procedura generale. Una miscela di benzotriazololo (0,11 g, 0,0937 mmol), aldeide **7** (0,5 g, 0,937 mmol) e trifloracetammide (0,10 g, 0,0937 mmol) è refflussata in toluene dry per 24 ore, usando l'apparato di Dean-Stark. Si lascia raffreddare la miscela di reazione. Il solido precipitato viene filtrato e lavato con etere dietilico. Resa: 50%.

L'intermedio ottenuto (0,29 g, 0,468 mmol) è aggiunto ad una soluzione di metossido di sodio in metanolo (0,13 g di Na in 1,5 ml di MeOH) e la reazione procede per una notte. La miscela di reazione viene posta in acqua ed il precipitato ottenuto viene filtrato per ottenere il prodotto **11**. Resa: 80%.

Il composto **11** viene lentamente riscaldato a 120 °C a pressione ridotta (0,5 mm Hg), per favorire l'evaporazione del metanolo, e, successivamente distillato per ottenere il composto **12**. Resa: 63%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 4.68 (s, 2H, CH₂), 5.02 (s, 2H, CH₂), 6.55-8.00 (m, 22H, CH), 8.75 (s, 1H, CH=N). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 54.85, 70.08, 114.82, 115.74, 121.26, 127.33, 127.46, 127.63, 128.03, 128.28, 128.36, 128.53, 128.57, 129.07, 129.43, 135.86, 137.20, 140.08, 145.58, 159.55. Anal. Calc. per C₃₅H₂₇F₃N₂O₄S: C, 66.87; H, 4.33; N, 4.46; O, 10.18; S, 5.10%. Trovato: C, 66.73; H, 4.58; N 4.52; S 5.24 %.

Sintesi di 4-(*N*-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsulfonammido)-2-idrossi-*N*-(2,2,2-trifluoroacetil)benzamide (15)

Procedura generale. Al substrato **11** (0,2 g, 0,465 mmol) si aggiunge Pd/C (0,04 g, 0,338 mmol) ed acetato di etile anidro. La reazione è posta a refluxo e sotto agitazione per 48 ore. La miscela di reazione viene filtrata su celite con metanolo e purificata mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 40:60. Resa: 80%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.42 (s, 2H, CH_2), 6.59-7.95 (m, 17H, CH_2), 10.03 (bs, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 54.32, 114.80, 119.42, 126.76, 126.94, 127.06, 127.30, 127.53, 127.82, 128.18, 128.27, 128.42, 128.50, 128.63, 129.11, 131.95, 132.18, 135.27, 135.85, 136.69, 139.05, 143.56, 145.86, 158.31, 167.53. Anal. Calc. per $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 60.65; H, 3.82; N, 5.05. Trovato: C, 60.76; H, 4.02; N, 7.38%.

Sintesi di (*N*-(4-(*N*-benzil-[1,1'-bifenil]-4-ilsulfonammido)-2-idrossi-benzilidene)-2,2,2-trifluoroacetammide (16)

Procedura generale. Al substrato **12** (0,05 g, 0,079 mmol) si aggiunge Pd/C (0,01 g, 0,084 mmol) ed acetato di etile anidro. La reazione è posta a refluxo e sotto agitazione per 48 ore. La miscela di reazione viene filtrata su celite con metanolo e purificata mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente acetato di etile/cicloesano 40:60. Resa: 76%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 4.75 (s, 2H, CH_2), 6.64-7.76 (m, 17H, CH_2), 8.31

(s, 1H, CH=N). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 54.85, 115.69, 116.61, 121.26, 127.33, 127.43, 127.46, 127.63, 128.03, 128.28, 128.36, 128.53, 128.57, 129.07, 129.43, 135.87, 136.66, 137.19, 139.91, 140.08, 150.89, 159.52, 172.01. Anal. Calc. per $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 62.45; H, 3.93; N, 5.20%.
Trovato: C, 62.01; H, 3.95; N 5.42%.

15. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Wade, P. A., *Hum. Mol. Genet.*, **2001**, *10*, 693–698.
- ² a) Ito, K.; Barnes, P. J.; Adcock, I. M. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, *20*, 6891–6903. b) Strahl, B. D. and Allis, C. D. *Mol. Cell. Biol.*, **2000**, *20*, 6891–6903.
- ³ Minucci, S.; Pelicci, G. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 38–51.
- ⁴ a) Cress, W. D.; Seto, E. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2000**, *184*, 1–16. b) Timmermann, S.; Lehrmann, H.; Poleskaya, A.; Harel-Bellan, A. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 728–736.
- ⁵ a) He, L. Z.; Tolentino, T.; Grayson, P.; Zhong, S.; Warrell, Jr, R. P.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Richon, V. M.; Pandol, P. P. *J. Clin. Invest.*, **2001**, *108*, 1321–1330; b) Zhou, D. C.; Kim, S. H.; Ding, W.; Schultz, C.; Warrell, R. P. J.; Gallagher, R. E. *Blood*, **2002**, *99*, 1356–1363; c) Munster, P. N.; Troso-Sandoval, T.; Rosen, N.; Rifkind, R.; Marks, P. A.; Richon, V. M., *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 8492–8497.
- ⁶ a) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*, **2000**, *100*, 57–70. b) Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *Nature*, **1997**, *386*, 761–763.
- ⁷ a) Lund, A. H.; Van Lohuizen, M. *Genes. Dev.*, **2004**, *18*, 2315–2335. b) Baylin, S. B.; Ohm, J. E. *Nature Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 107–116.
- ⁸ a) Blume-Jensen, P.; Hunter, T. *Nature*, **2001**, *411*, 355–365.
- ⁹ Garrington, T. P.; Johnson G. L. *Curr. Opin. Cell. Bio.*, **1999**, *11*, 211–218.
- ¹⁰ Johnson, D. G.; Walker, C. L. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, *39*, 295–312.
- ¹¹ Swanton, C. *Lancet*, **2004**, *5*, 27–36.
- ¹² a) Reed, J. C.; Jurgensmeier J. M.; Matsuyama S. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1366*, 127–137. b) Bolden J. E.; Peart M. J.; Johnstone, R. W. *Nature*, **2006**, *5*, 769–784.
- ¹³ a) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature*, **2000**, *407*, 249–257. b) Buys, C. H. C. M.; *N. Engl. J. Med.*, **2000**, *342*, 1282–1283. c) Chambers, A. F.; Groom, A. C.; MacDonald,
-

-
- I. C. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2, 563-557. d) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Sci. Am. Feb.*, **1996**, 80-85.
- ¹⁴ Thiagalingam, S. et al. *Ann. NY Acad. Sci.*, **2003**, 983, 84–100.
- ¹⁵ Khochbin, S.; Verdel, A.; Lemercier, C.; Seigneurin-Berny, D. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2001**, 11, 162–166.
- ¹⁶ Johnstone, R. W. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 287–299.
- ¹⁷ a) Fischle, W.; Dequiedt, F.; Hendzel, M. J.; Guenther, M. G.; Lazar, M. A.; Voelter, W.; Verdin, E. *Mol. Cell*, **2002**, 9, 45–57. b) Fischle, W.; Dequiedt, F.; Fillion, M.; Hendzel, M. J.; Voelter, W.; Verdin, E. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 35826–35835. c) Yang, W. M.; Tsai, S. C.; Wen, Y. D.; Fejer, G.; Seto, E. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 9447–9454.
- ¹⁸ Van den Wyngaert, I.; de Vries, W.; Kremer, A.; Neefs, J.; Verhasselt, P.; Luyten, W. H.; Kass, S. U. *FEBS Lett.*, **2000**, 478, 77–83.
- ¹⁹ Bertos, N. R.; Wang, A. H.; Yang, X. J. *Biochem. Cell Biol.*, **2001**, 79, 243–252.
- ²⁰ Kao, H. Y.; Lee, C. H.; Komarov, A.; Han, C. C.; Evans, R. M. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 187–193.
- ⁴⁶ Zhou, X.; Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Richon, V. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 10572–10577.
- ²¹ Huang, Y.; Myers, S. J.; Dingledine, R. *Nat. Neurosci.*, **1999**, 2, 867–872.
- ²² Glaser, K. B.; Li, J.; Staver, M. J.; Wei, R. Q.; Albert, D. H.; Davidsen, S. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 310, 529–536.
- ²³ Senese, S.; Zaragoza, Minardi, S.; Muradore, I.; Ronzoni, S.; Passafaro, A.; Bernard, L.; Draetta, G. F.; Alcalay, M.; Seiser, C.; Chiocca, S. *Mol. Cell. Biol.*, **2007**, 27, 4784–4795.
-

-
- ²⁴ Huang, B. H.; Laban, M.; Leung, C. H.; Lee, L.; Lee, C. K.; Salto-Tellez, M.; Raju, G. C.; Hooi, S. C. *Cell Death Differ.*, **2005**, *12*, 395–404.
- ²⁵ Harms, K. L.; Chen, X. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 3145–3152.
- ²⁶ Bicaku, E.; Marchion, D. C.; Schmitt, M. L.; Munster, P. N. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 1513–1519.
- ²⁷ Atsumi, A.; Tomita, A.; Kiyoi, H.; Naoe, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, *345*, 1471–1480.
- ²⁸ Lee, H.; Sengupta, N.; Villagra, A.; Rezai-Zadeh, N.; Seto, E. *Mol. Cell. Biol.*, **2006**, *26*, 5259–5269.
- ²⁹ Balasubramanian, S.; Ramos, J.; Luo, W.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Buggy, J. J. *Leukemia*, **2008**, *22*, 1476–5551.
- ³⁰ Chauchereau, A.; Mathieu, M.; De Saintignon, J.; Ferreira, R.; Pritchard, L. L.; Mihal, Z.; Dejean, A.; Harel-Bellan, A. *Oncogene*, **2004**, *23*, 8777–8784.
- ³¹ Mottet, D.; Bellahcene, A.; Pirotte, S.; Waltregny, D.; Deroanne, C.; Lamour, V.; Lidereau, R.; Castronovo, V. *Circ. Res.*, **2007**, *101*, 1237–1246.
- ³² Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Grozinger, C. M.; Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 4389–4394.
- ³³ Bali, P.; Pranpat, M.; Bradner, J.; Balasis, M.; Fiskus, W.; Guo, F.; Rocha, K.; Kumaraswamy, S.; Boyapalle, S.; Atadja, P.; Seto, E.; Bhalla, K. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 26729–26734.
- ³⁴ Park, J. H.; Kim, S. H.; Choi, M. C.; Lee, J.; Oh, D. Y.; Im, S. A.; Bang, Y. J. Kim, T. Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *368*, 318–322.
- ³⁵ He, L. Z.; Tolentino, T.; Grayson, P.; Zhong, S.; Warrell Jr., R. P.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Richon, V. M.; Pandolfi, P. P. *J. Clin. Invest.*, **2001**, *108*, 1321–1330.
-

-
- ³⁶ a) Kim, Y. B.; Lee, K. H.; Sugita, K.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. *Oxamflatin Oncogene*, **1999**, *18*, 2461–2470. b) Johnstone R. W.; Ruefli A. A.; Lowe S. W. *Cell*, **2002**, *108*, 153–164.
- ³⁷ a) Chen, Z. et al. *Cancer Lett.*, **2002**, *188*, 127–140. b) Jaboin, J. et al. *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 6108–6115.
- ³⁸ a) Ruefli, A. A. et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 10833–10838. b) Peart, M. J. et al. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4460–4471.
- ³⁹ Taddei A.; Maison C.; Roche D.; Almouzni G. *Nat. Cell Biol.*, **2001**, *3*, 114–120.
- ⁴⁰ Qian, D. Z. et al. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 634–642.
- ⁴¹ Armeanu, S. et al. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 6321–6329.
- ⁴² Reddy, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 3921–3926.
- ⁴³ a) Nusinzon, I.; Horvath, C. M. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **2003**, *USA 100*, 14742–14747. b) Yuan, Z. L.; Guan, Y. J.; Chatterjee, D.; Chin, Y. E. *Science*, **2005**, *307*, 269–273. c) Chen, L.; Fischle, W.; Verdin, E.; Greene, W. C. *Science*, **2001**, *293*, 1653–1657.
- ⁴⁴ a) Kelly, W. K.; O'Connor, O. A.; Marks, P. A. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2002**, *11*, 1695–1713. b) Johnstone, R. W. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 287–299.
- ⁴⁵ Inoue, S.; MacFarlane, M.; Harper, N.; Wheat, L. M. C.; Dyer, M. J. S., Cohen, G. M. *Cell Death and Differentiation*, **2004**, *11*, S193–S206. doi:10.1038/sj.cdd.4401535.
- ⁴⁶ Willis, S. N.; Adams, J. M. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2005**, *17*, 617–625.
- ⁴⁷ a) Ruefli, A. A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 10833–10838. b) Peart, M. J. et al. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4460–4471. c) Mitsiades, N. et al. *Blood*, **2003**, *101*, 4055–4062.
- ⁴⁸ Zhao, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 16090–16095.
- ⁴⁹ Zhang, Y.; Adachi, M.; Kawamura, R.; Imai, K. *Cell Death Differ.*, **2006**, *13*, 129–140.
-

-
- ⁵⁰ Xu, Y. *Cell Death Differ.*, **2003**, *10*, 400–403. b) Terui, T. et al. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 8948–8954. c) Blagosklonny, M. V. et al. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 7386–7392.
- ⁵¹ Wiech, N. L.; Fisher J. F.; Helquist, P.; Wiest, O. *Top Med. Chem.*, **2009**, *9*, 257–71.
- ⁵² a) Sleiman, S. F.; Basso, M.; Mahishi, L.; Kozikowski, A. P.; Donohoe, M. E.; Langley, B.; et al. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2009**, *18*, 573–584. b) Abeland, T.; Zukin, R. S. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2008**, *8*, 57–64. c) Gan, L. *Drug News Perspect*, **2007**, *20*, 233–239.
- ⁵³ Sadri-Vakiliand, G; Cha, J. H. *Curr. Alzheimer Res.*, **2006**, *3*, 403–408.
- ⁵⁴ Hahnen, E.; Hauke, J.; Trankle, C.; Eyupoglu, I. Y.; Wirth, B.; Blumcke, I. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2008**, *17*, 169–184.
- ⁵⁵ a) Kazantsevand, A. G.; Thompson, L. M. *Nat. Rev.*, **2008**, *7*, 854–868. b) Tremolizzo, L.; Rodriguez-Menendez, V.; Sala, G.; Di Francesco, J. C.; Ferrarese, C. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **2005**, *6*, 185–186.
- ⁵⁶ a) Langley, B; Gensert, J. M.; Beal, M. F.; Ratan, R. R. *Curr. Drug Targets*, **2005**, *4*, 41–50. b) Rouaux, C.; Loeffler, J. P.; Boutillier, A. L. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 1157–1164.
- ⁵⁷ a) Hockly, E.; Richon, V. M.; Woodman, B.; Smith, D. L.; Zhou, X.; Rosa, E.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 2041–2046. b) Hirtz, D.; Iannaccone, S.; Heemskerk, J.; Gwinn-Hardy, K.; Moxley 3rd, R.; Rowland, L. P. *Neurology*, **2005**, *65*, 1352–1357.
- ⁵⁸ a) Guan, J. S.; Haggarty, S. J.; Giacometti, E.; Dannenberg, J. H.; Joseph, N.; Gao, J.; et al. *Nature*, **2009**, *459*, 55–60. b) Akhtar, M. W.; Raingo, J.; Nelson, E. D.; Montgomery, R. L.; Olson, E. N.; Kavalali, E. T.; et al. *Journal of Neuroscience*, **2009**, *29*, 8288–8297.
-

-
- ⁵⁹ a) Minamiyama, M.; Katsuno, M.; Adachi, H.; Waza, M.; Sang, C.; Kobayashi, Y.; et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2004**, *13*, 1183–1192. b) Hahnen, E.; Eyupoglu, I. Y.; Brichta, L.; Haastert, K.; Trankle, C.; Siebzehnruhl, F. A.; et al. *Journal of Neuroscience*, **2006**, *98*, 193–202. c) Avila, A. M.; Burnett, B. G.; Taye, A. A.; Gabanella, F.; Knight, M. A.; Hartenstein, P.; et al. *J. Clin. Invest.*, **2007**, *117*, 659–671. d) Hauke, J.; Riessland, M.; Lunke, S.; Eyupoglu, I. Y.; Blumcke, I.; El-Osta, A.; et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2009**, *18*, 304–317.
- ⁶⁰ Rai, M.; Soragni, E.; Jenssen, K.; Burnett, R.; Herman, D.; Coppola, G., et al. *PLoS ONE*, **2008**, *3*, e1958.
- ⁶¹ a) Echaniz-Laguna, A.; Bousiges, O.; Loeffler, J. P.; Boutillier, A. L. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 1263–1273. b) Corcoran, L. J.; Mitchison, T. J.; Liu, Q. *Curr. Biol.*, **2004**, *14*, 488–492.
- ⁶² Herman, D.; Jenssen, K.; Burnett, R.; Soragni, E.; Perlman, S. L.; Gottesfeld, J. M. *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, 551–558.
- ⁶³ Chou, C. J.; Herman, D.; Gottesfeld, J. M. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 35402–35409.
- ⁶⁴ a) Kee, H. J.; Eom, G. H.; Joung, H.; Shin, S.; Kim, J. R.; Cho, Y. K.; et al. *Circulation Research*, **2008**, *103*, 1259–1269. b) Montgomery, R. L.; Davis, C. A.; Potthoff, M. J.; Haberland, M.; Fielitz, J.; Qi, X.; et al. *Genes & Development*, **2007**, *21*, 1790–1802. c) Trivedi, C. M.; Lu, M. M.; Wang, Q.; Epstein, J. A. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 26484–26489.
- ⁶⁵ a) Gallo, P.; Latronico, M. V.; Grimaldi, S.; Borgia, F.; Todaro, M.; Jones, P.; et al. *Cardiovasc. Res.*, **2008**, *80*, 416–424. b) Kook, H.; Lepore, J. J.; Gitler, A. D.; Lu, M. M.; Wing-Man Yung, W.; Mackay, J.; et al. *J. Clin. Invest.*, **2003**, *112*, 863–871. c) Hamamoriand, Y.; Schneider, M. D. *J. Clin. Invest.*, **2003**, *112*, 824–826. d) Berry, J. M.; Cao, D. J.; Rothermel, B. A.; Hill, J. A. *Expert Opin. Drug Saf.*, **2008**, *7*, 53–67.
-

- e) Metzger, J. M. *Nat. Med.*, **2002**, 8, 1078–1079. f) Zhang, C. L.; McKinsey, T. A.; Chang, S.; Antos, C. L.; Hill, J. A.; Olson, E. N. *Cell.*, **2002**, 110, 479–488. g) Bushand, E. W.; McKinsey, T. A. *Expert. Opin. Ther. Targets*, **2009**, 13, 767–784. h) Olson, E. N.; Backs, J.; McKinsey, T. A. *Novartis. Found. Symp.*, **2006**, 274, 3–12.
- ⁶⁶ a) Granger, A.; Abdullah, I.; Huebner, F.; Stout, A.; Wang, T.; Huebner, T.; et al. *FASEB J*, **2008**, 22, 3549–3560. b) Kong, Y.; Tannous, P.; Lu, G.; Berenji, K.; Rothermel, B. A.; Olson, E. N.; et al. *Circulation*, **2006**, 113, 2579–2588. c) Oka, S.; Ago, T.; Kitazono, T.; Zablocki, D.; Sadoshima, J. *J. Mol. Med.*, **2009**, 87, 785–791. d) Antos, C. L.; McKinsey, T. A.; Dreitz, M.; Hollingsworth, L. M.; Zhang, C. L.; Schreiber, K.; et al. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 28930–28937.
- ⁶⁷ a) Kim, M. S.; Kwon, H. J.; Lee, Y. M.; Baek, J. H.; Jang, J. E.; Lee, S. W.; et al. *Nat. Med.*, **2001**, 7, 437–443. b) Urbich, C.; Rossig, L.; Kaluza, D.; Potente, M.; Boeckel, J. N.; Knau, A.; et al. *Blood*, **2009**, 113, 5669–5679.
- ⁶⁸ Choi, J. H.; Nam, K. H.; Kim, J.; Baek, M. W.; Park, J. E.; Park, H. Y.; et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2005**, 25, 2404–2409.
- ⁶⁹ a) Minetti, G. C.; Colussi, C.; Adami, R.; Serra, C.; Mozzetta, C.; Parente, V.; et al. *Nat. Med.*, **2006**, 12, 1147–1150. b) Colussi, C.; Gurtner, A.; Rosati, J.; Illi, B.; Ragonne, G.; Piaggio, G.; et al. *FASEB J*, **2009**, 23, 2131–2141.
- ⁷⁰ Colussi, C.; Mozzetta, C.; Gurtner, A.; Illi, B.; Rosati, J.; Straino, S.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 19183–19187.
- ⁷¹ Iezzi, S.; Di Padova, M.; Serra, C.; Caretti, G.; Simone, C.; Maklan, E.; et al. *Dev. Cell.*, **2004**, 6, 673–684.
- ⁷² a) Barnes, P. J. *Chest*, **2006**, 129, 151–155. b) Mroz, R. M.; Noparlik, J.; Chyczewska, E.; Braszko, J. J.; Holownia, A. *J. Physiol. Pharmacol.*, **2007**, 58, 453–460. c) Ad-

- cock, I. M.; Tsaprouni, L.; Bhavsar, P.; Ito, K. *Curr. Opin. Immunol.*, **2007**, *19*, 694–700.
- ⁷³ a) Yan, Z. Q.; Yao, Q. P.; Zhang, M. L.; Qi, Y. X.; Guo, Z. Y.; Shen, B. R.; et al. *J. Biomech.*, **2009**, *42*, 945–948. b) Gupta, M. P.; Samant, S. A.; Smith, S. H.; Shroff, S. G. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 10135–10146.
- ⁷⁴ Herbein, G.; Wendling, D. *Clin. Epigenet.*, **2010**, *1*, 13–24.
- ⁷⁵ Kouraklis, G.; Misiakos, E. P.; Theocharis, S. *Target.Oncol.*, **2006**, *1*, 34–41.
- ⁷⁶ a) Lin, H. Y.; Chen, C. H.; Lin, S. P.; Weng, J. R. *Med. Res. Rev.*, **2006**, *26*, 397–413. b) Luo, J.; Nikolaev, A. Y.; Imai, S.; Chen, D.; Su, F.; Shiloh, A.; Guarente, L.; Gu, W. *Cell.*, **2001**, *107*, 137–148.
- ⁷⁷ Park, J. H.; Jung, Y.; Kim, T. Y.; Kim, S. G.; Jong, H. S.; Lee, J. W.; Kim, D. K.; Lee, J. S.; Kim, N. K.; et al. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 5271–5281.
- ⁷⁸ Zhu, P.; Huber, E.; Kiefer, F.; Gottlicher, M. *Cell. Cycle*, **2004**, *3*, 1240–1242.
- ⁷⁹ Zhang, C. L.; McKinsey, T. A.; Chang, S.; Antos, C. L.; Hill, J. A.; Olson, E. N. *Cell.*, **2002**, *110*, 479–488.
- ⁸⁰ Inche, A.; La Thangue, N. B. *Drug Discov. Today*, **2006**, *11*, 97–109.
- ⁸¹ Somoza, J. R.; Skene, R. J.; Katz, B. A.; Mol, C.; Ho, J. D.; Jennings, A. J.; Luong, C.; Arvai, A.; Buggy, J. J.; Chi, E.; Tang, J.; Sang, B. C.; Verner, E.; Wynands, R.; Leahy, E. M.; Dougan, D. R.; Snell, G.; Navre, M.; Knuth, M. W.; Swanson, R. V.; McRee, D. E.; Tari, L. W. *Structure*, **2004**, *12*, 1325–1334.
- ⁸² Vannini, A.; Volpari, C.; Filocamo, G.; Casavola, E. C.; Brunetti, M.; Renzoni, D.; Chakravarty, P.; Paolini, C.; De Francesco, R.; Gallinari, P.; Steinkuhler, C.; Marco, S. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 15064–15069.
- ⁸³ Chen, Y.; Li, H.; Tang, W.; Zhu, C.; Jiang, Y.; Zou, J. Yu, Q. *Eur. J. Med.Chem.*, **2009**, *44*, 2868–2876.

-
- ⁸⁴ Zhang, Y.; Gilquin, B.; Khochbin, S.; Matthias, P. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 2401–2404.
- ⁸⁵ Marks, P.; Rifkind, R. A.; Richon, V. M.; Breslow, R.; Miller, T.; Kelly, W.K. *Nat. Rev. Cancer*, **2001**, *1*, 194–202.
- ⁸⁶ Lagger, G.; O’Carroll, D.; Rembold, M.; Khier, H.; Tischler, J.; Weitzer, G.; Schuettengruber, B.; Hauser, C.; Brunmeir, R.; Jenuwein, T.; Seiser, C. *EMBO J*, **2002**, *21*, 2672–2681.
- ⁸⁷ Kim, S. H.; Jeong, J. W.; Park, J. A.; Lee, J. W.; Seo, J. H.; Jung, B. K.; Bae, M. K.; Kim, K. W. *Oncol. Rep.*, **2007**, *17*, 647–651.
- ⁸⁸ Harms, K.L.; Chen, X. *Cancer. Res.*, **2007**, *67*, 3145–3152.
- ⁸⁹ Trivedi, C. M.; Luo, Y.; Yin, Z.; Zhang, M.; Zhu, W.; Wang, T.; Floss, T.; Goettlicher, M.; Noppinger, P. R.; Wurst, W.; Ferrari, V. A.; Abrams, C. S.; Gruber, P. J.; Epstein, J. A. *Nat. Med.*, **2007**, *13*, 324–331.
- ⁹⁰ Chang, S.; Young, B. D.; Li, S.; Qi, X.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. *Cell*, **2006**, *126*, 321–334.
- ⁹¹ Dokmanovic, M.; Clarke, C.; Marks, P. A. *Cancer Res*, **2007**, *5*, 981–989.
- ⁹² Bolden, J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2006**, *5*, 769–784.
- ⁹³ Belvedere, S.; Witter, D. J.; Yan, J.; Secrist, J. P.; Richon, V.; Miller T. A. *Biorganic e Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, *17*, 3969–3971.
- ⁹⁴ Amandan, S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2007**, *17*, 5995–5999.
- ⁹⁵ Mai, A. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, *15*, 4656–466.
- ⁹⁶ Kouraklis, G.; Misiakos, E. P.; Theocharis, S. *Target.Oncol.*, **2006**, *1*, 34–41.
- ⁹⁷ Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 17174–17179.
-

-
- ⁹⁸ Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.; Wakisaka, Y.; Koizumi, K. *J. Antibiot.*, **1976**, *29*, 1–6.
- ⁹⁹ Marks, P. A.; Dokmanovic, M. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, **2005**, *14*, 1497–1511.
- ¹⁰⁰ Wegener, D.; Hildmann, C.; Schwienhorst, A. *Mol. Genet. Metab.*, **2003**, *80*, 138–47.
- ¹⁰¹ Khan, N.; Jeffers, M.; Kumar, S.; Hackett, C.; Boldog, F.; Khramtsov, N.; Qian, X.; Mills, E.; Berghs, S.C.; Carey, N.; Finn, P.W.; Collins, L.S.; Tumber, A.; Ritchie, J.W.; Jensen, P.B.; Lichenstein, H.S.; Sehested, M. *J. Biochem.*, **2007**, *409*, 581–589.
doi: 10.1042/BJ20070779.
- ¹⁰² Maia, A.; Altucci, L. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2009**, *41*, 199–213.
- ¹⁰³ Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. *Nature*, **1999**, *401*, 188–193.
- ¹⁰⁴ Richon, V. M.; Emiliani, S.; Verdin, E.; Webb, Y.; Breslow, R.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 3003–3007.
- ¹⁰⁵ a) Mai, A.; Massa, S.; Pezzi, R.; Simeoni, S.; Rotili, D.; Nebbioso, A.; Scognamiglio, A.; Altucci, L.; Loidl, P.; Brosch, G. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 3344–3353. b) Paris, M.; Porcelloni, M.; Binaschi, M.; Fattori, D. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 1505–1529.
- ¹⁰⁶ Kelly, W. K.; Marks, P. A. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2005**, *2*, 150–157.
- ¹⁰⁷ Wang, D. F.; Helquist, P.; Wiech, N. L.; Wiest, O. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6936–6947.
- ¹⁰⁸ Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Nosaka, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T.; Suzuki, T.; Tsuruo, T.; Nakanishi, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 4592–4597.
- ¹⁰⁹ Blander, G.; Guarente, L. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, *73*, 417–435.
- ¹¹⁰ Hu, E.; Dul, E.; Sung, C.M.; Chen, Z.; Kirkpatrick, R.; Zhang, G. F.; Johanson, K.; Liu, R.; Lago, A.; Hofmann, G.; Macarron, R.; Los Frailes, M. D.; Perez, P.; Krawiec, J.; Winkler, J.; Jaye, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *307*, 720–728.
-

-
- ¹¹¹ Johnstone, R. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2002**, *1*, 287–299.
- ¹¹² Finzer, P.; Stohr, M.; Seibert, N.; Rosl, F. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **2003**, *129*, 107–113.
- ¹¹³ Acharya, M. R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W. D. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *68*, 917–932.
- ¹¹⁴ Batova, A.; Shao, L. E.; Diccianni, M. B.; Yu, A. L.; Tanaka, T.; Rephaeli, A.; Nudelmann, A.; Yu, J. *Blood*, **2002**, *100*, 3319–3324.
- ¹¹⁵ Acharya, M. R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W. D. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *68*, 917–932.
- ¹¹⁶ Nakajima, H.; Kim, Y. B.; Terano, H.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. *Exp. Cell. Res.*, **1998**, *241*, 126–133.
- ¹¹⁷ Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 22429–22435.
- ¹¹⁸ Nielsen, T. K.; Hildman, C.; Riester, D.; Wegener, D.; Schwienhorst, A.; Ficner, R. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2007**, *63*, 270–273.
- ¹¹⁹ Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P., *Nature*, **1999**, *401*, 188–193.
- ¹²⁰ Jaiswal, D.; Karthikeyan, C.; Shrivastava S. K.; Trivedi, P. *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2006**, *5*, 345–354. b) Marks, P. A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A. *Journal of the National Cancer Institute*, **2000**, *92*, 1210–1216.
- ¹²¹ Bouchain, G.; Leit, S.; Frechette, S.; Khalil, E. A.; Lavoie, R.; Moradei, O.; Woo, S. H.; Fournel, M.; Yan, P. T.; Kalita, A.; Trachy-Bourget, M. C.; Beaulieu, C.; Li, Z.; Robert M. F.; MacLeod, A. R.; Besterman, J. M.; Delorme, D. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, *46*, 820–830
- ¹²² Vannini et al. *PNAS*, **2004**, *101*, 15064–15069.
-

-
- ¹²³ Vanommeslaeghe, K.; Loverix, S. P.; Geerlings, D. Tourwé, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 6070-6082.
- ¹²⁴ Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A.; Breslow, R.; Pavletich, N. P. *Nature*, **1999**, *401*, 188–193.
- ¹²⁵ (a) Pikul, S.; Ohler, N. E.; Ciszewski, G.; Laufersweiler, M. C.; Almstead, N. G.; De, B.; Natchus, M. G.; Hsieh, L. C.; Janusz, M. J.; Peng, S. X.; Branch, T. M.; King, S. L.; Taiwo, Y. O.; Mieling G. E. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2499–2502. (b) Michaelides, M. R.; Dellaria, J. F.; Gong, J.; Holms, J. H.; Bouska, J. J., Stacey, J.; Wada, C. K.; Heyman, R.; Curtin, M. L.; Guo, Y.; Goodfellow, C. L.; Elmore, I. B.; Albert, D. H.; Magoc, T. J.; Marcotte, P. A.; Morgan, D. W.; Davidsen S. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1553–1556.
- ¹²⁶ (a) Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N.; Saito, A.; Mariko, Y.; Yamashita, T.; Nakanishi, O. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 3001–3003. (b) Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Nosaka, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T.; Suzuki, T.; Tsuruo, T.; Nakanishi, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 4592–4597. (c) Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Nakanishi, O.; Saito, A.; Yamashita, T.; Shiraishi, Y.; Tanaka, E. EP Patent 0 847 992 A1, **1998**.
- ¹²⁷ Satya, P.; Mukta, G.; Rajive G. *Synlett*, **2000**, *31*, 1115–1118.
- ¹²⁸ Krolski, M. E.; Renaldo, A. F.; Rudisill, D. E.; Stille, J. K. *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 1170–1176.
- ¹²⁹ Katritzky, A. R.; Fan, W. Q.; Black, M.; Pernak, J. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 547–549.
-