



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea in Chimica

**Progettazione di sistemi molecolari ibridi naftalendiimide-
rutenio (III): sintesi e prospettive antitumorali**

Relatore:
Prof. Filippo Doria

Correlatore:
Alessio Maria Caramiello, Ph.D

Tesi di Laurea di
Elisabetta Bazzurro

Anno Accademico 2025/2026

ABSTRACT

DNA is traditionally associated with the canonical double-helix structure described by Watson and Crick. However, it's conformational landscape is considerably more dynamic and can give rise to a variety of non-canonical secondary structures. Among these, G-quadruplexes (G4s) represent one of the most relevant alternative DNA architectures. G4s are supramolecular structures formed by guanine-rich nucleotide sequences and are characterized by the stacking of G-quartets. Each G-quartet consists of four guanine residues arranged in a planar square-like structure and stabilized by Hoogsteen bonding interactions, with a central monovalent cation, such as K^+ or Na^+ . Multiple G-quartets can subsequently stack through π - π interactions. G4s are characterized by a high degree of structural polymorphism and can adopt different topologies depending on the arrangement and length of the loops connecting the guanine tracts (Figure 1).

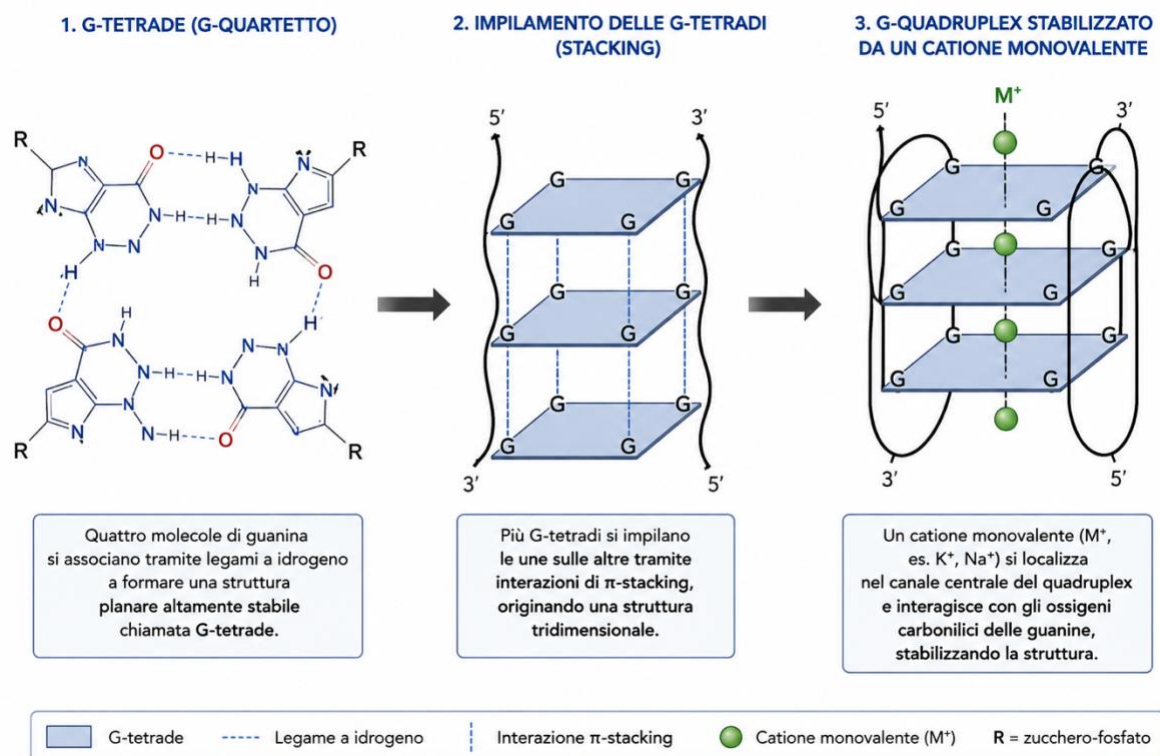


Figure 1 schematic representation of G-quadruplex formation: G-tetrad formation, stacking of G-tetrads, and stabilization of the G-quadruplex structure by a monovalent cation.

G4-forming sequences have been identified in several biologically relevant regions of the human genome, including telomeres and the promoter regions of oncogenes such as c-MYC, BCL2 and KRAS. Their ability to regulate important cellular processes, together with

their dynamic equilibrium with the unfolded DNA form, makes G4 stabilization an attractive strategy for therapeutic applications. Selective small-molecule ligands can stabilize these structures and interfere with processes such as DNA replication and transcription, potentially leading to cellular dysfunction and death. Among the different classes of G4 ligands investigated to date, naphthalene diimides (NDIs) are particularly promising because of their extended planar aromatic surface, which can promote interactions with the external G-tetrads through π - π stacking, as well as their high synthetic versatility and tunable physicochemical properties (Figure2).

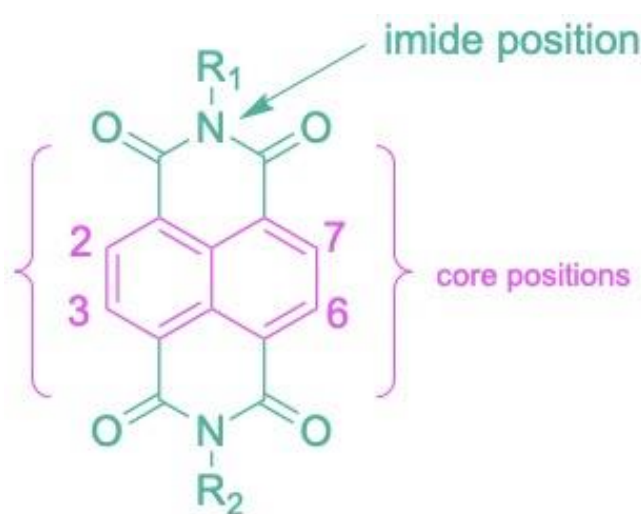


Figure 2 General structure of naphthalene diimides (NDIs).

An interesting strategy for further developing NDI-based G4 ligands is their combination with metal complexes. Ruthenium compounds have attracted considerable attention in medicinal chemistry because of their versatile coordination chemistry, tunable physicochemical properties and potential antitumor activity. Ru (III) complexes are especially interesting because their chemical properties can be modulated through ligand design and because their interaction with biological targets can be influenced by processes such as ligand exchange and reduction. The combination of an NDI scaffold with a Ru (III) centre therefore represents a promising approach for the development of multifunctional systems capable of combining G4 recognition with the chemical and biological properties of a metal complex.

The aim of this thesis was the design and synthesis of a new family of NDI–Ru (III) conjugates, conceived to combine the G4-recognition properties of the NDI scaffold with

the biological reactivity of Ru (III) complexes. To investigate the influence of the NDI side chains on the synthetic pathway and on the properties of the resulting systems, three different primary amines were introduced at the imide positions of the NDI core: N,N-dimethylpropane-1,3-diamine, 2-(2-aminoethoxy)ethan-1-ol and 3-morpholinopropan-1-amine (Figure 2). These substituents were selected to introduce different chemical and physicochemical features, including protonatable amino groups, increased hydrophilicity and modified solubility properties.

The functionalization of the NDI aromatic core was subsequently performed through microwave-assisted nucleophilic aromatic substitution (S_NAr) reactions. This approach allowed the preparation of both trisubstituted and tetrasubstituted NDI derivatives and enabled the reaction conditions to be optimized according to the different reactivity of the substrates. The introduction of 6-aminohexanoic acid as a linker provided a terminal carboxylic group suitable for subsequent conjugation with a pyridine-containing moiety, designed to act as the coordination site for the Ru (III) centre (Figure 3).

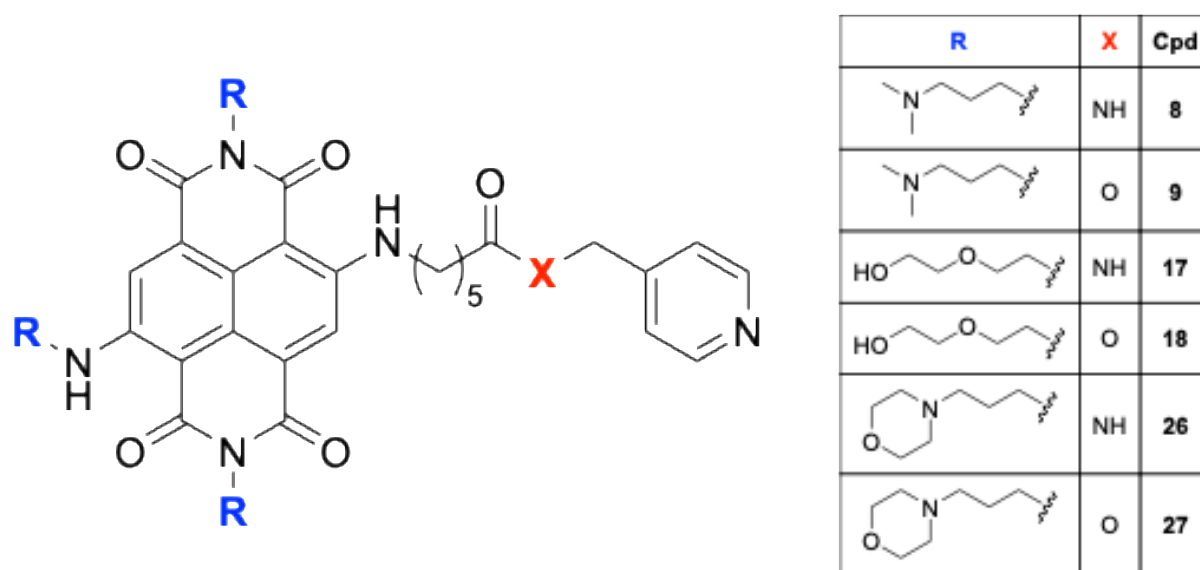


Figure 3 Schematic representation of the coupling strategies used for the functionalization of the 6-aminohexanoic acid linker with pyridine-containing moieties through amide and ester coupling

Following the functionalization of the NDI scaffold, two different coupling strategies were investigated for the introduction of the pyridine-containing moiety, based on the formation of ester and amide bonds. Both approaches were applied to the different NDI derivatives to obtain a modular series of ligands suitable for subsequent metal coordination. The coupling reactions were performed under inert atmosphere at room

temperature using anhydrous N,N-dimethylformamide as reaction solvent. Preparative reverse-phase HPLC was employed as an essential purification technique throughout the synthetic pathway, allowing the isolation of the desired NDI derivatives and their subsequent characterization.

In parallel, the Ru(III) precursor $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})_2\text{]}^-$ was synthesized and subsequently employed in coordination reactions with the functionalized NDI ligands. The complexation step represented the most critical stage of the synthetic work. Although the formation of NDI–Ru(III) species was observed and one complex could be isolated, the resulting systems displayed limited stability during purification, characterization and storage. Mass spectrometric analyses provided evidence for the formation of degradation products and species associated with the loss of the metal centre, suggesting that decomposition and/or decoordination processes may occur under the conditions employed for isolation and characterization (Figure 4).

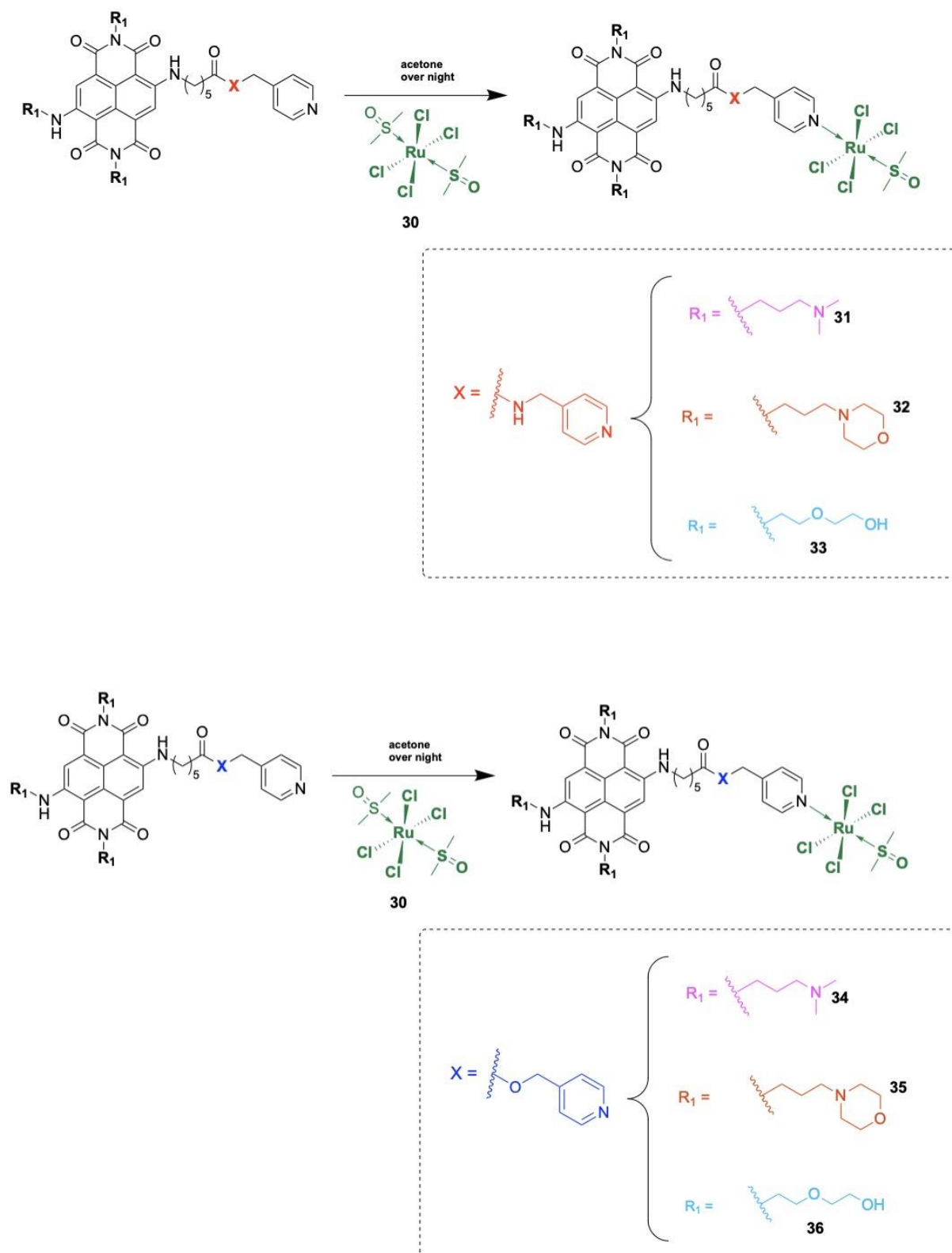


Figure 4 Schematic representation of the coordination of the functionalized NDI ligands with the Ru(III) precursor to afford NDI-Ru(III) complexes.

Overall, this work led to the development of a modular synthetic strategy for the preparation of differently functionalized NDI ligands and their subsequent conjugation with a pyridine-containing coordination site. The results obtained highlight the potential

of combining NDI-based G4 recognition with Ru (III) coordination chemistry, while also identifying the stability of the resulting NDI–Ru(III) systems as a key aspect requiring further optimization. The synthesized compounds and the established synthetic platform provide a basis for future studies aimed at improving complex stability and investigating the G4-binding properties and biological activity of these multifunctional systems.

Indice

1. INTRODUZIONE	11
1.1 I G-QUADRUPLEX.....	12
1.3 I G-QUADRUPLEX NEL GENOMA UMANO	17
1.4 G-QUADRUPLEX IN PROTO-ONCOGENI	20
1.5 IL PROBLEMA DI FINE REPLICAZIONE, TELOMERI E TELOMERASI	24
1.6 G-QUADRUPLEX COME BERSAGLI TERAPEUTICI	26
1.7 LIGANDI DEI G-QUADRUPLEX E NDI.....	27
1.7.1 NAFTALENDIIMMIDI (NDI)	28
1.8 COMPLESSI METALLICI DI RU E ATTIVITA ANTITUMORALE	31
1.8.1 MECCANISMI D'AZIONE ANTITUMORALE DEI COMPLESSI DI Ru	34
1.8.2 COMPLESSI METALLICI CON RU (III)	36
1.8.3 COMPLESSI DI RUTENIO E TARGETING SELETTIVO DEL DNA	37
2. SCOPO DELLA TESI	39
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	42
3.1 SINTESI DEL NUCLEO NAFTALENDIIMMIDICO.....	42
3.2 FUNZIONALIZZAZIONE DEL CORE NDI	45
3.2.2 SINTESI DEI DERIVATI NDI TETRASOSTITUITI	47
3.2.3 FUNZIONALIZZAZIONE DEL LINKER MEDIANTE REAZIONI DI COUPLING	50
3.3 COMPLESSAZIONE DEI DERIVATI NDI CON RUTENIO (III)	53
3.3.1 SINTESI DEL PRECURSORE DI RUTENIO (III)	53
3.3.2 SINTESI DEI COMPLESSI NDI-Ru (III)	54
4. CONCLUSIONI.....	58
5. PARTE SPERIMENTALE.....	61
5.1 CARATTERISTICHE STRUMENTALI	61
5.2 SINTESI.....	63
5.3 SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE (HRMS)	85
6. BIBLIOGRAFIA	88

1. INTRODUZIONE

Il DNA costituisce il principale deposito dell'informazione genetica e la sua organizzazione strutturale è strettamente correlata alla capacità di conservare, replicare ed esprimere tali informazioni. La determinazione della struttura del DNA rappresenta sicuramente una delle scoperte più significative delle scienze naturali del XX secolo. La descrizione della classica struttura a doppia elica ha rappresentato il punto di partenza fondamentale per lo studio delle caratteristiche strutturali e delle proprietà conformazionali del DNA. La successiva analisi delle sequenze nucleotidiche e della loro organizzazione tridimensionale ha infatti evidenziato l'esistenza di numerose conformazioni alternative rispetto alla classica doppia elica destrorsa proposta da Watson e Crick.¹ Queste strutture del DNA vengono definite "non canoniche", ed è stato dimostrato il loro coinvolgimento in numerosi processi biologici e la loro partecipazione in molti e complessi meccanismi di controllo cellulare.²

Esiste una condizione, chiamata superavvolgimento negativo del DNA, che consiste nel sottosvolgimento della doppia elica, caratterizzata da un numero di giri inferiore rispetto alla forma rilassata. Tale condizione genera una tensione torsionale nella molecola e può favorire l'apertura locale della doppia elica, facilitando l'adozione di conformazioni alternative. Il superavvolgimento negativo può quindi promuovere variazioni conformazionali dipendenti dalla sequenza, favorendo la formazione di strutture peculiari tra cui D-DNA, Z-DNA-sinistrorso, triplex e strutture a quattro filamenti.

Nel genoma eucariotico sono presenti numerose sequenze ricche di guanina che sono in grado di formare una struttura secondaria non canonica alternativa chiamata G-quadruplex (G4). Nel genoma umano, ad esempio, sono state identificate 376.000 sequenze che possono assemblarsi e dare strutture G4. Queste sequenze sono distribuite in regioni genomiche di particolare rilevanza funzionale, tra cui i promotori di numerosi protooncogeni, i telomeri, il DNA ribosomiale, l'RNA e le regioni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline.³ La loro localizzazione suggerisce un ruolo fondamentale nella regolazione di diversi processi biologici.

Tre le principali funzioni attribuite ai G4 vi è quella di agire come elementi regolatori, ovvero interruttori molecolari in grado di modulare il ripiegamento e lo svolgimento del

DNA. La loro formazione, infatti, può influenzare l'inibizione della sintesi di specifiche proteine o dell'attivazione di alcuni protooncogeni.

Proprio per il loro coinvolgimento nella regolazione dell'espressione genetica e nei meccanismi associati alla proliferazione cellulare, i G4 rappresentano oggi un importante bersaglio nella ricerca e nello sviluppo nell'ambito della *drug discovery*.⁴

1.1 I G-QUADRUPLEX

I G-quadruplex (G4) sono strutture secondarie non canoniche degli acidi nucleici che si formano prevalentemente in regioni ricche di guanina del DNA o dell'RNA a singolo filamento. L'unità strutturale fondamentale dei G4 è la G-tetrade, o G-quartetto, costituita da quattro basi di guanina disposte su un piano quadrato e stabilizzate mediante legami a idrogeno di Hoogsteen (Figura 1).

La tendenza della guanina ad autoassemblarsi deriva dal fatto che nella sua struttura ha due caratteristiche principali: 1) una serie di gruppi accettori e donatori di legame a idrogeno perfettamente complementari e 2) una superficie aromatica planare che favorisce le interazioni non covalenti di tipo π -stacking.

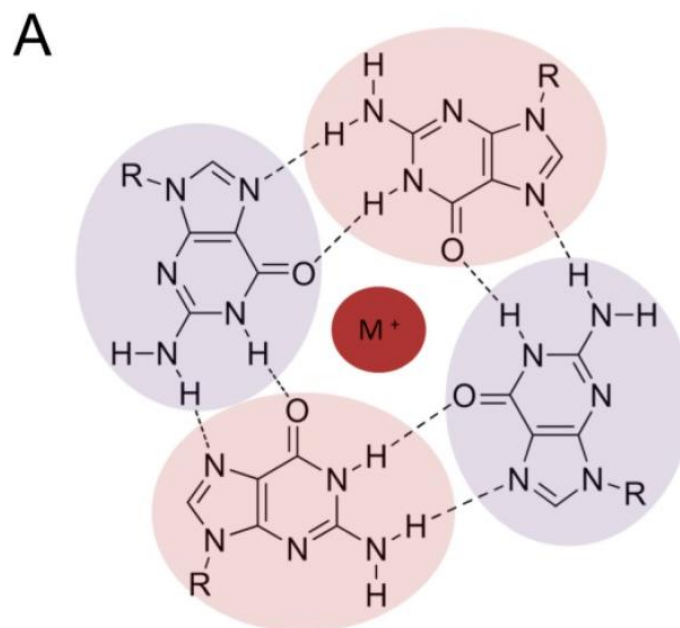


Figura 1 - Disposizione delle guanine in un G-quartetto, in rosso è rappresentato uno ione metallico che stabilizza la struttura

Dall'interazione non covalente di quattro molecole di guanina si ottiene una struttura pseudomacrociclica denominata G-tetrade o G-quartetto, stabilizzata da una rete di otto legami a idrogeno tra le basi di guanina adiacenti.¹

L'impilamento di più G-tetradi origina la struttura tridimensionale complessiva, la cui stabilità è ulteriormente aumentata dalla presenza di cationi monovalenti, in particolare ioni potassio (K^+), che si localizzano nel canale centrale della struttura neutralizzano le cariche negative generate dagli ossigeni carbonilici delle guanine. Anche gli ioni sodio (Na^+) possono contribuire alla stabilizzazione, sebbene con minore efficacia rispetto al potassio.^{5 6}(Figura 2)

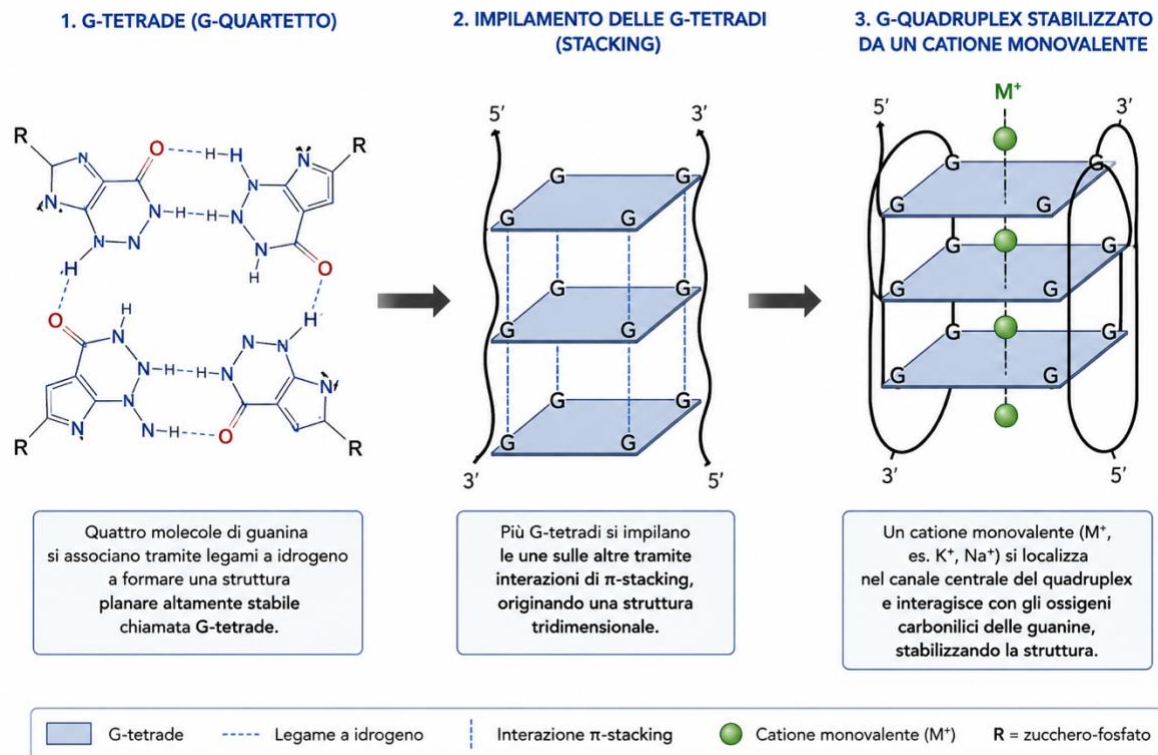


Figura 2 - Rappresentazione schematica della formazione di un G4: 1) Formazione della G-tetrade tramite associazione di quattro G, 2) impilamento delle tetradi mediante interazioni di π -stacking e 3) stabilizzazione della struttura risultante con cationi metallici monovalenti.

Rispetto alla classica struttura a doppia elica del DNA, i G4 presentano una notevole eterogeneità conformazionale, potendo assumere differenti topologie e organizzazioni tridimensionali.⁷ La loro variabilità strutturale dipende da diversi fattori tra cui:

- La natura e la lunghezza del loop, ossia dalle sequenze nucleotidiche che collegano i tratti ricchi di guanina senza partecipare direttamente alla formazione dei quartetti di guanina;^{7,8}
- L'orientamento e la polarità, dei filamenti che costituiscono il G4;⁷
- La conformazione dei legami glicosidici delle basi azotate;
- La disposizione spaziale dei loop rispetto ai filamenti coinvolti nella struttura.

A seconda dell'orientamento dei filamenti degli acidi nucleici, un G4 può organizzarsi in due diverse topologie, definendo un G4 parallelo oppure antiparalelo (Figura 3).

Un G4 parallelo si forma quando tutti e quattro i filamenti sono orientati nella stessa direzione. In questa conformazione, le guanine presenti nei G-tetradi adottano prevalentemente una conformazione anti rispetto al legame glicosidico, dando origine a una struttura caratterizzata da quattro filamenti paralleli (Figura 3A).

I G4 antiparalleli si formano invece quando almeno uno dei quattro filamenti è orientato in direzione opposta rispetto agli altri. In base alla disposizione relativa dei filamenti e alla conformazione dei loop, possono essere distinti in diverse architetture, tra cui le conformazioni antiparallele di tipo basket e chair (Figura 3C,D).

Il primo tipo di G4 antiparalelo si forma quando due filamenti procedono in direzione opposta rispetto agli altri due, e le tetradi comprendono due guanosine in conformazione syn e due una conformazione anti (syn-syn-anti-anti oppure syn-anti- syn-anti) (Figura 3C,D). Il secondo tipo di G4 antiparalelo è noto invece come ibrido (3+1): tre guanosine adottano la stessa conformazione, mentre il quarto residuo presenta la conformazione opposta (syn-anti-anti-anti oppure anti-syn-syn-syn) (Figura 3B).⁵

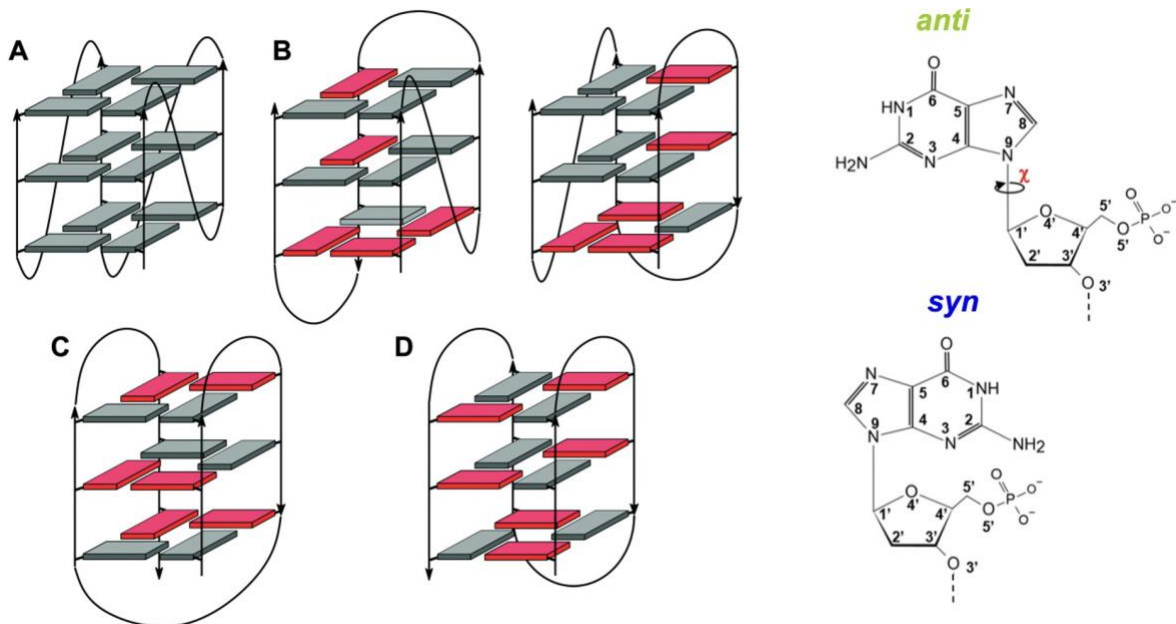


Figura 3 - Principali topologie dei G4: A) parallela, B) ibrida (3+1), C) antiparallela (basket), D) antiparallela (chair). A destra è riportata anche la conformazione syn e anti dei nucleotidi di guanosina.

In particolare, i G4 dell'RNA tendono a adottare prevalentemente conformazioni parallele e mostrano generalmente una maggiore stabilità rispetto alle strutture analoghe del DNA.⁹

Un altro elemento geometrico che influenza la stabilità di un G4 è il loop (ansa) (Figura 4), un tratto di sequenza nucleotidica a singolo filamento che collega i blocchi di guanine. Esistono tre tipo di loop differenti: a inversione doppia della catena, detto anche propeller, che collega filamenti paralleli differenti adiacenti (Figura 4G), loop diagonale, che collega due filamenti antiparalleli opposti (Figura 4E) oppure loop laterale, detto anche edgewise o lateral loop, che collega due filamenti antiparalleli adiacenti (Figura 4F).¹⁰

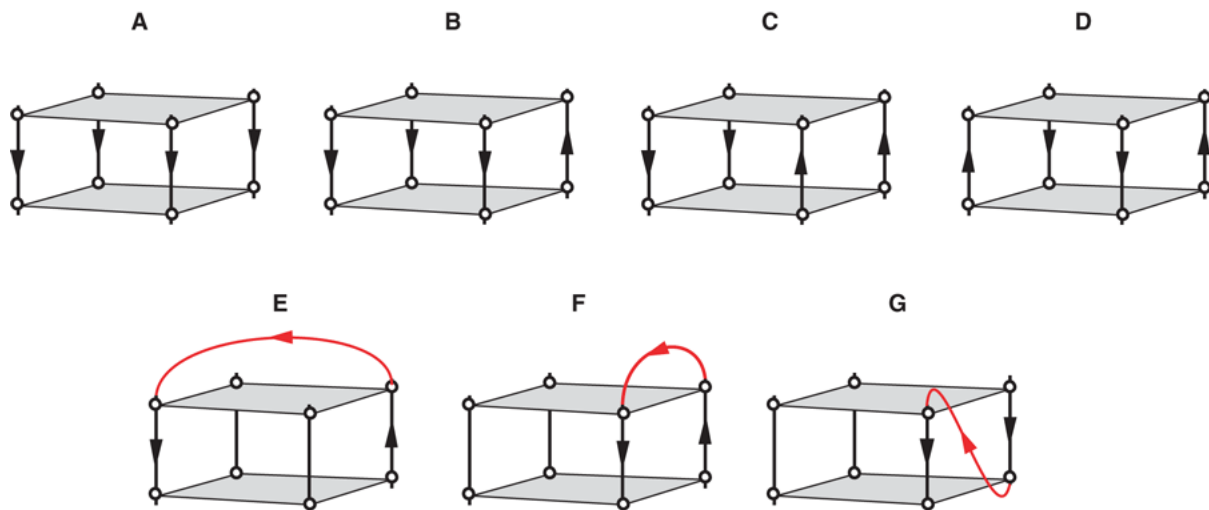


Figura 4 - I tre principali loop (anse) che collegano i blocchi di guanina.

Un ulteriore elemento strutturale che contribuisce alla caratterizzazione dei G4 sono i quattro grooves (solchi), ovvero gli spazi delimitati dagli scheletri fosfodiesterici dei quattro filamenti che costituiscono la struttura quadruplex. La loro geometria e ampiezza dipendono dalla topologia del G4 e dalla conformazione glicosidica (syn o anti) delle guanosine che delimitano ciascun solco (Figura 5). In particolare, la diversa combinazione delle conformazioni syn e anti delle guanosine adiacenti può determinare solchi di diversa ampiezza, classificabili come stretti, medi o larghi (Figura 5B). La conformazione dei grooves è quindi strettamente correlata alla topologia del G4 precedentemente descritta. Nei G4 paralleli, caratterizzati prevalentemente da guanosine in conformazioni anti, i quattro solchi presentano generalmente un'ampiezza simile e intermedia. Al contrario, nelle conformazioni antiparallele e ibride, la presenza di guanosine in conformazione syn e anti determina una maggior variabilità nella geometria dei solchi, con la possibile presenza di solchi stretti, medi e larghi. Anche i loop, descritti in precedenza, contribuiscono alla definizione della geometria complessiva della struttura e dei relativi solchi.^{11,5,12}

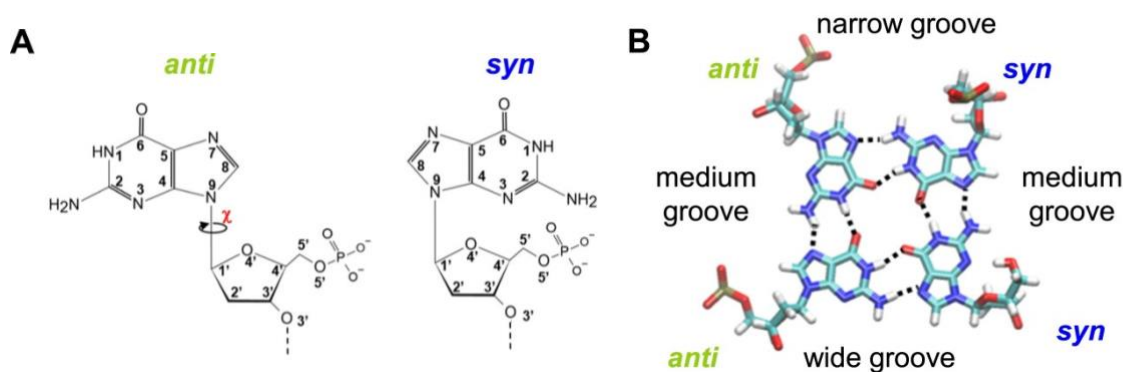


Figura 5 - Rappresentazione schematica della relazione tra A) la conformazione glicosidica (*anti* e *syn*) della guanosine e B) ampiezza dei grooves (solchi) nei G4

Anche le condizioni ambientali influenzano significativamente la stabilità e preferenza topologica dei G4. In particolare, la presenza di cationi metallici di specifici ligandi o di elevate concentrazioni saline può determinare variazioni nella disposizione dei quartetti di guanina.¹³ Infatti, oltre ai fattori già discussi finora, anche la concentrazione salina, la lunghezza e la composizione dei loop e la sequenza nucleotidica, giocano un ruolo fondamentale nella formazione dei G4.

Dal punto di vista dell'organizzazione molecolare i G4 possono essere classificati in tre principali categorie:

- INTRAMOLECOLARE (monomolecolare): derivano dal ripiegamento di un singolo filamento di acido nucleico contenente quattro regioni ricche di guanina che si associano tra loro formando la struttura G4.^{7,14}
- BIMOLECOLARE: sono costituiti dall'associazione di due filamenti distinti, ciascuno caratterizzato da due tratti ricchi di guanina. Un esempio significativo è rappresentato dalla sequenza d(G₄T₄G₄) del telomero di *Oxytricha nova*.^{7,14}
- TETRAMOLECOLARE: si formano a seguito dell'associazione di quattro filamenti indipendenti, ognuno contenente almeno una regione ricca di guanina.^{7,14}

In natura sono state identificate anche sequenze oligonucleotidiche contenenti un numero di tratti di guanina superiore a quattro. Tali sequenze possono dare origine a differenti conformazioni G4, spesso in equilibrio dinamico tra loro, evidenziando l'elevata plasticità strutturale di queste architetture molecolari.⁸

1.3 I G-QUADRUPLEX NEL GENOMA UMANO

La capacità di alcune sequenze del genoma umano di adottare conformazioni G4 è ormai nota da tempo, uno studio bioinformatico condotto da Varshney nel 2020 ha stimato che le sequenze nucleotidiche capaci di formare queste strutture non canoniche nel genoma umano possano essere superiori a sette milioni.²

Le sequenze potenzialmente in grado di formare strutture G4, comunemente indicate come *putative G-quadruplex-forming sequences* (PQS), sono generalmente caratterizzate dalla presenza di tratti ricchi di guanine separate da brevi regioni variabili e possono essere identificate mediante specifici algoritmi bioinformatici. Tra i primi strumenti sviluppati per l'identificazione delle PQS vi è Quadparser, che identifica specifici pattern di sequenza costituiti da quattro tratti consecutivi di guanine, separati da loop di lunghezza variabile.¹⁵ Successivamente, sono stati sviluppati algoritmi più flessibili, come G4Hunter, che considera anche il grado di ricchezza in guanine e la G-skewness della sequenza, e pqsfinder, in grado di identificare sequenze con imperfezioni nei tratti di guanine, come mismatch e bulge, o loop più lunghi.¹⁶

Tali sequenze risultano particolarmente rappresentate in regioni genomiche e trascrizionali di rilevanza funzionale quali telomeri, promotori genetici, origini di replicazione e regioni non tradotte degli mRNA (UTR). Questa distribuzione suggerisce che la formazione dei G4 possa contribuire alla regolazione di processi fondamentali, tra cui la replicazione del DNA, la trascrizione, la traduzione e il controllo epigenetico dell'espressione genica.^{15,17,18} La formazione, la stabilità e la funzione biologica di queste strutture sono inoltre regolate dall'interazione con specifiche proteine leganti i G4. Alcune ne favoriscono la formazione o la stabilizzazione, mentre altre, tra cui diverse elicasi, ne promuovono il rimodellamento o il disassemblaggio. L'interazione dei G4 con elicasi, proteine coinvolte nella riparazione del DNA, fattori di trascrizione e modulatori epigenetici contribuisce pertanto sia al mantenimento della stabilità genomica sia alla regolazione dell'espressione genica.^{15,17,18}

Negli ultimi anni, l'interesse verso queste strutture è aumentato notevolmente soprattutto in ambito oncologico, dove i G4 rappresentano dei promettenti bersagli terapeutici. Diversi studi hanno dimostrato che la formazione dei G4 può avvenire anche in condizioni fisiologiche, supportando così l'ipotesi di una loro rilevanza biologica in

vivo. Tra i primi studi sperimentali troviamo quelli basati su anticorpi altamente selettivi in grado di riconoscere in modo selettivo le strutture del G4, confermando così la loro presenza all'interno delle cellule.¹⁷ La dimostrazione della presenza dei G4 nel contesto cellulare e il loro coinvolgimento in processi associati alla progressione tumorale hanno portato a considerare queste strutture come potenziali bersagli per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali. In questo contesto, particolare interesse è stato rivolto alla progettazione di piccoli ligandi in grado di riconoscere e interagire selettivamente con i G4. L'obiettivo di tali molecole è stabilizzare la conformazione G4, aumentando la persistenza di queste strutture e ostacolando i processi biologici che richiedono il ripiegamento del DNA nella sua conformazione canonica a doppia elica. La stabilizzazione dei quadruplex mediante specifici ligandi può infatti interferire con i processi biologici associati a queste strutture, alterando, ad esempio la replicazione del DNA, la trascrizione o la funzione telomerica.^{2,19}

L'attività antitumorale di piccoli ligandi in grado di legare e stabilizzare i G4 è attribuita principalmente a due meccanismi molecolari:

1. *Repressione della trascrizione degli oncogeni*: oltre ai telomeri, i G4 sono presenti anche nelle regioni promotrici di numerosi oncogeni, come c-Myc, c-Kit, K-ras e HSP90, dove svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genetica. La stabilizzazione del G4 da parte di specifici ligandi va ad agire sul meccanismo di trascrizione, in particolare rende la regione meno accessibile ai fattori di trascrizione e alla RNA-polimerasi II, ostacolando così il processo. Di conseguenza, la repressione della trascrizione di questi geni determina una diminuzione della produzione di proteine coinvolte nei processi proliferativi e nei meccanismi anti-apoptotici, favorendo così l'inibizione della crescita tumorale e alla promozione della morte cellulare delle cellule neoplastiche (Figura 6).²⁰

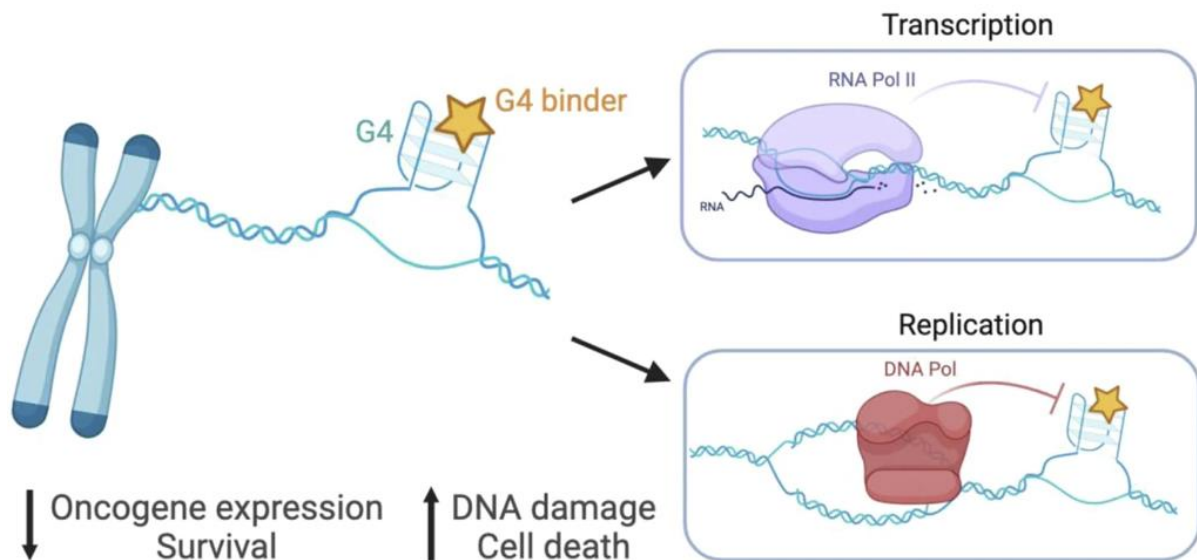


Figura 62 - La stabilizzazione del G4 tramite ligandi può portare alla regolazione dell'espressione genica.

2. *Inibizione della telomerasi e danno telomerico*: i telomeri sono regioni cromosomiche specializzate che proteggono le estremità dei cromosomi. Nell'uomo, il DNA telomerico è costituito da ripetizioni in tandem della sequenza 5'-TTAGGG-3'; il filamento ricco in guanine termina con una protrusione a sing olo filamento in direzione 3', capace di ripiegarsi formando strutture G4. Il legame di specifici leganti a tali strutture ne aumenta la stabilità e può rendere l'estremità telomerica meno accessibile alla telomerasi, il cui substrato è costituito proprio dalla protrusione 3'. La conseguente inibizione dell'attività enzimatica ostacola il mantenimento della lunghezza dei telomeri e, dopo successive divisioni cellulari, può determinarne il progressivo accorciamento, favorendo l'arresto proliferativo o la morte delle cellule tumorali dipendenti dalla telomerasi. La stabilizzazione dei G4 telomerici può inoltre interferire con la corretta replicazione e con l'organizzazione protettiva dei telomeri, inducendo stress replicativo, perdita della protezione delle estremità cromosomiche e attivazione della risposta al danno al DNA.²⁰ (Figura 7)

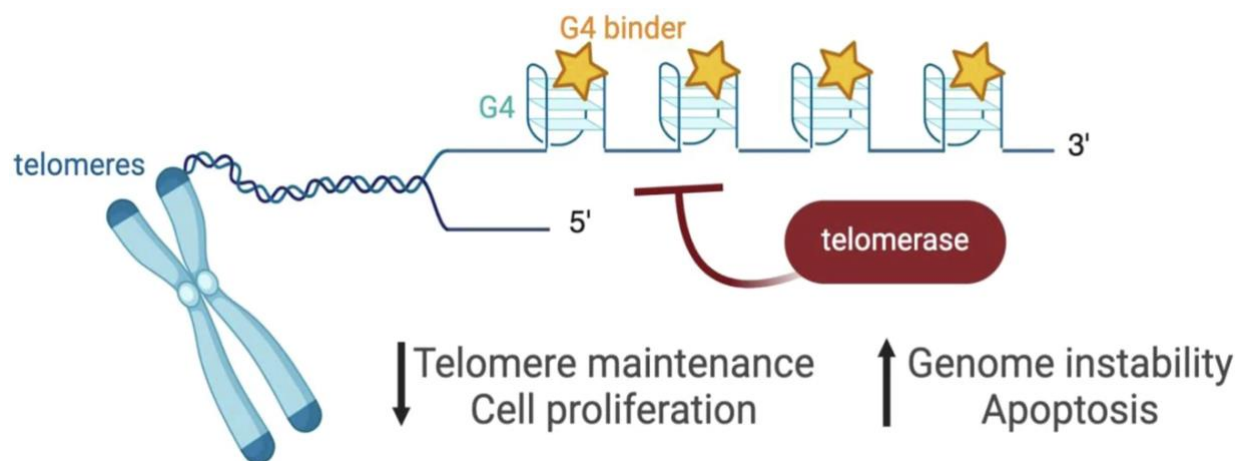


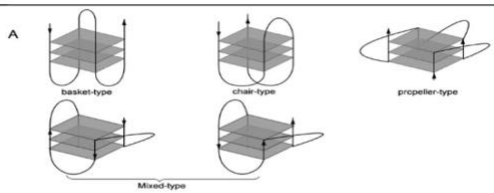
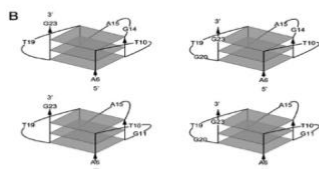
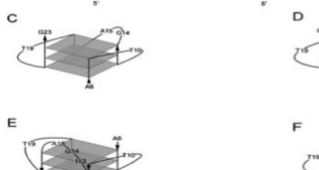
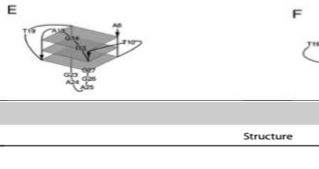
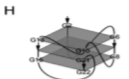
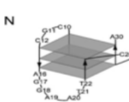
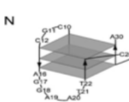
Figura 7- Stabilizzazione dei G4 telomerici mediante ligandi e conseguente inibizione dell'attività telomerasica.

1.4 G-QUADRUPLEX IN PROTO-ONCOGENI

Una delle caratteristiche più rilevanti dei G4 è la loro elevata presenza nelle regioni regolatorie del genoma umano, nello specifico nei promotori di numerosi oncogeni.

Tra i proto-oncogeni maggiormente studiati troviamo c-Myc, k-Ras, BCL-2, c-Kit, hTERT, VEGF, HIF-1 α , RET e PIM, tutti caratterizzati dalla presenza di sequenze ricche in

guanina capaci di adottare conformazioni G4 nei rispettivi promotori (Tabella 1).^{21,22}

Gene	Entry	Promoter Sequence	Structure	
Human telomere	A	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA 1 5 10 15 20 25		
c-myc	B	Pu27 TGGGAGGGGTGGGGTGGGTGGGGAGG 1 5 10 15 20 25		
	C	Myc-2345 TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA 1 5 10 15 20		
	D	Myc-1245 TGGGAGGGCTTTTATGGGTGGGGA 1 5 10 15 20		
	E	Pu24 ⁴¹ TGAGGGCTGGTGGAGGGTGGGGAGG 5 10 15 20 25		
	F	Myc22-G14T/G23T TGAGGGCTGGGTAGGGTGGGTAA 5 10 15 20 25		
Table 2. (Continued)				
Gene	Entry	Promoter Sequence	Structure	
c-kit	G	c-kit native AAGGAGGGCGCTGGGAGGAGGGGCTG 1 5 10 15 20 25		
	H	c-kit87up AAGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG 1 5 10 15 20		
	I	c-kit21 CGGGCGGGCGGAGGGGAGGGGAGGC 1 5 10 15 20 25		
bcl-2	J	Pu39 AAGGGCGGGCGGGGAGGAGGGGCGGGAGCGGGCTG 1 5 10 15 20 25 30 35		
	K	5'G4 AAGGGCGGGCGGGGAGGAGGGGCGGGAGCGGGCTG 1 5 10 15 20 25 30 35		
	L	3'G4 CGGGGAGGAGGGGCGGGAGCGGGCTG 10 15 20 25 30 35		
	M	MidG4 CGGGCGGGAGGAGGGGCGGGAGGC 10 15 20 25 30 35		
	N	MidG4-G15T/G16T CGGGCGGGAGGAGTTGGGCGGGAGGC 10 15 20 25 30		
VEGF	O	GGGGCGGGCGGGGCGGGGCTCCCGGGCGGGAG 1 5 10 15 20 25 30 35		
RET	P	TTTTTAGGGCGGGGCGGGGCGGGGCTTTT 1 5 10 15 20 25 30		
HIF-1α	Q	CGGAGGGCGGGGAGGAGGGAGGGGCGCG 1 5 10 15 20 25		
k-ras	R	GGGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA 1 5 10 15 20 25		
Rb	S	CGGGGGGTTTGGGCGGC 1 5 10 15		

[a] I = inosine base in the sequence.

[a] I = inosine base in the sequence.

Figura 8 - Principali siti promotori

Tra tutte le strutture citate precedentemente, il gene c-Myc rappresenta sicuramente il modello più studiato. Esso codifica un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione di numerosi processi cellulari, tra cui proliferazione, metabolismo, differenziamento, apoptosi e progressione cellulare. Alterazioni legate a questo gene sono state osservate in una vasta gamma di tumori umani, come ad esempio il tumore al seno, al colon e alla cervice.^{21,23}

In condizioni fisiologiche normali, l'espressione di c-Myc è strettamente legata sia a livello trascrizionale sia a livello post-trascrizionale. L'espressione del gene può essere

indotta da diversi stimoli extracellulari, tra cui fattori di crescita, citochine e segnali mitogeni.

c-Myc regola numerosi processi biologici necessari alla crescita e alla proliferazione cellulare, tra cui la biosintesi di proteine e nucleotidi, la biogenesi dei ribosomi, la glicolisi e il metabolismo mitocondriale. Inoltre, favorisce la progressione del ciclo cellulare e l'ingresso delle cellule nella fase S inducendo l'espressione delle cicline, delle chinasi ciclina-dipendenti e di numerosi enzimi coinvolti nella replicazione del DNA.^{24,25}

La sovraespressione o la deregolazione di c-Myc può invece compromettere i meccanismi che limitano la proliferazione cellulare. In particolare, c-Myc può reprimere l'espressione di regolatori negativi del ciclo cellulare, quali p21 e p27, favorendo il superamento dei segnali antiproliferativi e della senescenza. La preesistenza di questo programma proliferativo può quindi contribuire, insieme ad altre alterazioni molecolari, all'acquisizione di un fenotipo cellulare immortalizzato e alla trasformazione neoplastica. Accanto alla sua attività proliferativa, c-Myc possiede anche una funzione pro-apoptotica: in condizioni di stress cellulare o in assenza di adeguati segnali di sopravvivenza, livelli elevati e persistenti della proteina possono attivare l'apoptosi attraverso meccanismi dipendenti e indipendenti da p53, coinvolgendo anche altre proteine della famiglia BCL-2. Questa risposta costituisce un meccanismo di protezione volto a impedire la proliferazione di cellule caratterizzate da un'attivazione oncogenica anomala. La trasformazione tumorale associata a c-Myc richiede spesso anche l'alterazione dei circuiti apoptotici. La deregolazione del gene *MYC* rappresenta, infatti, uno degli eventi molecolari più frequenti nelle neoplasie.²⁴

La sovraespressione del gene è stata osservata in oltre il 70 % dei tumori umani, mentre la deregolazione può derivare da amplificazioni genetiche, traslocazioni cromosomiche, mutazioni delle regioni regolatorie oppure dall'attivazione continua delle vie di segnalazione oncogeniche, tra cui troviamo RAS/MAPK, Wnt/ β -Catenina, Notch e ¹⁶PI3K/AKT. Un aumento dell'espressione del gene *MYC* può quindi favorire una proliferazione incontrollata, un aumento dell'attività metabolica e una maggiore capacità delle cellule tumorali di sopravvivere in condizioni ambientali favorevoli.^{25,26}

La trascrizione del gene *MYC* è regolata anche dall'elemento NHE III₁ (Nuclease Hypersensitive Element III₁), localizzato nel promotore del gene. Il filamento ricco in guanine di questa regione contiene la sequenza Pu27, costituita da 27 nucleotidi, capace

di formare un G4 prevalentemente parallelo. L'equilibrio tra la conformazione duplex, lo stato a singolo filamento e la struttura G4 agisce come un interruttore molecolare: la formazione del G4 è associata alla repressione della trascrizione, mentre la sua risoluzione favorisce il legame dei fattori trascrizionali e la riattivazione dell'espressione di *MYC*.^{27,23}

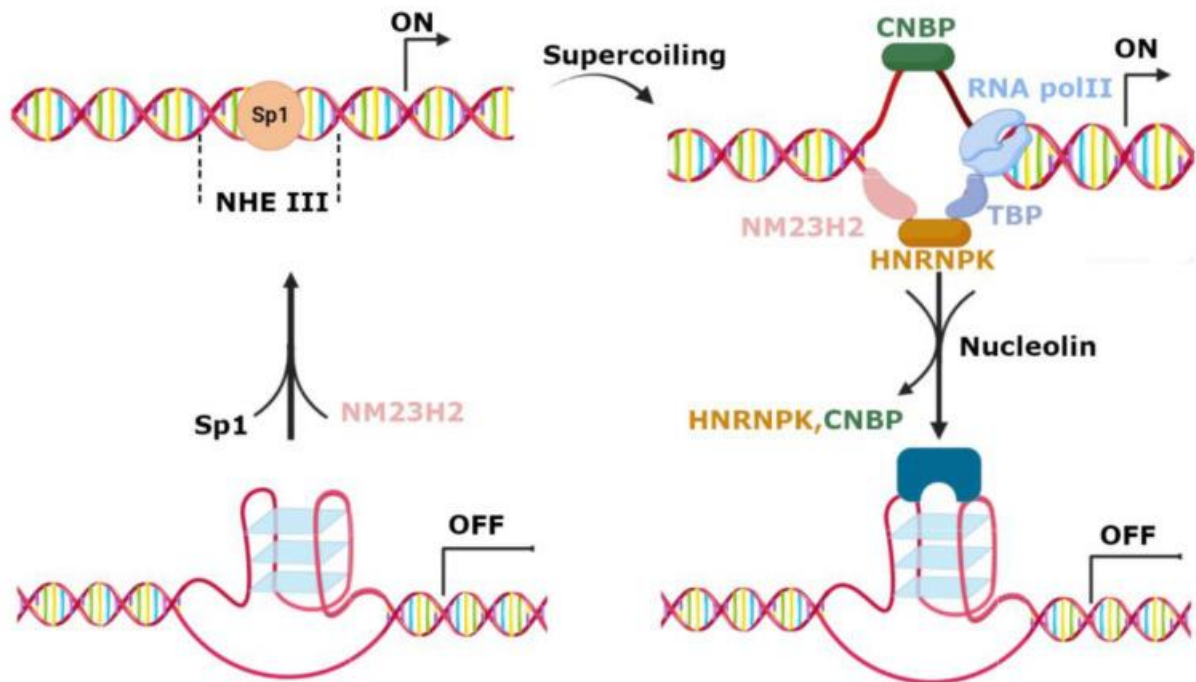


Figura 93 - Rappresentazione schematica del controllo della trascrizione di *MYC* mediato dall'equilibrio dinamico tra la formazione e la risoluzione del G4 presente nel promotore

Questo equilibrio dinamico è modulato da numerose proteine. La nucleolina riconosce e stabilizza il G4 del promotore, favorendo così la repressione trascrizionale; NM23-H₂ ne promuove la risoluzione, mentre CNBP riconosce la forma a singolo filamento e contribuisce all'attivazione della trascrizione (Figura 9).^{27,28}

Il G4 del promotore di *MYC* rappresenta pertanto un potenziale bersaglio farmacologico. Numerosi ligandi, tra cui TMPyP4, BRACO-19, piridostatina, e derivati delle naftalendiimmidi, sono stati studiati per la loro capacità di stabilizzare i G4 mantenendo così il promotore in uno stato trascrizionale inattivo. Successivamente, dopo gli studi fatti sul c-Myc sono stati identificati altri G4 funzionali anche nei promotori di altri oncogeni; tra i più studiati e citati troviamo c-KIT, BCL-2, VEGF, k-Ras, RET e HIF-1 α . In questi geni la formazione del G4 modula la trascrizione con meccanismi analoghi a quelli citati per il gene c-Myc.²¹

1.5 IL PROBLEMA DI FINE REPLICAZIONE, TELOMERI E TELOMERASI

La replicazione del DNA è un processo essenziale per garantire il corretto passaggio di informazioni genetiche dalla cellula madre alle cellule figlie durante ogni ciclo cellulare. La replicazione avviene tramite un meccanismo semiconservativo, dove ciascun filamento della doppia elica funge da stampo molecolare per la sintesi di un nuovo filamento complementare. Questo processo di sintesi viene catalizzato dalla DNA polimerasi, enzima in grado di sintetizzare il DNA in direzione $5' \rightarrow 3'$.²⁹

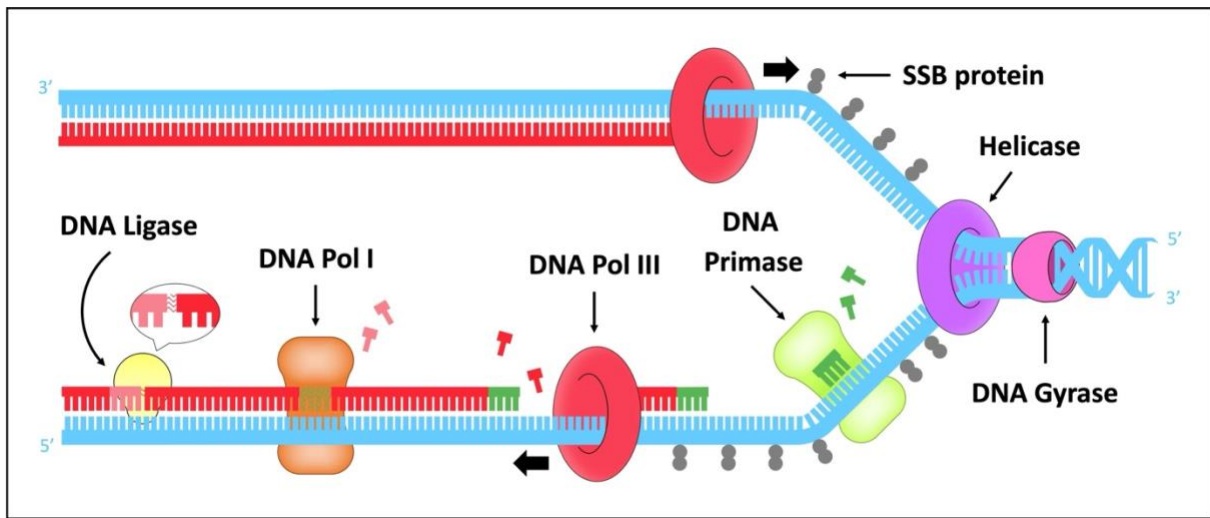


Figura 104 - Rappresentazione schematica del meccanismo semiconservativo di replicazione del DNA.

Il *leading strand* viene prodotto in modo continuo, mentre il *lagging strand* viene sintetizzato in maniera discontinua sotto forma di frammenti di Okazaki, successivamente uniti dall'enzima DNA-ligasi.³⁰

Nei cromosomi lineari delle cellule eucariotiche, la rimozione dell'ultimo primer di RNA del *lagging strand* lascia un tratto terminale che non può essere terminato poiché manca un'estremità 3'-OH libera dalla quale la DNA polimerasi possa proseguire la sintesi. Questo fenomeno, noto come *end-replication problem*, contribuisce al progressivo accorciamento delle estremità dei cromosomi ad ogni ciclo replicativo (Figura 11).^{29,31}

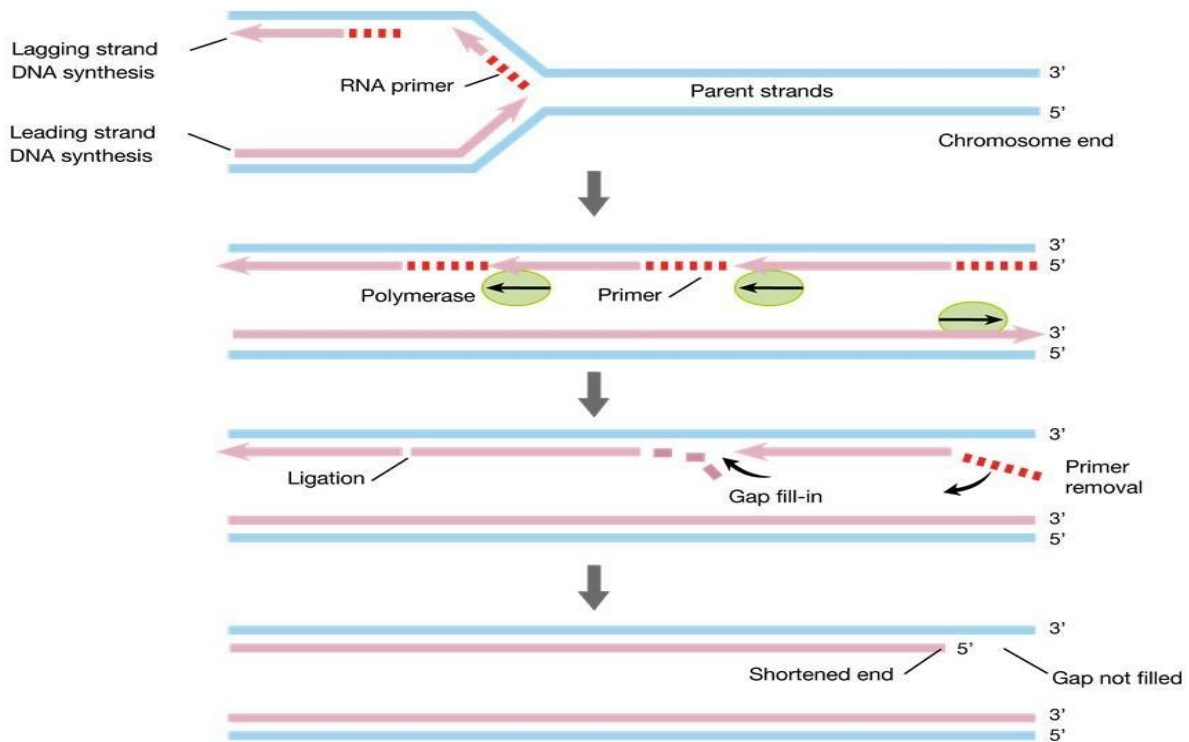


Figura 115 - Origine del problema della replicazione terminale nei cromosomi lineari.

Tuttavia, anche se si verifica questo fenomeno, non si ha un'immediata perdita di informazioni genetiche grazie ai telomeri. Tali strutture proteggono le estremità cromosomiche dalla degradazione, dalla fusione e dall'attivazione inappropriata della risposta al danno al DNA. Nell'uomo la sequenza telomerica è costituita dalla ripetizione 5'-TTAGGG-3', e termina con una regione a singolo filamento ricco in guanina, chiamata G-overhang, molto importante per il mantenimento dell'integrità cromosomica, poiché riesce a favorire la formazione della T-loop (che costituisce il substrato di riconoscimento della telomerasi) e soprattutto è in grado di ripiegarsi formando il G4.

Durante ogni ciclo ripetitivo però, i telomeri vengono progressivamente accorciati fino ad arrivare ad una lunghezza critica. Una volta raggiunta, vengono attivati i sistemi di risposta al danno al DNA (DDR, DNA damage response) che portano all'arresto permanente del ciclo cellulare o all'apoptosi cellulare. Questo meccanismo è la principale via del controllo della proliferazione cellulare e contribuisce al mantenimento della stabilità genomica.³²

Nelle cellule staminali, germinali e nella maggior parte delle cellule tumorali questo accorciamento viene fermato dalla telomerasi. Quest'ultima è un enzima, nello specifico una ribonucleoproteina, che possiede attività di trascrittasi inversa. Questa

macrostruttura contiene una subunità catalitica TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) e un RNA interno, che contiene la sequenza utilizzata come stampo molecolare per la sintesi di nuove ripetizioni telomeriche all'estremità 3' dei cromosomi. Grazie a queste strutture la telomerasi riesce a ripristinare delle lunghezze telomeriche e questo consente alle cellule di continuare a proliferare.³¹ Nella maggior parte delle cellule somatiche adulte, l'attività della telomerasi è bassa o spesso assente. L'accorciamento dei telomeri, durante la divisione cellulare, progredisce progressivamente fino al raggiungimento del limite di Hayflick, oltre al quale la cellula entra in senescenza. La riattivazione della telomerasi nelle cellule tumorali consente invece il mantenimento dei telomeri e favorisce una proliferazione prolungata. Il sistema telomeri-telomerasi rappresenta pertanto un importante bersaglio per lo sviluppo di strategie antitumorali. In questo contesto, i ligandi capaci di stabilizzare i G4 telomerici sono studiati come potenziali agenti terapeutici, poiché possono ostacolare l'azione della telomerasi e indurre disfunzione telomerica, arresto della proliferazione e, in alcuni casi, apoptosi (Figura 9).^{33,34}

Figura 126 – Stabilizzazione dei G4 telomerici mediante leganti e conseguente interferenza con il mantenimento dei telomeri.

1.6 G-QUADRUPLEX COME BERSAGLI TERAPEUTICI

L'elevata frequenza dei G4 nei promotori dei proto-oncogeni e nelle regioni telomeriche, insieme al loro coinvolgimento nella regolazione dell'espressione genica e nel mantenimento dei telomeri, ha portato a considerarli promettenti bersagli terapeutici per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali.^{22,35}

La stabilizzazione farmacologica dei G4 mediante specifici ligandi rappresenta una potenziale strategia per interferire con processi che sostengono la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali. A livello dei telomeri, la stabilizzazione dei G4 formati nella protrusione 3' ricca in guanine può limitare l'accesso e l'attività della telomerasi, ostacolando il mantenimento del telomero. La stabilità della struttura del G4 riesce anche a compromettere il corretto assemblaggio del complesso shelterin, determinando così disfunzione telomerica, attivazione della risposta al danno al DNA, instabilità cromosomica e, a seconda del contesto cellulare, induzione della senescenza replicativa o apoptosi.^{22,35,36}

Le strutture G4 sono presenti anche nei promotori di geni coinvolti nella crescita, nel metabolismo e nella sopravvivenza cellulare; la loro stabilizzazione può modificare il reclutamento dei fattori regolatori, portando così ad una riduzione dell'espressione di protooncogeni, tra cui *MYC*, *KRAS*, *BCL-2*, *c-KIT* e *VEGF*. Questi geni riescono a regolare processi di crescita cellulare, il metabolismo, l'angiogenesi e la resistenza all'apoptosi. La modulazione dei G4 risulta essere quindi un approccio in grado di colpire simultaneamente molteplici vie di segnalazione coinvolte nella progressione tumorale. L'attività regolatoria dei G4 dipende dall'equilibrio dinamico tra la doppia elica e le conformazioni alternative assunte dal DNA. Esistono ligandi che sono capaci di stabilizzare selettivamente la conformazione ripiegata del G4 spostando così l'equilibrio quasi completamente verso la forma del G4, alterando l'attività dei telomeri e dei promotori genetici, limitando così la proliferazione delle cellule neoplastiche. Per queste ragioni, i G4 sono studiati come promettenti bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci antitumorali innovativi, sebbene l'efficacia di questo approccio dipenda dalla capacità dei ligandi di riconoscere selettivamente specifiche strutture G4.³⁵⁻³⁸

1.7 LIGANDI DEI G-QUADRUPLEX E NDI

Negli ultimi anni, la ricerca nell'ambito della chimica farmaceutica e organica si è focalizzata sullo sviluppo di piccole molecole in grado di riconoscere e stabilizzare le strutture G4.

Uno degli obiettivi principali è ottenere ligandi in grado di discriminare le strutture G4 dal DNA a doppia elica e, possibilmente, di riconoscere specifiche topologie o sequenze. Una maggiore selettività potrebbe infatti limitare gli effetti fuori bersaglio (off-target) e consentire una modulazione più mirata di processi associati alla trasformazione neoplastica.

I primi ligandi descritti in letteratura derivavano prevalentemente da composti inizialmente sviluppati come intercalanti del DNA duplex e mostravano una limitata selettività nei confronti dei G4. La progressiva caratterizzazione delle loro proprietà strutturali ha successivamente favorito la progettazione razionale di molecole caratterizzate da elevata affinità e migliore selettività nei confronti delle strutture G4.

Per progettare un ligando in grado di interagire in modo efficace con un G4, alcune caratteristiche fondamentali dovrebbero essere garantite: la molecola dovrebbe 1) possedere un'ampia superficie aromatica planare che permetta di instaurare forti interazioni $\pi-\pi$ con $\pi-\pi$ le tetradi di guanina terminali, 2) avere catene laterali protonabili o cariche positivamente che favoriscano l'interazione elettrostatica con lo scheletro fosfodiesterico del DNA e con le anse del G4, contribuendo ad aumentare la stabilità e 3) essere decorata con gruppi funzionali idrofili per migliorare la solubilità in ambiente fisiologico e ottimizzare le proprietà farmacocinetiche della molecola.

Sulla base di questi criteri, sono state sviluppate diverse classi di ligandi, tra cui porfirine, perilendiimmidi (PDI), naftalendiimmidi (NDI), acridine, carbazoli e complessi metallici, molti dei quali hanno mostrato promettente attività antitumorale in studi preclinici.^{22,35,38}

Tra essi, le NDI hanno suscitato particolare interesse grazie alla planarità del nucleo aromatico, alla facilità di sintesi e funzionalizzazione e alla notevole affinità nei confronti delle strutture G4.

1.7.1 NAFTALENDIIMMIDI (NDI)

Tra le numerose classi di ligandi sviluppate per il riconoscimento selettivo dei G4, le naftalendiimmidi (NDI) rappresentano uno degli scaffold molecolari più promettenti.

L'elevata planarità del nucleo aromatico, la sua rigidità conformazionale e le favorevoli proprietà elettroniche consentono alle NDI di interagire prontamente con le tetradi terminali di guanina attraverso interazioni di tipo π -stacking, stabilizzando in modo efficace la struttura del G4 con elevata specificità e selettività. Il nucleo delle NDI possiede una natura elettronpovera data dalla presenza dei due gruppi carbonilici delle immidi; questa caratteristica conferisce alle NDI proprietà elettroniche fondamentali che le rende capaci di partecipare a processi di trasferimento elettronico e a interazioni π -stacking con i sistemi aromatici presenti anche in ambiente biologico. Inoltre, la natura elettron-deficiente del core aromatico delle NDI e la sua estesa superficie aromatica favorisce interazioni con le basi nucleiche, mentre i sostituenti introdotti nelle posizioni imidiche e/o del core possono modulare l'affinità e la selettività verso differenti topologie di G4.³⁹ La struttura generale delle NDI può essere facilmente modificata attraverso la funzionalizzazione delle posizioni imidiche terminali e delle posizioni esterne del core

naftalenico aromatico, permettendo così di modulare in maniera indipendente le proprietà optoelettroniche, steriche e di solubilità della molecola.

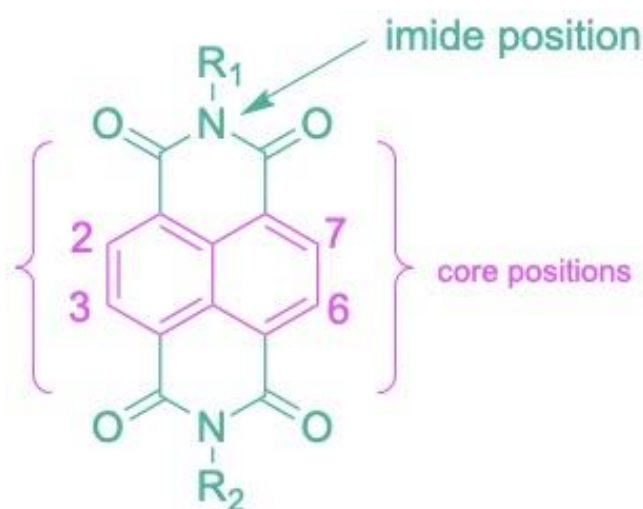


Figura 137 - Struttura generale delle NDI

Una delle principali caratteristiche delle NDI è infatti la loro elevata modularità strutturale. Le posizioni immidiche possono essere funzionalizzate mediante l'impiego di differenti ammine: la reazione di immidazione dell'anidride di partenza, permette infatti di introdurre catene laterali aromatiche, alifatiche, idrofobe o idrofile. Tali modifiche consentono di modulare parametri fondamentali quali la solubilità in ambiente acquoso, la carica complessiva della molecola, la capacità di interagire con il DNA e la distribuzione intracellulare. La funzionalizzazione eseguita sul core aromatico, in particolare in posizione 2,3,6 e 7 come mostrato in Figura 13, consente di modificare le proprietà ottiche, elettroniche o fotofisiche della molecola e di introdurre ulteriori gruppi funzionali, che possono essere uguali o diversi rispetto ai gruppi introdotti nelle posizioni immidiche.^{39,40} La possibilità di coniugare le NDI con ulteriori unità funzionali, quali fluorofori, biomolecole o complessi metallici, apre la possibilità di sviluppare sistemi multifunzionali nei quali le proprietà di riconoscimento del G4 siano integrate con ulteriori attività biologiche o fotofisiche.^{35,40-42}

Dal punto di vista sintetico, una delle strategie per la preparazione dei derivati NDI prevede l'utilizzo della dianidride 1,4,5,8-naftalenetetracarbossilica (NDA) come materiale di partenza. La conversione delle due funzioni anidridiche in gruppi immidici avviene attraverso una reazione fondamentale che è l'immidazione con ammine primarie. Nel presente lavoro, la funzionalizzazione delle posizioni immidiche è stata

ottenuta mediante l'impiego di differenti ammine, selezionate in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche desiderate per i derivati NDI.

L'introduzione di atomi di bromo nel nucleo aromatico delle NDI consente la successiva funzionalizzazione mediante reazioni di sostituzione nucleofila aromatica (S_NAr), permettendo di introdurre differenti gruppi funzionali (Figura 14).^{41,43}

Questa combinazione di strategie sintetiche rende le NDI particolarmente adatte alla progettazione razionale di molecole multifunzionali estremamente importanti.

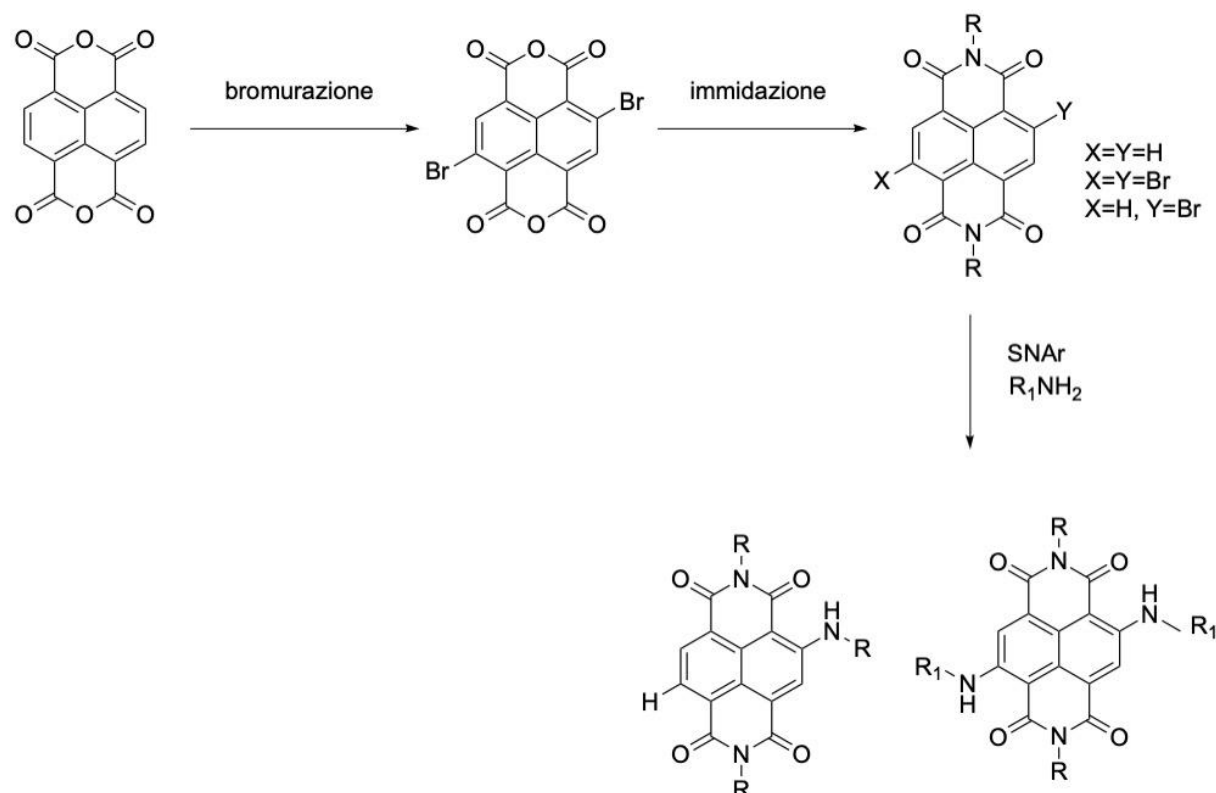


Figura 148 - Schema generale della sintesi delle NDI e dei loro derivati.

Oltre alla facilità di modulazione delle proprietà elettroniche, la struttura planare delle NDI ha un ruolo estremamente importante nel riconoscimento delettivo delle strutture non canoniche del DNA, in particolare dei G4. Infatti, le NDI riescono a interagire con queste strutture attraverso interazioni non covalenti, come ad esempio:

- Interazioni π -stacking;
- Interazioni elettrostatiche;
- Interazioni con solchi e anse (grooves e loops).

L'insieme di tutte queste caratteristiche ha portato allo sviluppo di numerosi derivati NDI potenzialmente utilizzabili come ligandi per i G4 consentendo di modulare le loro proprietà attraverso diverse strategie di funzionalizzazione.

L'introduzione di gruppi cationici o protonabili può favorire l'interazione elettrostatica con il backbone fosfato del DNA e contribuire alla stabilizzazione del complesso ligando-G4. Allo stesso tempo, la presenza di sostituenti idrofili può migliorare la solubilità in ambiente acquoso e influenzare la distribuzione intracellulare del composto. La possibilità di intervenire simultaneamente sul core aromatico e sulle posizioni immidiche permette quindi di ottimizzare l'approccio e agire su più proprietà differenti, come affinità per il G4, selettività rispetto al DNA duplex, solubilità e capacità di attraversare le membrane cellulari. Questo approccio ha portato allo sviluppo di NDI sempre più sofisticate, nelle quali la struttura molecolare viene progettata per combinare il riconoscimento del G4 con specifiche proprietà biologiche e farmacologiche.

Nel complesso, l'elevata modularità sintetica, la possibilità di controllare le proprietà elettroniche e la capacità di interagire con le strutture G4 rendono le NDI una piattaforma molecolare estremamente versatile per lo sviluppo di nuovi sistemi bioattivi.

La possibilità di combinare le proprietà di riconoscimento degli acidi nucleici proprie dei ligandi organici con le caratteristiche chimiche e biologiche dei centri metallici ha portato allo sviluppo di sistemi metallo-organici multifunzionali. In questo contesto, la coniugazione dello scaffold NDI con centri metallici rappresenta una strategia interessante per integrare le proprietà di riconoscimento dei G4 con ulteriori caratteristiche chimiche biologiche.³⁹

1.8 COMPLESSI METALLICI DI RU E ATTIVITA ANTITUMORALE

Lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali rappresenta il focus principale della ricerca farmacologica, a causa della complessità dei meccanismi molecolari coinvolti nella trasformazione neoplastica e dalla frequente insorgenza di fenomeni di resistenza ai trattamenti convenzionali. In questo contesto di ricerca si inseriscono i farmaci basati su metalli di transizione; questi ultimi hanno destato un notevole interesse grazie alle proprietà chimiche peculiari degli elementi metallici, che consentono di ottenere modalità di interazione con i bersagli biologici difficilmente accessibili in loro assenza. La possibilità di modulare la geometria di coordinazione, lo stato di ossidazione, la carica e la natura dei ligandi permette infatti di progettare composti con proprietà chimico-fisiche e biologiche altamente diversificate e specifiche.^{44,45}

L'interesse verso i metallo-farmaci in ambito oncologico è stato inizialmente stimolato dalla scoperta dell'attività antitumorale dei complessi di platino, in particolare del cisplatino, il cui meccanismo d'azione è principalmente associato alla formazione di addotti covalenti con il DNA e alla conseguente alterazione della sua struttura. Sebbene i farmaci a base di platino abbiano dimostrato una notevole efficacia clinica⁴⁶, il loro impiego è spesso limitato dalla comparsa di fenomeni di resistenza e dalla presenza di effetti collaterali sistematici. Queste problematiche hanno portato alla ricerca di nuove strategie e alla scoperta di nuovi composti metallici caratterizzati da meccanismi di azione alternativi e da differenti profili farmacologici. I complessi di rutenio hanno suscitato particolare interesse nella comunità scientifica, a causa della loro elevata versatilità chimica e alla possibilità di sviluppare farmaci caratterizzati da differenti proprietà biologiche e meccanismi d'azione.^{46,47} I complessi di rutenio possono infatti presentare differenti geometrie di coordinazione e stati di ossidazione, principalmente gli stati di ossidazione metallica +2 e +3 influenzano significativamente la stabilità, la reattività e le modalità di interazione con le biomolecole. Inoltre, la possibilità di modificare la sfera di coordinazione del metallo attraverso la scelta di opportuni ligandi permette di modulare parametri importanti come la carica, la solubilità, la lipofilia e la capacità di interagire con specifici bersagli cellulari. Questa notevole flessibilità ha portato allo sviluppo di numerosi complessi-metallici di rutenio con potenziale attività antitumorale; alcuni di questi complessi sono riusciti a raggiungere la fase I dei test clinici, come ad esempio NAMI-A e KP1019, due complessi che apparentemente si assomigliano a livello strutturale ma hanno mostrato profili biologici significativamente diversi (Figura 15)

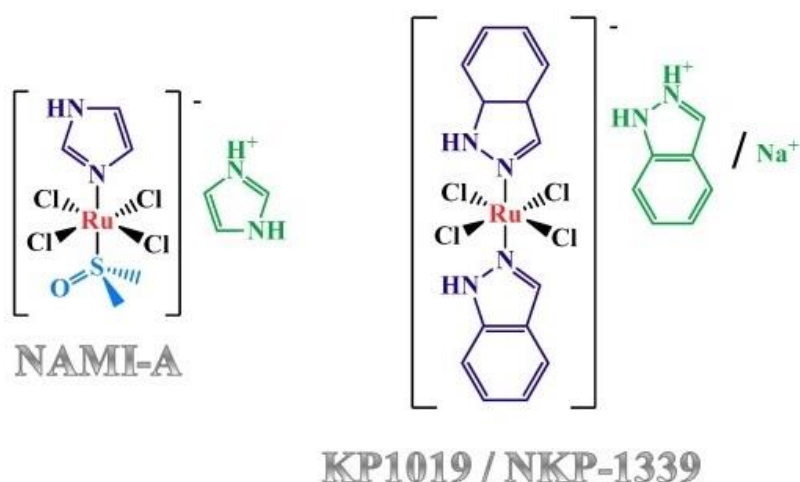


Figura 159 - Rappresentazione schematica dei complessi di Ru(III) attualmente in fase clinica avanzata di sperimentazione.

Il NAMI-A è stato principalmente studiato per la sua attività antimetastatica, mentre il KP1019 ha evidenziato una maggior attività citotossica e antiproliferativa nei confronti di diversi tumori, tra cui tumori resistenti al cisplatino. Anche NKP-1339, che è l' analogo del KP1019 più solubile in ambiente fisiologico ha raggiunto i test clinici, evidenziando così un significativo interesse farmacologico suscitato dai complessi di Ru(III).^{45,47}

Parallelamente, sono stati sviluppati numerosi complessi a basi di Ru(II), tra cui i complessi organometallici arene-rutenio della famiglia RAPTA, come il RAPTA-C.^{45,47,48} Questi sistemi hanno attirato particolare attenzione per la possibilità di modulare la reattività del centro metallico attraverso la progettazione dei ligandi e per le loro promettenti proprietà antitumorali. L'ampia varietà di complessi di Ru(II) e Ru(III) studiati dimostra quindi come la progettazione di nuovi agenti antitumorali, capaci di agire attraverso meccanismi di azione differenti e potenzialmente complementari, sia di primaria importanza nella medicinal chemistry.⁴⁸ La versatilità dei complessi di rutenio consente inoltre di combinare le proprietà con quelle di scaffold organici dotati di specifiche capacità di riconoscimento molecolare. In questo contesto, l'impiego dello scaffold NDI come componente organica di un complesso di rutenio rappresenta una strategia interessante per integrare la capacità delle NDI di riconoscere e interagire con le strutture G4 con le caratteristiche chimiche e biologiche proprie del centro metallico. La presenza del rutenio può infatti introdurre ulteriori proprietà, quali la possibilità di modulare lo stato di ossidazione, la reattività e le interazioni con le biomolecole, mentre la componente NDI può contribuire al riconoscimento del bersaglio G4. La combinazione delle due componenti permette quindi di progettare sistemi multifunzionali nei quali le

proprietà delle singole unità possono contribuire in modo complementare all'attività complessiva del composto. In questo contesto si inserisce il presente lavoro, nel quale è stata sviluppata una piattaforma NDI-Ru (III), progettata per combinare le proprietà di interazione dello scaffold NDI, con le caratteristiche chimiche e biologiche del complesso di rutenio (III).^{35,40-42}

1.8.1 MECCANISMI D'AZIONE ANTITUMORALE DEI COMPLESSI DI Ru

L'attività antitumorale dei complessi di rutenio è il risultato di un insieme di meccanismi biomolecolari che possono differire significativamente in funzione della struttura chimica del complesso, dello stato di ossidazione del metallo e della natura dei ligandi coordinati. I complessi di rutenio possono interagire con molteplici bersagli cellulari, tra cui il DNA e l'RNA, le proteine, e gli organelli intracellulari. L'attività biologica inoltre può dipendere dalla capacità del complesso di raggiungere specifici compartimenti cellulari e dalla sua trasformazione in ambiente fisiologico. Per questo motivo, il meccanismo d'azione di questi complessi è essenziale e soprattutto bisogna considerare l'interazione, complessa, tra le proprietà chimiche del metallo, il comportamento dei ligandi e le caratteristiche del microambiente cellulare.⁴⁵

Uno dei principali meccanismi con cui i complessi di rutenio possono esercitare attività antitumorale è rappresentato dall'interazione con gli acidi nucleici. A seconda della struttura, il complesso può interagire con il DNA secondo differenti modalità, che comprendono interazioni elettrostatiche con lo scheletro fosfodiesterico, interazioni nei solchi del DNA, intercalazioni di ligandi aromatici e, per alcuni complessi, coordinazione a specifici siti nucleofili delle basi azotate. Queste interazioni risultano essere importanti per modificare la struttura dell'acido nucleico e interferire con processi fondamentali quali la replicazione e trascrizione, contribuendo così all'arresto della proliferazione cellulare. La capacità di interagire con il DNA dipende fortemente dalla struttura del complesso e non rappresenta necessariamente il meccanismo principale per tutti i derivati del rutenio.

Un altro aspetto importante è dato dalla possibilità di indirizzare i complessi di rutenio verso specifiche strutture secondarie del DNA, in particolare verso i G4. In questo caso, la componente organica del complesso è fondamentale, in quanto fornisce una superficie aromatica in grado di interagire direttamente con le G-tetraedri terminali

attraverso interazioni $\pi - \pi$; contemporaneamente, il complesso metallico contribuisce a modulare la carica e la geometria complessiva del sistema. La stabilizzazione di queste strutture localizzate nei telomeri o nelle regioni di protooncogeni può interferire con processi essenziali per la proliferazione delle cellule tumorali, rappresentando così un possibile meccanismo di azione complementare rispetto alle interazioni con il DNA duplex.

Un altro meccanismo di azione importante è rappresentato dall'induzione dell'apoptosi. Infatti, diversi complessi di rutenio sono associati all'attivazione di vie pro-apoptotiche, attraverso alterazioni della funzione mitocondriale, modificazioni del potenziale di membrana e attivazione della caspasi.⁴⁵ L'induzione dell'apoptosi risulta essere una conseguenza diretta dell'interazione del complesso con specifici bersagli cellulari oppure risulta essere una risposta secondaria allo stress indotto dal trattamento. Alcuni studi cellulari, condotti su sistemi di Ru(III), quali KP1019 e KP1339, hanno evidenziato l'induzione di apoptosi prevalentemente attraverso la via mitocondriale intrinseca, associata alla perdita del potenziale di membrana mitocondriale e all'attivazione delle caspasi.⁴⁹

Un ulteriore meccanismo coinvolto nell'attività antitumorale dei complessi di rutenio riguarda la modulazione dell'equilibrio redox cellulare. Il mantenimento dell'omeostasi redox, ovvero dell'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'attività dei sistemi cellulari deputati alla loro neutralizzazione, è fondamentale per il corretto funzionamento della cellula. Un'alterazione di questo equilibrio può infatti determinare uno stato di stress ossidativo, caratterizzato da un'eccessiva accumulazione di ROS, che può provocare danni a proteine, lipidi e acidi nucleici e compromettere la normale funzionalità cellulare. In questo contesto, alcuni complessi di rutenio possono interferire con i processi redox intracellulari e modulare i livelli di ROS, contribuendo a modificare l'equilibrio redox intracellulari e modulare i livelli di ROS, contribuendo a modificare l'equilibrio redox può influenzare processi cellulari fondamentali e, quando supera la capacità dei sistemi di difesa della cellula, favorire l'insorgenza di processi di morte cellulare, contribuendo così all'attività citotossica e antiproliferativa dei complessi di rutenio.⁴⁵

1.8.2 COMPLESSI METALLICI CON RU (III)

Un aspetto particolarmente importante è rappresentato dai complessi di Ru (III), che hanno suscitato interesse come potenziali agenti antitumorali grazie alla loro versatilità chimica e alle proprietà redox del centro metallico. La possibilità di modulare lo stato di ossidazione e la sfera di coordinazione del rutenio può infatti influenzare la stabilità, la reattività e le modalità di interazione del complesso con le biomolecole in ambiente biologiche⁴⁵ Per alcuni di questi complessi è stata proposta un'attività tipo "profarmaco", secondo la quale il complesso può subire trasformazioni chimiche nell'ambiente biologico, modificando così la propria reattività e generando specie con caratteristiche differenti. In particolare, è stata studiata la possibile riduzione di Ru(III) a Ru(II), anche in relazione alle condizioni redox del microambiente tumorale. Tuttavia, questo meccanismo d'azione non risulta essere universale per tutti i complessi di Ru(III), in quanto la stabilità e la reattività redox dipendono fortemente dalla struttura molecolare e dai ligandi coordinati. Inoltre, alcuni complessi possono subire processi di acquazione o sostituzione dei ligandi in ambiente fisiologico, dando origine a specie chimiche differenti da quelle inizialmente somministrate.

Infatti, nel caso di alcuni complessi Ru(III), la sostituzione di ligandi labili, come gli ioni cloruro, con molecole di acqua o gruppi idrossido può portare alla modificazione della speciazione del complesso in ambiente acquoso. Questi processi possono influenzare sia la stabilità del farmaco sia la disponibilità della specie effettivamente responsabile dell'attività biologica, di conseguenza, il comportamento dei complessi di Ru(III) in condizioni fisiologiche rappresenta un parametro fondamentale per comprenderne il meccanismo d'azione e per progettare sistemi con proprietà farmacologiche ottimali.

Un'ulteriore fattore che ha un'importanza elevata per l'efficacia biologica dei complessi di rutenio è data dalla loro capacità di raggiungere il bersaglio intracellulare. La stabilità del complesso in ambiente fisiologico, la solubilità, la lipofilia e la capacità di attraversare le membrane cellulari influenzano direttamente la quantità di composto che raggiunge la cellula tumorale. Questo aspetto è particolarmente importante, e deve essere tenuto in considerazione per i complessi di Ru(III), perché possiedono problemi di stabilità, solubilità e uptake cellulare che possono limitarne l'efficacia.⁴⁵

1.8.3 COMPLESSI DI RUTENIO E TARGETING SELETTIVO DEL DNA

La possibilità di modulare la struttura e le proprietà dei complessi di rutenio ha favorito lo sviluppo di sistemi in grado di riconoscere strutture del DNA canoniche e non canoniche come il G4. Questo approccio è particolarmente interessante nell'ambito della terapia antitumorale, in quanto consente di indirizzare l'attività del composto verso strutture coinvolte nella proliferazione delle cellule tumorali. Il centro metallico consente di modulare la geometria tridimensionale, la carica e le proprietà elettroniche del sistema, mentre i ligandi organici coordinati possono fornire le superfici aromatiche necessarie per l'interazione con le tetradi di guanina.

Nello specifico, la presenza di ligandi aromatici planari può favorire le interazioni π -stacking con le tetradi di guanina terminali, mentre la carica positiva del complesso riesce a contribuire alle interazioni elettrostatiche con il backbone fosfato del DNA. La combinazione di questi due fattori può determinare una significativa stabilizzazione della struttura G4.⁵⁰

Le conseguenze biologiche di questa interazione sono molto importanti: a livello telomerico, la stabilizzazione dei G4 può ostacolare l'accesso della telomerasi al DNA telomerico portando così ad una progressiva disfunzione dei telomeri, mentre nelle regioni promotrici può interferire con i processi di trascrizione e ridurre l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione tumorale.

La review di Zegers, Peters e Albada ha evidenziato il crescente interesse verso questa classe di composti, analizzando numerosi complessi metallici studiati come stabilizzanti dei G4 e sottolineando l'importanza di valutare sia la capacità di stabilizzare questa struttura sia la selettività rispetto al DNA duplex.⁵⁰ È stato anche evidenziato come la correlazione tra proprietà di legame, stabilizzazione del G4 ed attività biologica debba essere interpretata con cautela, poiché l'attività antitumorale osservata nelle cellule non può essere necessariamente attribuita alla sola interazione con queste strutture. Nello sviluppo di nuovi complessi metallici è pertanto essenziale considerarne anche la biodisponibilità, la distribuzione intracellulare e le possibili interazioni con altri bersagli biologici.^{48,50} La capacità dei complessi di rutenio di interagire con differenti bersagli e la possibilità di modulare le loro proprietà attraverso la progettazione dei ligandi rendono questi sistemi particolarmente importanti e adatti allo sviluppo di sistemi multifunzionali.

In questo contesto, il centro metallico e il ligando svolgono funzioni complementari, contribuendo insieme all'attività biologica del composto. Questa strategia è molto importante soprattutto per ideare degli specifici targeter dei G4, dove il ligando organico possiede una superficie aromatica estesa capace di riconoscere e stabilizzare il G4, mentre il centro metallico può contribuire alla modulazione della carica, della geometria, delle proprietà redox e delle caratteristiche biologiche del sistema.

In questo contesto le NDI sono degli ottimi scaffold sfruttabili come ligandi accoppiate al complesso di rutenio, per poter infine progettare sistemi multifunzionali efficaci.

Sono stati già studiati sistemi multifunzionali di tipo NDI-Cu(II), dove le NDI svolgono il ruolo di riconoscimento dei G4, mentre il Cu(II) introduce caratteristiche redox-attive. Gli ultimi studi dimostrano come le NDI costituiscono una piattaforma estremamente versatile per la progettazione di ligandi G4 metallo-funzionalizzati.⁵¹

Sulla base di queste evidenze, l'impiego di complessi di Ru(III) rappresenta una direzione di ricerca particolarmente interessante in ambito antitumorale, per via della loro versatilità chimica, per la possibilità di interagire con differenti bersagli biologici e per la capacità di modulare processi cellulari coinvolti nella proliferazione tumorale.

Sebbene i sistemi NDI-Ru(III) siano ancora relativamente poco esplorati rispetto a quelli contenenti Ru(II), il loro sviluppo potrebbe offrire una strategia promettente per la progettazione di agenti antitumorali multifunzionali.^{39,45,50,51}

2. SCOPO DELLA TESI

Come discusso nei capitoli precedenti, le naftalendiimmidi (NDI) rappresentano una delle classi di ligandi più promettenti per il riconoscimento delle strutture G-quadruplex. Grazie all'ampia superficie aromatica planare, esse sono in grado di interagire efficacemente con le G-tetradi esterne mediante interazioni π , mentre la possibilità di introdurre sostituenti in posizioni chiave dello scaffold (core aromatico e posizioni immidiche) permette di modulare le sue proprietà chimico-fisiche quali solubilità, lipofilia, permeabilità cellulare e affinità nei confronti del DNA.

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato la sintesi di una serie di derivati naftalendiimmidici funzionalizzati nella loro posizione immidica con tre diverse ammine: N,N-dimetilpropan-1,3-diammina, 2-(2-amminoetossi)etan-1-olo e 3-morfolinopropan-1-ammina (vedi immagine 13).

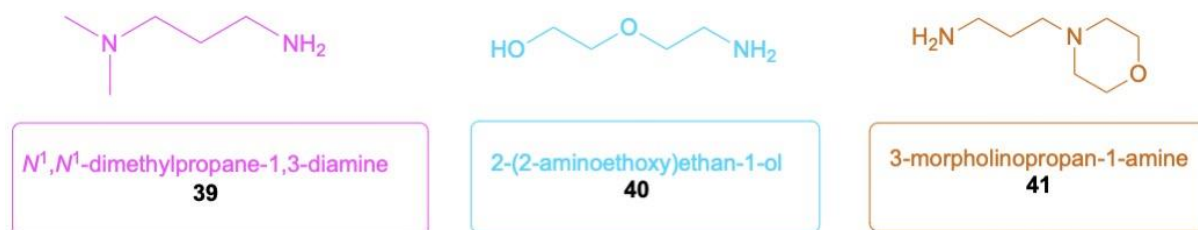


Figura 16 ammine che sono state utilizzate per funzionalizzare le NDI

La decisione di utilizzare tre ammine primarie che differiscono per la loro struttura è stata presa con l'obiettivo di ottenere derivati caratterizzati da differenti proprietà chimico-fisiche. Tale approccio ha permesso di valutare l'influenza delle catene laterali, installate sulla porzione immidica delle NDI, sia sull'andamento della sintesi sia sulle potenziali proprietà del sistema finale.

In particolare, la N,N-dimetilpropan-1,3-diammina introduce una catena protonabile, che dovrebbe favorire le interazioni elettrostatiche con i gruppi fosfato dello scheletro del DNA; il gruppo 2-(2-amminoetossi)etan-1-olo potrebbe aumentare invece la solubilità in ambiente acquoso, mentre la 3-morfolinopropan-1-ammina contribuirebbe a migliorare le proprietà farmacocinetiche della molecola.

A completamento della modulazione della porzione immidica, la funzionalizzazione del core aromatico delle NDI è stata realizzata mediante reazioni di sostituzione nucleofila aromatica (S_NAr), che ha consentito di ottenere intermedi opportunamente funzionalizzati e idonei alle successive trasformazioni sintetiche. Poiché queste reazioni

rappresentavano un passaggio importante per l'ulteriore elaborazione dello scaffold, particolare attenzione è stata dedicata all'ottimizzazione delle relative condizioni sperimentali. Successivamente, sono state investigate due differenti strategie di coniugazione con l'obiettivo di introdurre un opportuno gruppo funzionale destinato alla futura coordinazione di un centro metallico. In particolare, sono state valutate la formazione di un legame ammidico e quella di un legame estereo con una piridina benzilica che potesse coordinare il complesso di Ru(III) (Figura 17). Il confronto tra queste due soluzioni è stato motivato dalla loro differente stabilità idrolitica: il legame ammidico è noto per la sua elevata resistenza all'idrolisi in condizioni fisiologiche, mentre quello estereo risulta generalmente più suscettibile ai processi idrolitici. Questa maggiore labilità potrebbe offrire, in prospettiva, la possibilità di modulare il rilascio del frammento metallico in ambiente biologico. Il confronto tra le due strategie consente quindi di valutare il bilanciamento tra stabilità del coniugato e potenziale rilascio del centro metallico, un aspetto rilevante per la progettazione di futuri sistemi metallofarmaceutici.

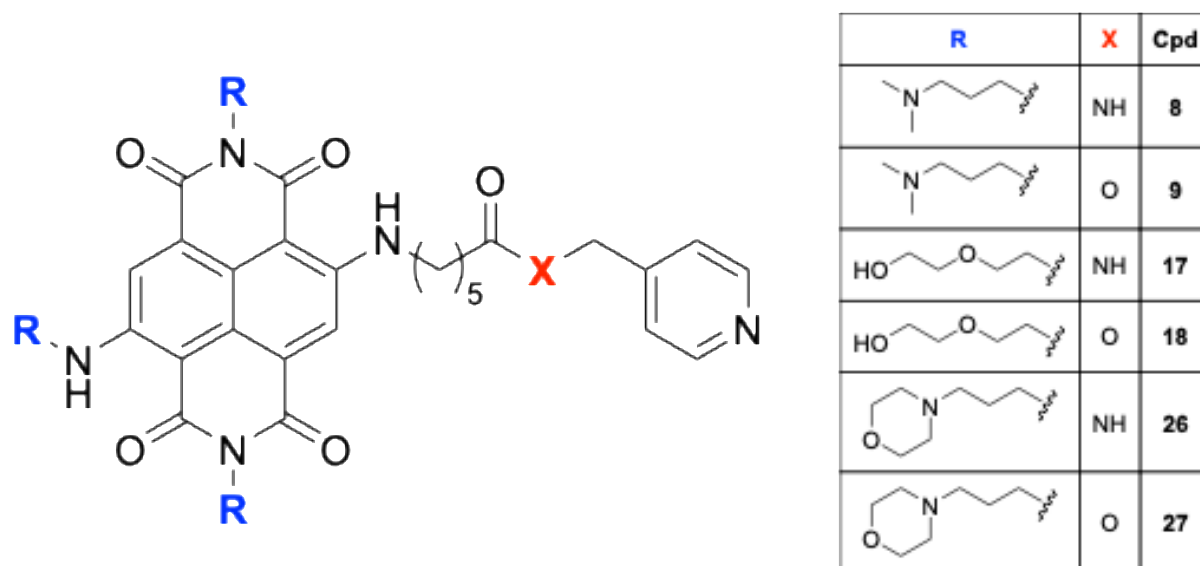


Figura 17 Derivatizzazione delle NDI con le ammine laterali sulla posizione immidica e del core

L'obiettivo conclusivo del progetto consiste nella preparazione di una nuova famiglia di coniugati NDI–Ru(III), ottenuti coordinando i ligandi NDI sintetizzati a un frammento Ru(III)–DMSO. Come precursore è stato selezionato l'anione trans-[RuCl₄(DMSO)₂][−] e la strategia prevede la sostituzione di uno dei ligandi DMSO con il sito donatore presente nelle NDI funzionalizzate, così da ottenere coniugati di formula generale trans-[RuCl₄(DMSO)(NDI)][−] (Figura 12).

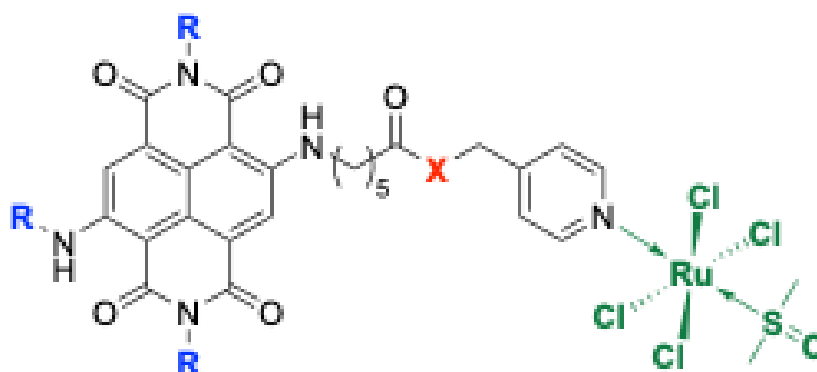


Figura 10 - Struttura generale dei complessi oggetto di questo lavoro

In ambiente acquoso, questi complessi possono subire processi di aquazione, principalmente attraverso la sostituzione dei ligandi cloruro con molecole d'acqua o ioni idrossido. A seconda delle condizioni, anche il DMSO può essere sostituito, favorendo l'interazione del centro metallico con gruppi donatori presenti nelle biomolecole. A tali processi può inoltre affiancarsi la riduzione da Ru(III) a Ru(II), con conseguente formazione di specie potenzialmente più reattive. I coniugati progettati combinano quindi la capacità delle NDI di riconoscere le strutture G-quadruplex con la reattività del frammento Ru(III)–DMSO. L'effettiva cooperazione tra le due componenti dovrà essere valutata attraverso lo studio della stabilità, della speciazione, dell'affinità verso le strutture G4 e dell'attività biologica dei prodotti finali.⁴⁵

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 SINTESI DEL NUCLEO NAFTALENDIIMMIDICO

La sintesi dei composti è cominciata dalla dianidride 1,4,5,8-naftalentetracarbossilica, un precursore commerciale ampiamente utilizzato per la preparazione di derivati NDI funzionalizzati. La versatilità di questo scaffold risiede nella possibilità di introdurre differenti sostituenti attraverso una sequenza sintetica relativamente semplice, consentendo l'ottenimento di un'ampia varietà di derivati con proprietà che si possono modulare in base allo scopo finale. Il primo passaggio della sintesi ha previsto la bromurazione del nucleo aromatico mediante 1,3-dibromo-5,5-dimetilidantoina (DBH) in acido solforico a riflusso. L'ambiente fortemente acido favorisce l'attivazione dell'agente bromurante e promuove la sostituzione elettrofila aromatica nelle posizioni desiderate del sistema naftalenico. Al termine della reazione, il solido giallo ottenuto è stato separato mediante filtrazione, ottenendo il derivato dibromurato con una 90,90%.

permette di condurre la reazione in un unico mezzo di reazione, evitando il ricorso a solventi organici anidri e facilitando la gestione della miscela di reazione. Sebbene l'ambiente acido determini una parziale protonazione delle ammine, la frazione di ammina non protonata rimane disponibile per l'attacco nucleofilo sul substrato, l'aumento della temperatura favorisce quindi la progressione della reazione verso i prodotti funzionalizzati. Le reazioni sono state condotte principalmente mediante sintesi assistita da microonde (MW), metodologia che consente di ridurre significativamente i tempi di reazione e di migliorare l'efficienza del processo sintetico rispetto al riscaldamento convenzionale. Nel caso della N,N-dimetilpropan-1,3-diammina la reazione è stata condotta a 120 °C per 10 minuti (Schema 1a), mentre per la 3-morfolinopropan-1-ammina sono state impiegate condizioni analoghe utilizzando lo stesso solvente, ma operando a 130 °C per 5 minuti (Schema 1 c). Per entrambe le sintesi, al termine dell'irraggiamento a microonde, la miscela di reazione è stata diluita con acqua distillata e neutralizzata mediante aggiunta di carbonato di sodio (Na_2CO_3) fino al raggiungimento di un pH debolmente basico, per permettere l'estrazione successiva delle molecole di interesse. La fase acquosa è stata successivamente estratta con diclorometano (DCM) e le fasi organiche riunite sono state concentrate a pressione ridotta, ottenendo il prodotto grezzo di reazione. Considerata la sufficiente purezza del materiale ottenuto e la successiva trasformazione sintetica prevista, il grezzo è stato impiegato direttamente nello stadio successivo senza ulteriori procedure di purificazione.

Per il derivato **21 e 22** ottenuto mediante reazione con 2-(2-amminoetossi)etan-1-olo è stato necessario sviluppare delle condizioni sperimentali differenti. Durante le prime reazioni è stato notato che l'impiego del solo acido acetico glaciale come solvente favoriva la formazione di prodotti secondari indesiderati, verosimilmente dovuti alla diversa reattività del substrato e alla presenza del gruppo ossidrilico terminale della ammina impiegata. Per limitare reazioni indesiderate e la formazione di troppo prodotti secondari, è stata quindi impiegata una miscela di solvente costituita da 55 % etanolo e 45 % acido acetico glaciale, mentre la reazione è stata condotta a 150 °C per 2 minuti (Schema 1b). Anche il work-up è stato modificato rispetto a quello adottato per gli altri due composti. Al compimento della reazione, la miscela è stata sottoposta a evaporazione a pressione ridotta e successivamente in alto vuoto per eliminare l'acido

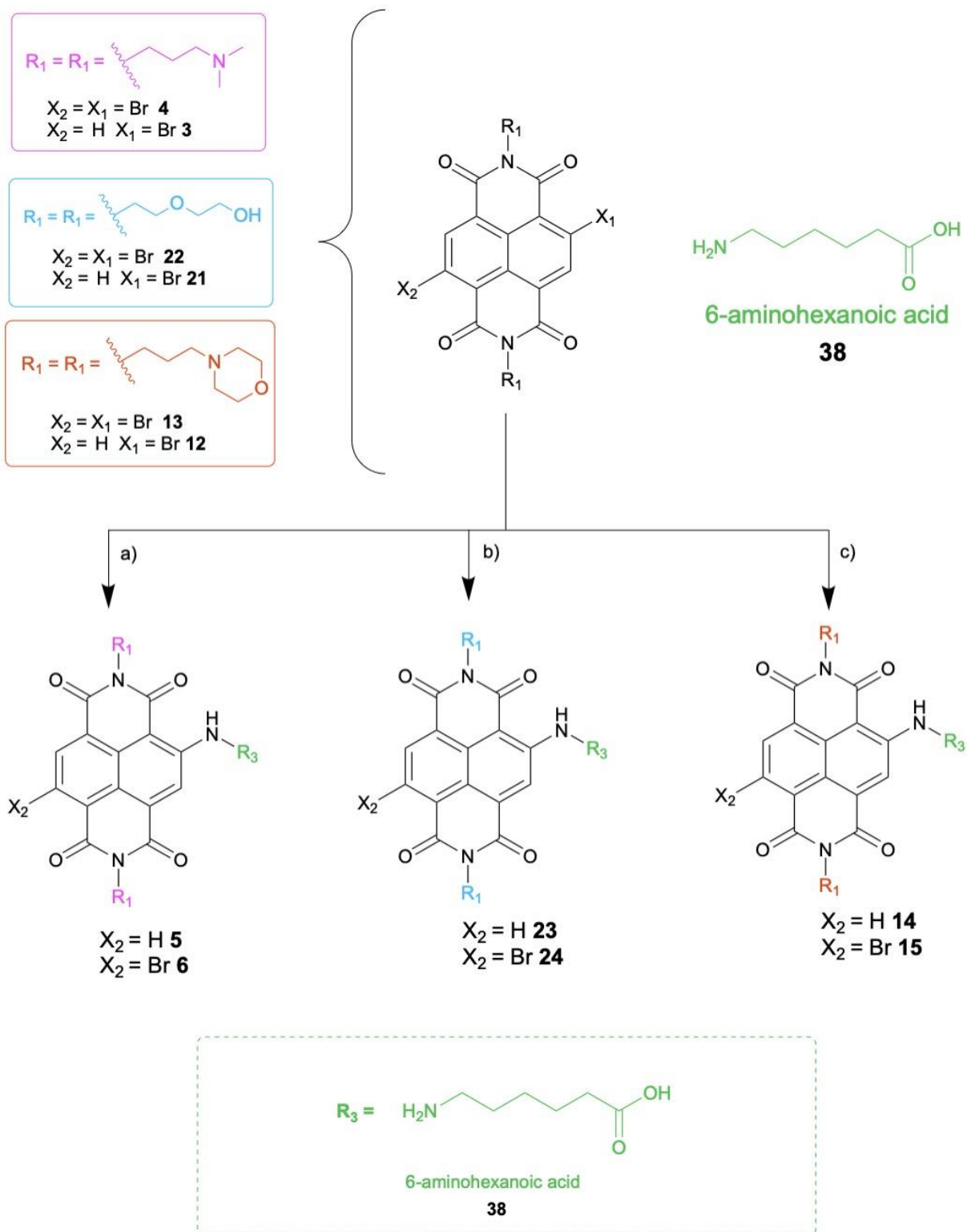
acetico residuo. Il materiale ottenuto è stato quindi diluito con acqua e sottoposto direttamente ad estrazione con diclorometano (DCM), senza effettuare la preventiva neutralizzazione con carbonato di sodio. Le fasi organiche, infine, sono state riunite e concentrate a pressione ridotta, ottenendo il prodotto grezzo destinato alle successive trasformazioni sintetiche.

L'ottimizzazione delle condizioni di sintesi e del work-up per ciascuna delle tre ammine ha consentito di ottenere una famiglia di derivati NDI (schema 2) opportunamente funzionalizzati, che hanno costituito gli intermedi di partenza per le successive reazioni di coniugazione.

3.2 FUNZIONALIZZAZIONE DEL CORE NDI

Al fine di introdurre sullo scheletro NDI un linker funzionale alle successive fasi di coniugazione, è stata effettuata una reazione di sostituzione nucleofila aromatica (SNAr) con l'acido 6-amminoesanoico **38** sul core NDI bromurato. Il linker introdotto presenta un terminale carbossilico libero, che permette di procedere successivamente alla funzionalizzazione con la piridina sostituita che sarà il punto di ancoraggio del centro metallico. Tali funzionalizzazioni vengono effettuate preliminarmente alla successiva complessazione con il rutenio.

La reazione dei derivati **3**, **4**, **12**, **13**, **21** e **22**, ha previsto la sostituzione di uno degli atomi di bromo presenti sul core NDI con l'acido 6-amminoesanoico. Tutte le reazioni sono state condotte mediante irradiazione a microonde (MW), utilizzando con solvente N,N-dimetilacetamide (DMA) come solvente, alla temperatura di 120 °C per 10 minuti (schema 3).



Schema 3 Prima sostituzione nucleofila in DMA come solvente eseguita al MW

Le condizioni di reazione sono state differenziate in funzione della natura del sostituito presente sul core NDI. (Schema 3 e tabella 2).

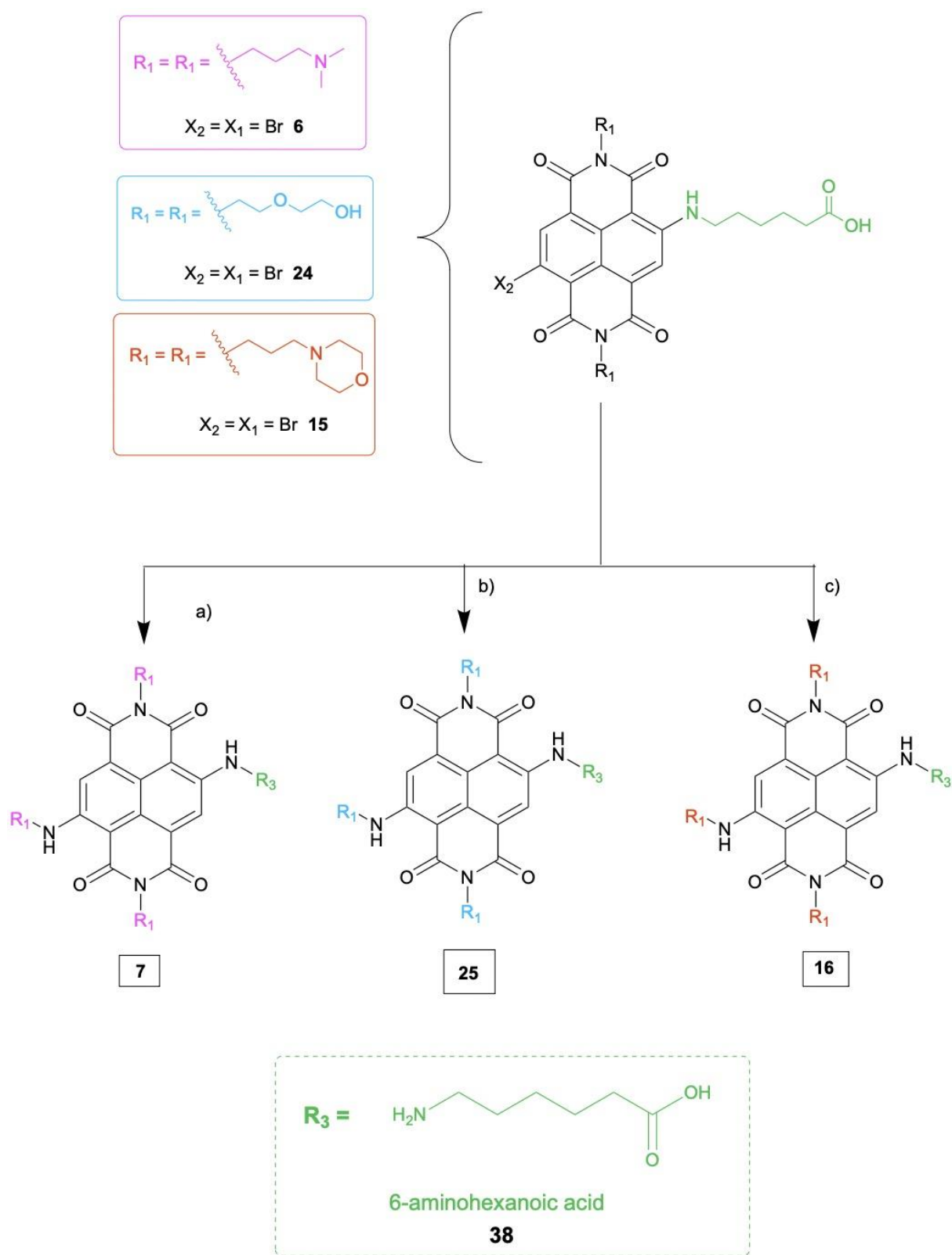
Substrati NDI	Reagente	Equivalenti	Solvente	Condizione MW	prodotti ottenuti
3	acido 6-amminoesanoico (38)	1.2	DMA	120 °C	5
4	acido 6-amminoesanoico (38)	1.2	DMA	120 °C	6
12	acido 6-amminoesanoico (38)	1.5	DMA	120 °C	14
13	acido 6-amminoesanoico (38)	1.5	DMA	120 °C	15
21	acido 6-amminoesanoico (38)	2.5	DMA	120 °C	23
22	acido 6-amminoesanoico (38)	2.5	DMA	120 °C	24

La reazione di sostituzione nucleofila aromatica ha portato alla formazione di una miscela di prodotti, pertanto, al termine di ciascuna reazione, il grezzo di reazione è stato sottoposto a purificazione cromatografica mediante HPLC preparativa in fase inversa, al fine di separare il derivato funzionalizzato **5**, **14** e **23** dal corrispondente derivato bromurato **6**, **15** e **24**. Tale purificazione è stata effettuata per tutte e tre le famiglie, e ha permesso di isolare selettivamente i composti **6**, **15** e **24**, caratterizzati dalla presenza dell'atomo di bromo residuo. Il linker così introdotto costituisce un elemento di connessione fondamentale per le successive fasi sintetiche, permettendo di effettuare i due distinti processi di coupling previsti dalla strategia sintetica e, successivamente, di procedere alla complessazione con il centro metallico.

3.2.2 SINTESI DEI DERIVATI NDI TETRASOSTITUITI

I derivati bromurati **6**, **15** e **24** sono stati utilizzati in una successiva reazione di sostituzione nucleofila aromatica, finalizzata alla sostituzione dell'ultimo atomo di bromo presente sul core con una catena amminica identica a quella presente sulla porzione imidica, e al completamento della funzionalizzazione dello scheletro. L'introduzione della seconda catena laterale consente di ottenere derivati NDI tetrasostituiti, caratterizzati da una maggiore simmetria strutturale e da un incremento del numero di gruppi amminici disponibili. Il derivato **7** è stato ottenuto riscaldando in microonde una soluzione di **6** e dell'ammina **39** in DMA a 120°C per 5 minuti, e in seguito a purificazione cromatografica in HPLC preparativa. Analogamente, per la sintesi del derivato **16**, il composto **15** è stato sottoposto a reazione con 1,5 equivalenti di 3-morfolinopropan-1-ammina in DMA. Infine, il composto **24** è stato sottoposto alla seconda reazione di sostituzione nucleofila aromatica utilizzando un elevato eccesso di 2-(2-amminoetossi)etan-1-olo, pari a 12 equivalenti, in DMA. In questo caso, l'impiego di

un considerevole eccesso di ammina si è reso necessario per favorire la sostituzione nucleofila dell'atomo di bromo residuo. Infatti, i gruppi ossidrilici terminali presenti sull'ammina utilizzata possono concorrere per gli stessi siti elettrofili durante la reazione, riducendo la disponibilità dell'ammina per la sostituzione dell'atomo di bromo. L'utilizzo di un elevato eccesso di ammina permette pertanto di favorire la sostituzione desiderata e di ottenere il prodotto tetrasostituito **25**.



Schema 4 seconda sostituzione aromatica dei derivati NDI bromurati 6,15 e 24 mediante MW ottenendo le tetrasostituite 7,16 e 25

3.2.3 FUNZIONALIZZAZIONE DEL LINKER MEDIANTE REAZIONI DI COUPLING

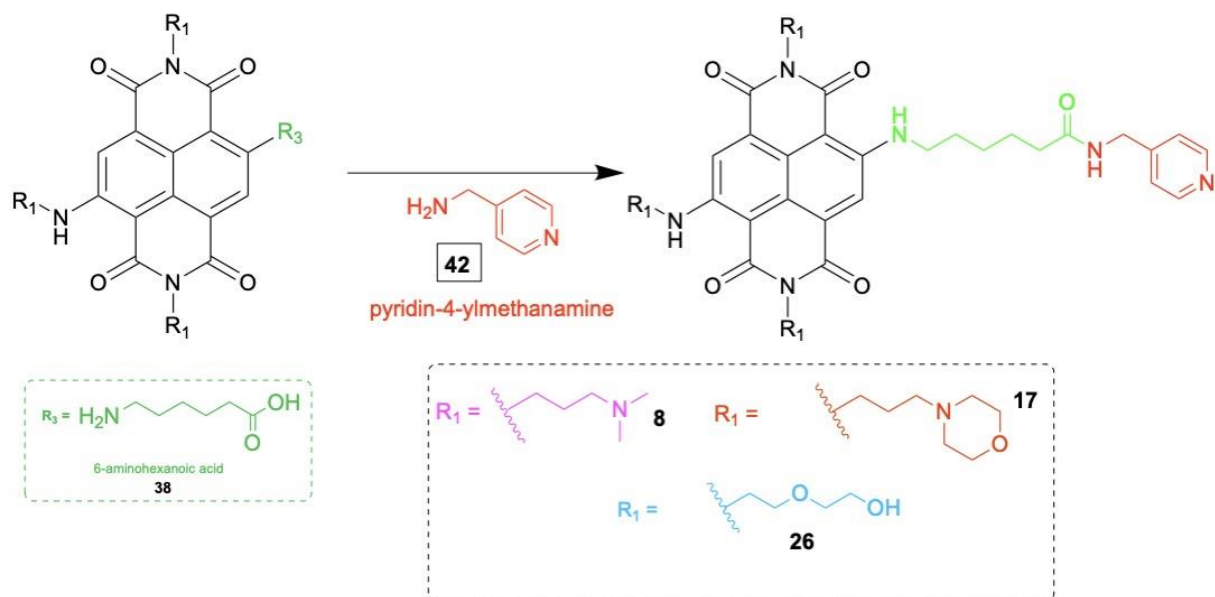
A seguito della completa funzionalizzazione del core NDI, i derivati recanti il linker sono stati sottoposti a due differenti reazioni di coupling, che hanno introdotto sul gruppo carbossilico terminale mediante un'unità piridinica. In particolare, sono state considerate due strategie di coniugazione basate rispettivamente sulla formazione di un legame estereo e di un legame ammidico. Entrambi le strategie sono state applicate sia ai derivati trisostituiti (**5**, **14** e **23**) sia ai corrispondenti derivati tetrasostituiti (**7**, **16** e **24**), consentendo di ottenere le relative serie di composti funzionalizzati, pronti per la successiva complessazione con il Ru(III).

Come già discusso precedentemente, la scelta di introdurre il gruppo piridinico mediante le due differenti strategie di accoppiamento è legata alle diverse caratteristiche di stabilità dei legami formati.

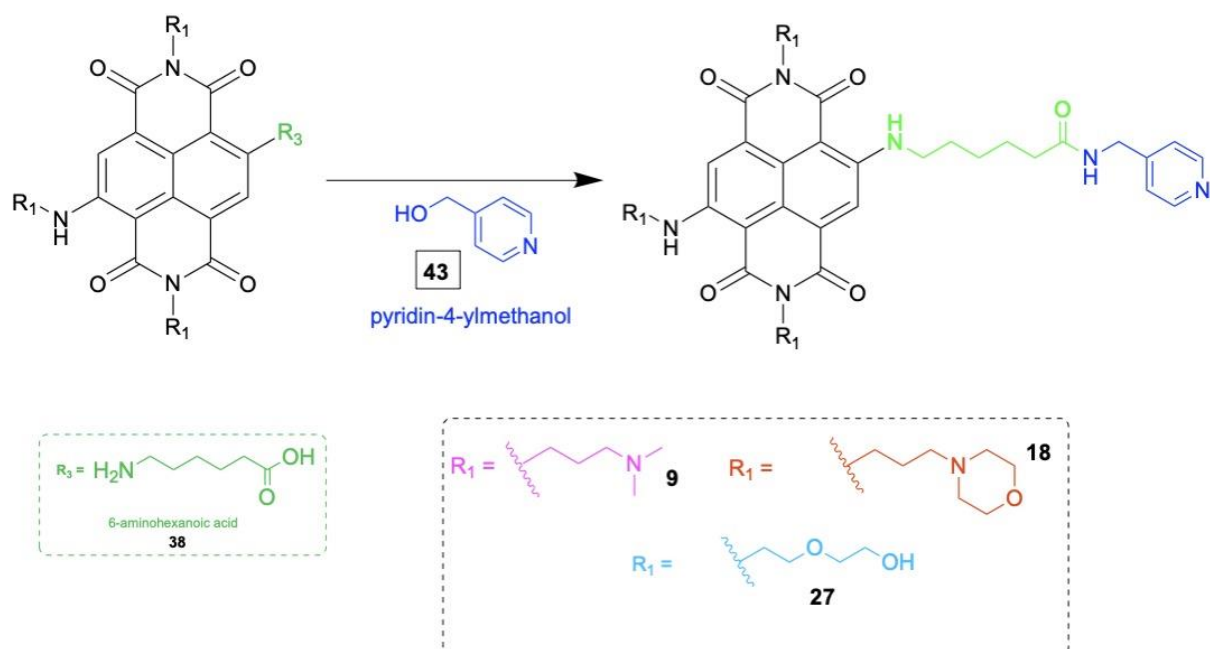
In entrambi i casi, le reazioni di coupling sono state condotte in atmosfera inerte ed a temperatura ambiente, utilizzando N,N-dimetilformammide anidra come solvente di reazione. La formazione degli esteri è stata ottenuta mediante reazione del gruppo carbossilico terminale del linker con il piridin-4-ilmetanolo **42**, mentre per la formazione del legame ammidico è stata utilizzata la piridin-4-ilmetanammina **43**. L'HATU è stato scelto come reagente di attivazione del gruppo carbossilico (HOBt, HOAt, etc.) perché offre una reattività e una velocità di attivazione significativamente maggiori rispetto ad altri (DIC, HOBt, HOAt, EDC, etc.), mentre come base è stata scelta la DIPEA. Al termine di ciascuna reazione, che mediamente ha impiegato 18 ore, i prodotti grezzi sono stati sottoposti a purificazione cromatografica mediante HPLC preparativa.

In particolare, per i derivati trisostituiti sono stati ottenuti i composti **10**, **19** e **28** mediante coupling ammidico e **11**, **20** e **29** mediante coupling estereo (schema 7 e 8); analogamente, per i derivati tetrasostituiti sono stati ottenuti i composti **8**, **17** e **26** mediante coupling ammidico e **9**, **18** e **27** mediante coupling estereo (schema 5 e 6).

B) coupling ammidico

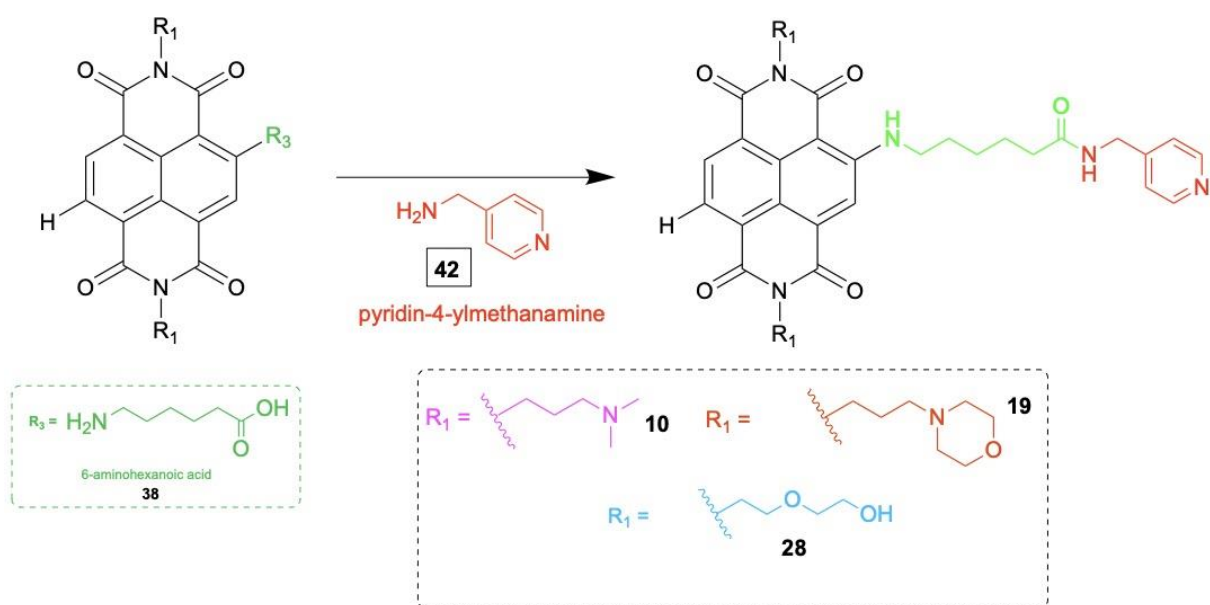


A) coupling estereo

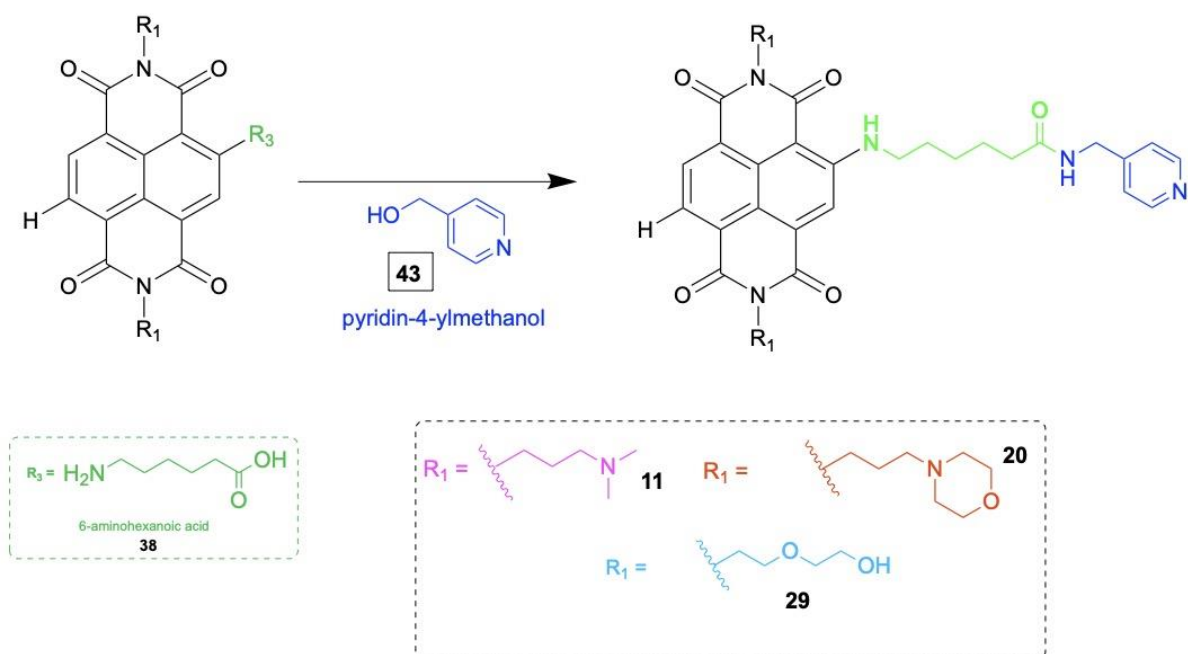


Schema 5 strategie di coniugazione dei derivati NDI tetrasostituiti contenenti il linker di acido 6-amminoesanoico con unità piridiniche mediante coupling ammidico (A) e coupling estereo (B)

B) coupling ammidico



A) coupling estereo

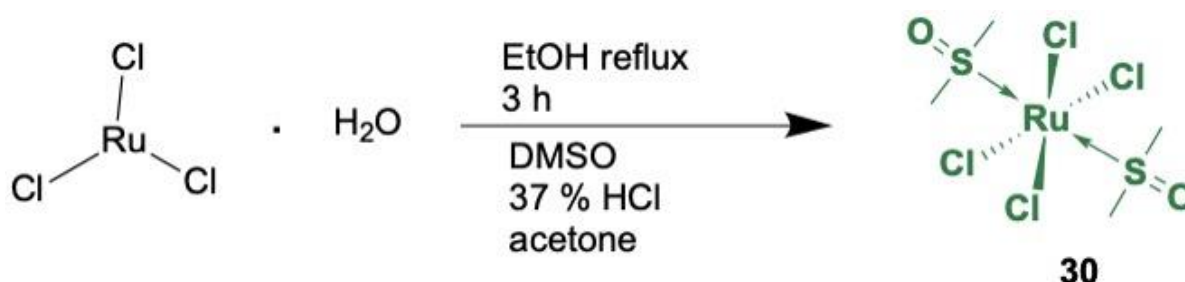


Schema 6 Strategie di coupling ammidico (A) ed estereo (A) applicate ai derivati NDI trisostituiti funzionalizzati con acido 6-amminoesanoico

3.3 COMPLESSAZIONE DEI DERIVATI NDI CON RUTENIO (III)

3.3.1 SINTESI DEL PRECURSORE DI RUTENIO (III)

Nell'ambito della strategia sintetica finalizzata all'ottenimento dei complessi NDI-rutenio(III), è stata inizialmente effettuata la sintesi del precursore di rutenio $[(\text{DMSO})_2\text{H}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})_2]$, seguendo il secondo metodo riportato in letteratura da Alessio et.al. per la preparazione dei complessi cloruro-dimetilsolfossido di rutenio (III).⁵²



Schema 9 - Sintesi del precursore di rutenio (III) $[(\text{DMSO})_2\text{H}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})_2]$ a partire da $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Il composto è un sale di coordinazione ionico costituito dall'anione complesso $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})_2]$, nel quale il centro metallico di Ru(III) presenta una geometria ottaedrica definita da quattro leganti cloruro disposti sul piano equatoriale e da due molecole di dimetilsolfossido (DMSO) coordinate in posizione reciproca *trans*; in accordo con la teoria HSAB, il DMSO si coordina specificamente tramite l'atomo di zolfo anziché quello di ossigeno, poiché la natura di acido "soft" del Ru(III) favorisce l'interazione con l'atomo di zolfo, anch'esso donatore "soft". La carica negativa complessiva della sfera di coordinazione è bilanciata dal caratteristico controione cationico $[(\text{DMSO})_2\text{H}]$, una specie in cui un protone risulta fortemente stabilizzato tra due molecole di solvente.

La sua sintesi è stata condotta a partire da cloruro di rutenio (III) idrato, che è stato fatto riflussare in etanolo assoluto; durante questa fase, la soluzione ha assunto una colorazione verde scuro. Successivamente, dopo il raffreddamento della miscela, sono stati aggiunti acido cloridrico concentrato e dimetilsolfossido (DMSO). La miscela è stata quindi lasciata reagire fino all'ottenimento di una soluzione di colore rosso-arancione e successivamente portata a temperatura ambiente, fino a ottenere una soluzione limpida di colore rosso.

Il cambiamento di colore osservato durante la sintesi è associato alle modificazioni dell'ambiente di coordinazione del centro metallico e alla progressiva formazione delle

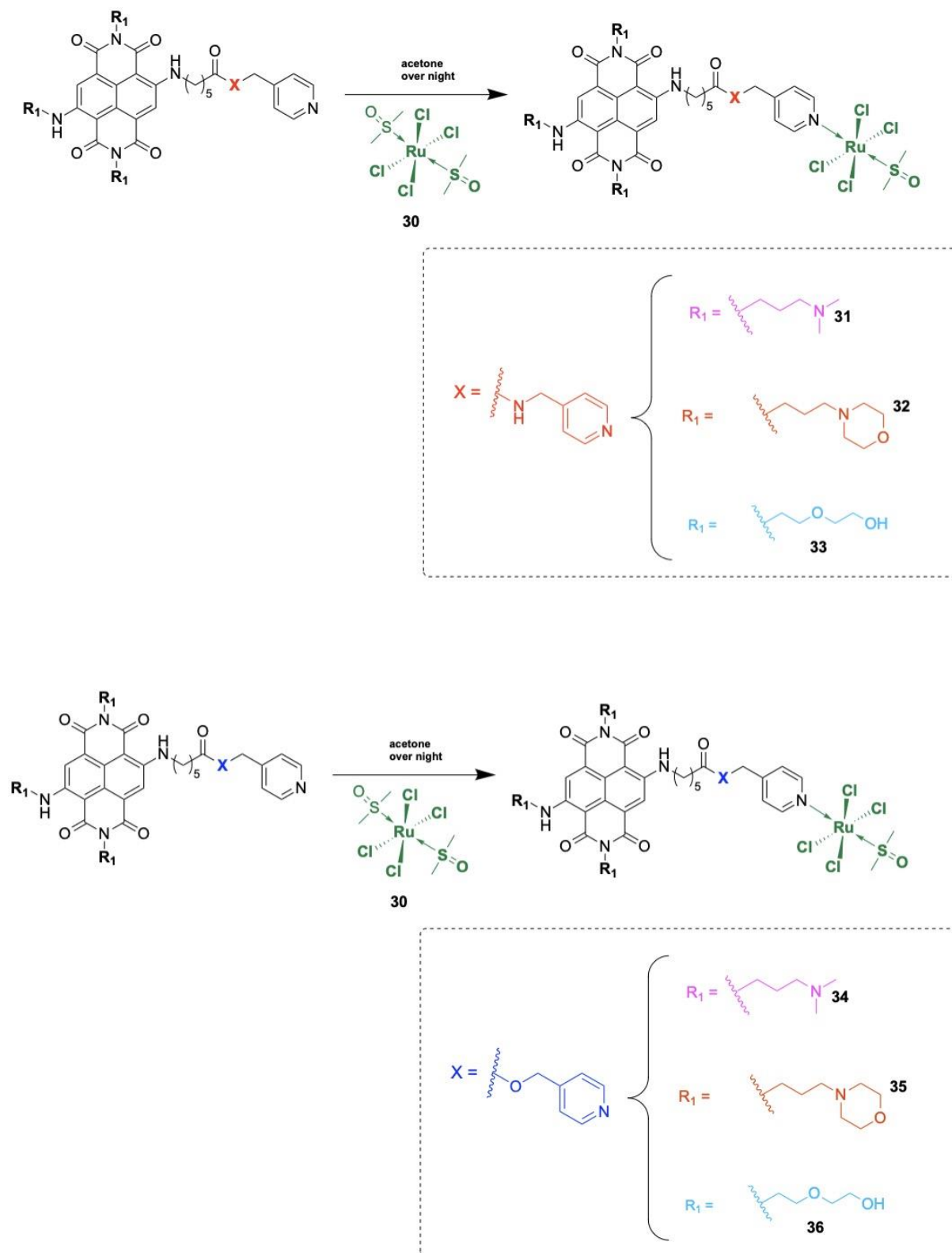
specie cloruro-DMSO. In particolare, l'aggiunta di HCl aumenta la concentrazione di ioni cloruro disponibili per la coordinazione al centro metallico, mentre il DMSO agisce come legante, portando alla formazione del complesso $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})_2\text{]^-}$, isolato per precipitazione da acetone. Le diverse colorazioni osservate rappresentano pertanto un'indicazione qualitativa dell'evoluzione del sistema di coordinazione durante la preparazione del precursore. Il complesso è stato quindi utilizzato come precursore di Ru(III) nelle successive reazioni di complessazione con i derivati NDI precedentemente sintetizzati.

3.3.2 SINTESI DEI COMPLESSI NDI-Ru (III)

Una volta ottenuto il precursore di Ru(III) (**30**) e completata la sintesi dei derivati NDI funzionalizzati con l'unità piridinica della serie **8**, **17** e **26** e serie **9**, **18** e **28**, si è proceduto alla preparazione dei corrispondenti complessi NDI-Ru(III), sfruttando la capacità del gruppo piridinico di coordinarsi al centro metallico. Il precursore $[(\text{DMSO})_2\text{H}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})_2]$ è infatti caratterizzato dalla presenza di leganti che possono subire processi di sostituzione da parte di leganti azotati. Tale comportamento è coerente con la reattività descritta in letteratura per i complessi cloruro-DMSO di Ru (III).⁵²

La reazione di complessazione dell'NDI al centro metallico è stata inizialmente valutata sul derivato **8**. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente utilizzando acetone

come solvente. In queste condizioni, è stata osservata in UHPLC-MS la formazione del complesso NDI-Ru (III) **31** (schema 10).



Schema 10 Complessazione dei derivati NDI Ru (III)

Nonostante l'esito positivo della sintesi, il complesso ha mostrato una limitata stabilità durante lo stoccaggio. Dopo la purificazione e la successiva liofilizzazione, il prodotto è

stato conservato per alcune settimane a temperatura controllata; le successive analisi hanno evidenziato fenomeni di parziale degradazione, indicando che il sistema non mantiene inalterata la propria integrità nel medio periodo. La medesima procedura di complessazione è stata applicata ai derivati NDI contenenti i gruppi **19** e **28**, anche essi funzionalizzati mediante coupling ammidico. In questi casi sono state riscontrate addirittura maggiori difficoltà sia in termini di procedimento della reazione sia di successiva caratterizzazione dei prodotti. In particolare, dopo la purificazione, le analisi hanno evidenziato la perdita della porzione NDI coordinata al centro metallico, suggerendo una possibile instabilità dei complessi durante le operazioni di purificazione e/o di analisi.

Alla luce di tali osservazioni, è stata valutata la possibilità di modificare la natura del linker impiegato per l'introduzione dell'unità piridinica. Sono state pertanto eseguite le corrispondenti reazioni di complessazione sui derivati NDI **34** e **35** caratterizzati dal legame estereo, mantenendo le condizioni sperimentali (temperatura, solvente e tempo di reazione) precedentemente adottate. Anche in questo caso sono state osservate criticità analoghe a quelle descritte precedentemente, con difficoltà nell'ottenimento di complessi finali sufficientemente stabili da poter essere isolati e caratterizzati.

Per poter individuare condizioni di reazione alternative e migliorare la formazione e la stabilità dei complessi, sono state quindi investigate differenti condizioni di sintesi. In una prima variazione, la reazione è stata condotta in DMF a temperatura ambiente senza però riscontrare miglioramenti significativi. Successivamente, la stessa procedura è stata ripetuta utilizzando DMF anidra e operando in atmosfera inerte, per limitare l'eventuale influenza dell'umidità e dell'ossigeno atmosfericamente presenti, ma anche questa modifica delle condizioni sperimentali non ha portato a risultati soddisfacenti. Infine, è stato valutato l'impiego di un ulteriore solvente, utilizzando acetonitrile anidro in sostituzione della DMF, ma non è stato osservato un apprezzabile miglioramento. Le diverse condizioni di reazione investigate per la complessazione dei derivati NDI Ru (III) sono riassunte nella tabella 3.

Fase	Comp. finale	Tipo di coupling	Solvente	Atmosfera	Temperatura (°C)	Tempo di reazione	Note / Procedura
1. Procedura standard (coupling ammidico)	31	Ammidico	Acetone	Aria	T ambiente	Overnight	Procedura standard in acetone a temperatura ambiente, senza atmosfera controllata.
	32	Ammidico	Acetone	Aria	T ambiente	Overnight	
	33	Ammidico	Acetone	Aria	T ambiente	Overnight	
2. Procedura standard (coupling estereo)	34	Estereo	Acetone	Aria	T ambiente	Overnight	Procedura standard in acetone a temperatura ambiente, senza atmosfera controllata.
	35	Estereo	Acetone	Aria	T ambiente	Overnight	
3. Variazione solvente: DMF (stessa procedura)	31	Ammidico	DMF	Aria	T ambiente	Overnight	Stessa procedura, utilizzando DMF come solvente (invece di acetone).
	32	Ammidico	DMF	Aria	T ambiente	Overnight	
	34	Estereo	DMF	Aria	T ambiente	Overnight	
	35	Estereo	DMF	Aria	T ambiente	Overnight	
4. Variazione solvente: DMF anidra (atmosfera inerte)	31	Ammidico	DMF dry	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	Stessa procedura utilizzando DMF anidra e operando in atmosfera inerte.
	32	Ammidico	DMF dry	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	
	34	Estereo	DMF dry	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	
	35	Estereo	DMF dry	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	
5. Variazione solvente: Acetonitrile anidro (atmosfera inerte)	31	Ammidico	MeCN anidro	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	Stessa procedura utilizzando acetonitrile anidro e operando in atmosfera inerte.
	32	Ammidico	MeCN anidro	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	
	34	Estereo	MeCN anidro	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	
	35	Estereo	MeCN anidro	Atmosfera inerte	T ambiente	Overnight	

In tutte le reazioni è stato utilizzato il precursore di Ru(III) **30**. Temperatura: ambiente (~20–25 °C). Tempo di reazione: overnight (~16–18 h).

Figura 11 Riepilogo delle condizioni sperimentali per l'ottimizzazione della reazione di complessazione tra il precursore di rutenio (III) **30** e ligandi NDI **31–36**.

In generale, il derivato **8** ha mostrato la risposta più favorevole alla complessazione con Ru(III) nelle condizioni inizialmente investigate, consentendo l'isolamento del corrispondente complesso **31**. Tuttavia, la successiva osservazione di una parziale degradazione durante lo stoccaggio ha evidenziato una stabilità limitata nel tempo anche per questo derivato. La parziale degradazione osservata durante lo stoccaggio del complesso **31** può essere ricondotta alla labilità della sfera di coordinazione del centro Ru (III). Nei complessi di rutenio (III) contenenti leganti labili sono infatti possibili processi di sostituzione dei leganti e di riarrangiamento della sfera di coordinazione. In particolare, la presenza di acqua può favorire processi di aquazione, nei quali uno o più leganti cloruro coordinati al centro metallico vengono progressivamente sostituiti da molecole di acqua.

Un comportamento simile a quello descritto può essere preso in considerazione anche per i derivati X e Y, per i quali le analisi di spettrometria di massa hanno evidenziato la presenza di specie riconducibili alla perdita del centro metallico inizialmente presente. In questi sistemi, la diversa natura delle catene laterali potrebbe influenzare la stabilità dei complessi modificandone la polarità, la solubilità e la solvatazione. In particolare, la

presenza di catene caratterizzate da numerosi gruppi eterei e terminali ossidrilici, può alterare l'interazione del complesso con il solvente; analogamente, l'unità morfolinica può incidere sulle proprietà di solubilità e sullo stato di protonazione del legante. Sebbene l'azoto terziario della morfolina possieda una coppia elettronica potenzialmente donatrice quando non protonato, i dati disponibili non consentono di ipotizzare il coinvolgimento diretto nella coordinazione al Ru(III). Le differenze di stabilità osservate possono pertanto essere ricondotte all'effetto complessivo delle catene laterali sulla solvatazione e sui processi di scambio di legante.

Infine, le difficoltà riscontrate già durante la purificazione suggeriscono che i processi di decomposizione e/o decoordinazione possano verificarsi non soltanto durante lo stoccaggio, ma anche nelle condizioni utilizzate per l'isolamento e la caratterizzazione dei complessi. Le analisi di spettrometria di massa hanno permesso di monitorare tutti i fenomeni descritti e di identificare le specie presenti dopo la degradazione, fornendo indicazioni utili sulla stabilità dei diversi sistemi NDI-Ru (III).

4. CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la progettazione e la sintesi di una nuova famiglia di coniugati naftalendiimmidi-rutenio (III), sviluppati con l'intento di combinare le proprietà di riconoscimento delle strutture G-quadruplex tipiche delle NDI con la reattività biologica dei complessi di Ru(III). Tale strategia si inserisce nel contesto della ricerca di nuovi sistemi multifunzionali potenzialmente impiegabili in ambito antitumorale, sfruttando da un lato la selettività delle NDI verso i G4 presenti nei telomeri e nei promotori di oncogeni, e dall'altro le peculiari proprietà chimiche e farmacologiche dei complessi di Ru (III).

Per il raggiungimento di questo obiettivo è stato sviluppato un percorso sintetico modulare che ha permesso di ottenere tre differenti famiglie di derivati NDI contenenti catene laterali di diversa natura. In particolare, per l'introduzione dei gruppi ammidici sono stati impiegati i composti **39**, **40** e **41**. La funzionalizzazione del core NDI è stata effettuata mediante reazioni di sostituzione nucleofila aromatica eseguite al microonde, consentendo di ottenere sia i derivati trisostituiti, **10,11**, **19**, **20**, **28** e **29**, sia i derivati

tetrasostituiti **8,9, 17, 18, 26** e **27**. L'impiego della sintesi assistita da microonde ha permesso di ridurre significativamente i tempi di reazione e di ottimizzare le condizioni sperimentali in funzione della diversa reattività dei substrati impiegati.

Un passaggio fondamentale della sintesi è stato rappresentato dall'introduzione del linker di acido 6-amminoesanoico, **38**, scelto per inserire un gruppo carbossilico terminale utilizzabile nelle successive reazioni di coniugazione. L'ottimizzazione delle condizioni di reazione ha evidenziato come la natura della catena laterale influenzi la quantità di reagente necessaria per ottenere la funzionalizzazione desiderata. In particolare, il derivato **21** e **22**, ha richiesto un numero maggiore di equivalenti dell'acido **38** rispetto agli altri derivati **3, 4, 12** e **13**, probabilmente a causa della presenza dei gruppi ossidrilici lungo la catena della ammina **40**, che possono interferire con la reattività dell'ammina terminale. La purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa si è rivelata essenziale per separare le forme monobromurate da quelle dibromurate e ottenere intermedi con un grado di purezza adeguato alle trasformazioni successive.

Successivamente, i derivati contenenti il linker carbossilico sono stati sottoposti a due differenti strategie di coniugazione con un'unità piridinica: un coupling ammidico e un coupling estereo. Entrambe le metodologie sono state applicate sia ai derivati trisostituiti sia a quelli tetrasostituiti, utilizzando l'HATU come agente di attivazione e DIPEA come base in DMF anidra e in atmosfera inerte. L'applicazione delle due strategie ha consentito di ampliare la libreria di composti sintetizzati, ottenendo sistemi caratterizzati da differenti modalità di collegamento tra il core NDII e il gruppo piridinico destinato alla coordinazione con l'rutenio. La purificazione mediante HPLC preparativa, seguita dalla concentrazione al rotavapor e dalla liofilizzazione, ha permesso di isolare i prodotti finali in forma solida, riducendo la presenza di solventi e acqua residua. L'ultima parte del progetto è stata dedicata alla preparazione del precursore di rutenio (III) e ai successivi tentativi di complessazione con i derivati NDI funzionalizzati. Il precursore $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})_2\text{]}^-$ è stato sintetizzato secondo il metodo riportato da Alessio e collaboratori⁵², ottenendo il complesso di Ru (III) necessario per la fase finale del progetto.

La fase di complessazione con il precursore di Ru (III) ha rappresentato l'aspetto più critico dell'intero percorso sintetico. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la formazione e la stabilità dei complessi NDI-Ru (III) dipendono in maniera significativa

dalla natura del ligando NDI e del linker impiegato. Sebbene il derivato **8** abbia mostrato il comportamento più promettente nelle condizioni investigate, l'insieme dei risultati ha messo in evidenza la necessità di un'ulteriore ottimizzazione delle condizioni di complessazione per ottenere, per tutte le famiglie di derivati sintetizzate, complessi sufficientemente stabili e completamente stabili e completamente caratterizzati.

Nel complesso, il lavoro ha permesso di sviluppare un percorso sintetico riproducibile per la preparazione di una libreria di derivati NDI diversamente funzionalizzati e di ottenere tutti gli intermedi necessari per la successiva coordinazione con il Rutenio (III). Le criticità riscontrate nella fase finale del progetto hanno inoltre fornito indicazioni importanti sull'influenza della struttura del ligando e delle condizioni di reazione sulla stabilità dei complessi di Ru (III), evidenziando gli aspetti che richiedono un'ulteriore ottimizzazione.

I derivati naftalendiimidici sintetizzati e caratterizzati nel corso di questo lavoro saranno utilizzati per completare e ottimizzare la fase di complessazione con il Ru (III), che nelle condizioni investigate non ha consentito di ottenere, per tutti i sistemi, complessi stabili. Una volta finalizzata la sintesi dei coniugati NDI-Ru (III), si procederà alla valutazione della loro stabilità e speciazione in soluzione acquosa, allo studio dell'affinità verso le strutture G-quadruplex e alla caratterizzazione biologica dei nuovi complessi. Tali studi permetteranno di verificare il potenziale di questa nuova classe di coniugati come sistemi multifunzionali per l'applicazione antitumorali e di approfondire la cooperazione tra il nucleo NDI e il centro metallico di Ru (III).

In conclusione, il lavoro svolto ha consentito di sviluppare una piattaforma sintetica versatile per la preparazione di derivati NDI funzionalizzati e ha posto le basi per la realizzazione di una nuova classe di coniugati NDI-RU (III). Sebbene la fase di complessazione richieda ulteriori ottimizzazioni, i risultati ottenuti rappresentano un punto di partenza significativo per il proseguimento del progetto e per la successiva valutazione delle proprietà e biologiche di questi sistemi. Il presente lavoro costituisce quindi la base per il proseguimento del progetto di ricerca sviluppato in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Claudia Riccardi presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Napoli Federico II.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 CARATTERISTICHE STRUMENTALI

REAGENTI E SOLVENTI

Tutti i reagenti e i solventi impiegati nel corso del lavoro sperimentale sono stati acquistati da fornitori commerciali (Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, TCI Chemicals e Fluorochem) e utilizzati senza ulteriori procedure di purificazione, salvo diversa indicazione. Tutti i solventi anidri utilizzati nelle reazioni condotte in atmosfera inerte sono stati impiegati come forniti dal produttore.

SINTESI ASSISTITA DA MICROONDE

Tutte le reazioni assistite da irradiazione a microonde sono state eseguite utilizzando un sintetizzatore Biotage Initiator+, impiegato per le reazioni di sostituzione nucleofila aromatica descritte nel presente lavoro.

NMR

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare ^1H e ^{13}C sono stati registrati su uno spettrometro Bruker AVANCE 400 MHz. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione (PPM) e riferiti al tetrametilsilano (TMS) come standard interno.

HPLC ANALITICA

Le analisi cromatografiche sono state eseguite mediante un sistema Agilent 1260 Series equipaggiato con una colonna Agilent Zorbax C18 ($3\mu\text{m}$, $5,6 \times 50\text{ mm}$), utilizzando una portata di $1,4\text{ mL/min}$. Il metodo cromatografico impiegato prevedeva un'eluizione isocratica iniziale per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95% H_2O contenente 0,1% TFA e 5% acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino al 60% di acetonitrile in 8 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 4 minuti. Tutte le analisi sono state eseguite iniettando $10\text{ }\mu\text{L}$ di soluzione campione, monitorando l'assorbanza a $\lambda = 256\text{ nm}$.

HPLC PREPARATIVA

La purificazione dei composti sintetizzati è stata effettuata mediante HPLC preparativa in fase inversa utilizzando un sistema Agilent Technologies 1260 Infinity equipaggiato con una colonna waters XSelect CSH Prep C18 OBT ($5\text{ }\mu\text{m}$, $100 \times 30\text{ mm}$) e una portata di 30 mL/min . Le purificazioni sono state eseguite utilizzando differenti metodi cromatografici, selezionati in funzione delle caratteristiche dei composti analizzati:

- Metodo A: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 60 % di acetonitrile in 15 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 500$ e 256 nm .
- Metodo B: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 60 % di acetonitrile in 15 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 600$ e 256 nm .
- Metodo C: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 70 % di acetonitrile in 18 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 500$ e 256 nm .
- Metodo D: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 70 % di acetonitrile in 18 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 600$ e 256 nm .
- Metodo E: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 40 % di acetonitrile in 15 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 600$ e 256 nm .
- Metodo F: eluizione isocratica per 2 minuti con una fase mobile costituita da 95 % di H₂O contenente 0,1 % di TFA e 5 % di acetonitrile, seguita da un gradiente lineare fino a 60 % di acetonitrile in 15 minuti e da un'eluizione isocratica finale di 5 minuti. La rivelazione è stata effettuata a $\lambda = 600$ e 256 nm .

SPETTROMETRIA DI MASSA (HPLC-DAD-MS)

Le analisi di spettrometria di massa sono state effettuate con un sistema Agilent 1260 Infinity II HPLC-DAD-MS, accoppiato a uno spettrometro di massa Agilent InfinityLab LC7MSD. Le separazioni cromatografiche sono state effettuate utilizzando una colonna Agilent C18 (1,8 μm , 2,1 x 50 mm) con una portata di 1,4 mL/min. la fase mobile era costituita da acqua contenente 0,1% di acido formico e acetonitrile contenente 0,1% di

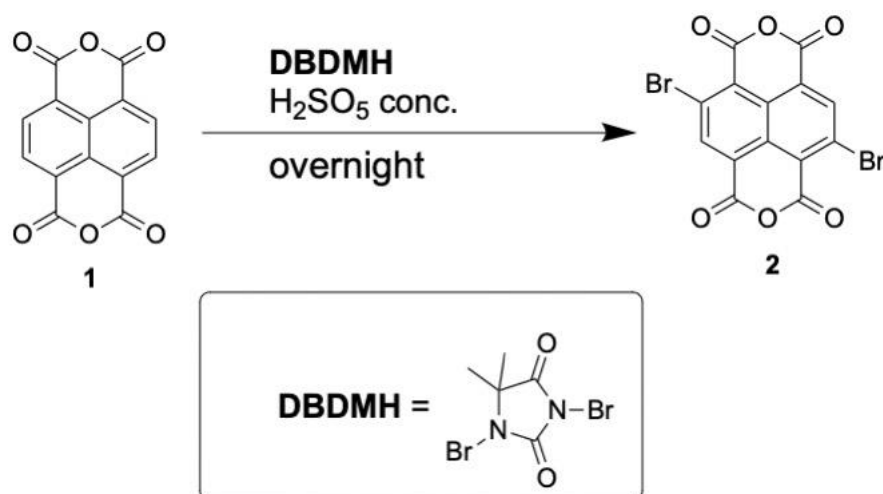
acido formico. Il metodo prevedeva un'eluizione isocratica iniziale di 2 minuti (95% fase acquosa/5% acetonitrile), seguita da un gradiente lineare fino al 60% di acetonitrile in 10 minuti. L'iniezione dei campioni è stata compresa tra 1 e 5 μL , monitorando l'assorbanza a $\lambda = 256 \text{ nm}$.

SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE (HRMS)

Le analisi di massa esatta sono state eseguite mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) utilizzando un sistema X500B QTOF (ABSciex) equipaggiato con sorgente di ionizzazione ESI (Electrospray Ionization). I dati di massa sono stati acquisiti in modalità positiva o negativa in funzione delle caratteristiche dei composti analizzati e utilizzati per confermare la formula molecolare dei prodotti sintetizzati attraverso il confronto tra la massa esatta calcolata e quella sperimentale. La spettrometria HRMS consente infatti la determinazione accurata del rapporto massa/carica (m/z) degli ioni con elevata accuratezza, permettendo la conferma della composizione elementare dei composti sintetizzati.

5.2 SINTESI

- Dianidride 2,6-dibromonaftalene-1,4,5,8-tetracarbossilica (**2**)



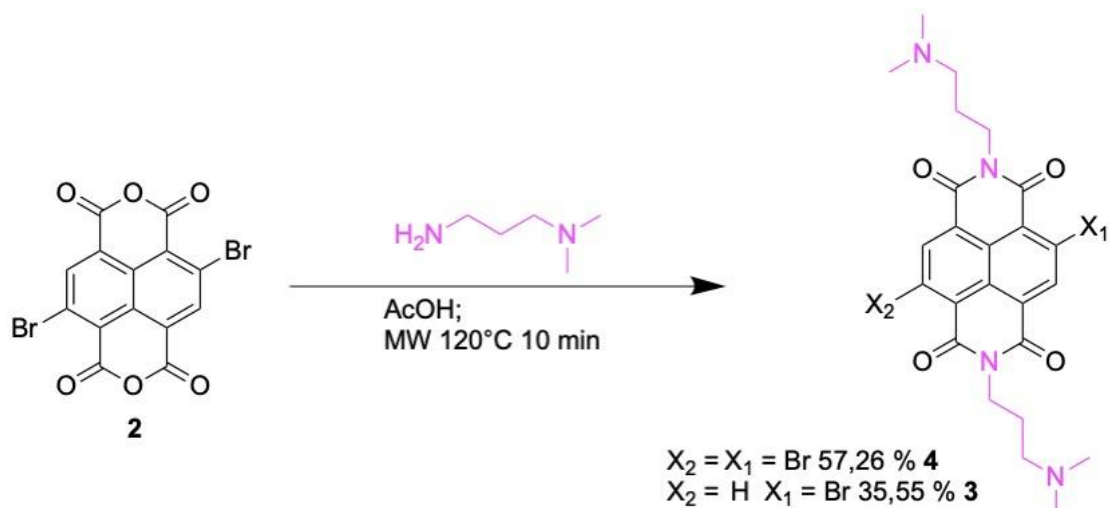
La dianidride 1,4,5,8-naftalentetracarbossilica **1** (2,00 g; 1,0 eq.) è stata sospesa in 50 mL di acido solforico concentrato. Successivamente è stata aggiunta 1,3-dibromo-5,5-dimetilidantoina (**DBDMH**) (3,00 g; 1,5 eq.) e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 130°C per 16 ore. Al termine della reazione, la miscela è stata versata su ghiaccio, favorendo la precipitazione di un solido giallo. Il

precipitato è stato raccolto per filtrazione, lavato accuratamente con acqua fino a neutralità e asciugato, ottenendo il derivato bromurato **2**, utilizzato nello stadio sintetico successivo senza ulteriori purificazioni.

Composto **2** resa = 90,90 %.

A causa della scarsa solubilità del composto nei comuni solventi deuterati, non è stato possibile effettuarne la caratterizzazione mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$.

4-bromo-2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone (**3**) e 4,9-dibromo-2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone (**4**)

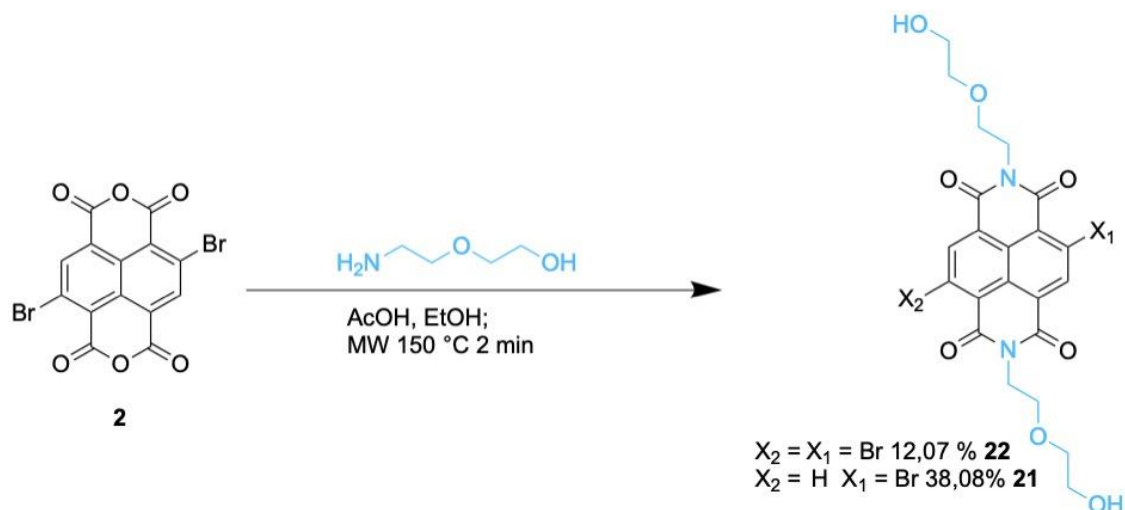


Il derivato bromurato **2** (0,50 g; 1,0 eq) è stato sospeso in acido acetico glaciale e la miscela di reazione è stata trattata con N,N-dimetilpropano-1,3-diammina (2,5 eq). La reazione è stata condotta mediante irradiazione a microonde a 120 °C per 10 minuti. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con acqua e neutralizzata fino a pH circa 7 mediante aggiunta di carbonato di sodio. Successivamente, il prodotto è stato estratto con diclorometano (3 volte per 30 mL). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), filtrate e concentrate a pressione ridotta, ottenendo una miscela dei derivati **3** e **4**, utilizzata nello stadio sintetico successivo senza ulteriori purificazioni.

Composto **3** Resa = 35,55 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 4,571 minuti.

Composto **4** Resa = 57,26 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 4,827 minuti.

- 4-bromo-2,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone **21** e 4,9-dibromo-2,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone **22**

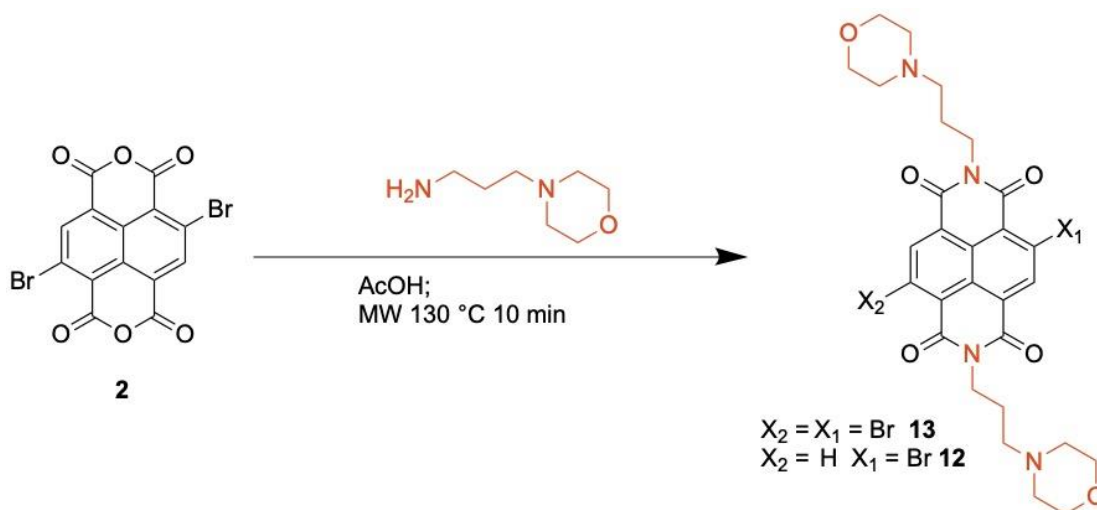


Il derivato bromurato **2** (0,50 g, 1,0 eq.) è stato sospeso in una miscela di acido acetico glaciale/etanolo (45:55, V/V). successivamente è stato aggiunto 2-(2-amminoetossi)etan-1olo (2,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 150 °C per 2 minuti. Al termine della reazione dei solventi, ottenendo una miscela dei derivati **21** e **22**, utilizzata nello stadio sintetico successivo senza ulteriori purificazioni.

Composto **21** Resa = 38,08 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 6,001 minuti.

Composto **22** Resa = 12,07 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 6,267 minuti.

- 4-bromo-2,7-bis(3-morpholinopropyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone (**12**)
- 4,9-dibromo-2,7-bis(3-morpholinopropyl)benzo[*lmn*][3,8]phenanthroline-1,3,6,8(2H,7H)-tetraone (**13**)

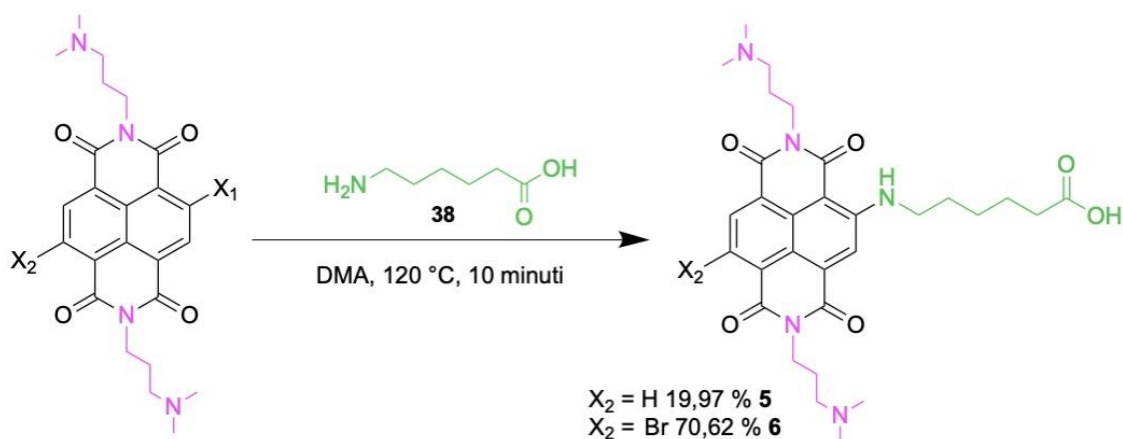


Il derivato bromurato **2** (0.50 g, 1,0 eq.) è stato sospeso in acido acetico glaciale. Successivamente è stata aggiunta 3-morfolinopropan-1-ammina (2,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 130 °C per 10 minuti. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con acqua e neutralizzata mediante aggiunta di carbonato di sodio fino a pH 7. Il prodotto è stato quindi estratto con diclorometano (DCM) (3 x 30 mL). Le fasi organiche sono state riunite ed anidificate con solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), filtrate e concentrate a pressione ridotta, ottenendo una miscela dei derivati **12** e **13**, utilizzati nello studio sintetico successivo senza ulteriori purificazioni.

Composto 12 Resa = 41.90 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5,269 minuti.

Composto 13 Resa = 43,57 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5,517 minuti.

- 6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**5**)
- 6-((9-bromo-2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**6**)



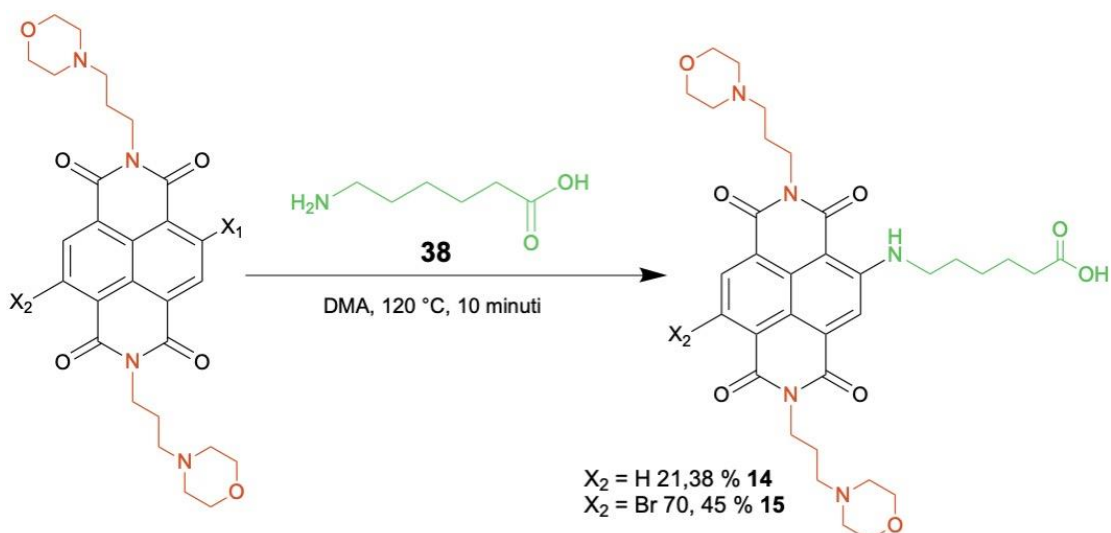
La miscela dei composti **3** e **4** (0,250 g, 1,0 eq.) sono stati disciolti in N,N-dimetilacetamide. Successivamente è stato aggiunto acido 6-amminoesanoico (1,2 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 10 minuti, al fine di promuovere la sostituzione nucleofila aromatica del gruppo bromuro presente sul core NDI. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa, al fine di separare il derivato bromurato (**6**) dal corrispondente non bromurato (**5**). La purificazione è stata eseguita il **metodo A**.

Le frazioni **5** e **6** poi successivamente sono state concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor.

Composto **5** Resa = 19,97 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5.08 minuti (98,5 %). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 565.5 [564.5 + 1H]⁺ m/z.

Composto **6** Resa = 70,62 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5.37 minuti (99 %). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 645.5 [644.5 + 1H]⁺ m/z.

- 6-((2,7-bis(3-morpholinopropyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenantrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**14**)
- 6-((9-bromo-2,7-bis(3-morpholinopropyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenantrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**15**)



La miscela dei composti **12** e **13** (0,250 g, 1,0 eq.) sono stati disciolti in DMA. Successivamente è stato aggiunto acido 6-amminoesanoico (1,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 10 minuti, al fine di promuovere la sostituzione nucleofila aromatica del gruppo bromuro presente sul core NDI. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa, al fine di separare il derivato **14** dal derivato **15**.

La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo A**.

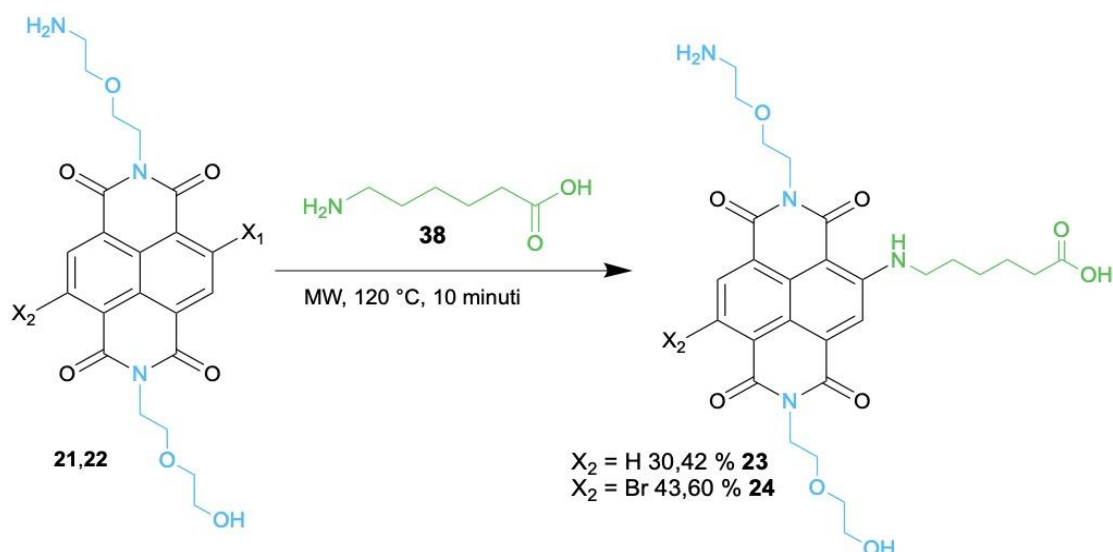
Le frazioni **14** e **15** sono state concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor ottenendo così i composti puri **14** e **15**.

Composto **14** Resa = 21,38 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5,23 minuti (99,4%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 650,60 [649,74 + 1H]⁺ m/z.

Composto **15** Resa = 70,45 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 5,68 minuti. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 730,50 [728,64 + 2H]⁺ m/z.

- 6-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethyl)-7-(2-(2-hydroxyethoxy(ethyl)-1-3-6-8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthroline-4-yl)amino)hexanoic acid (**23**)

6-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethyl)-9-bromo-7-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthroline-4-yl)amino)hexanoic acid (**24**)



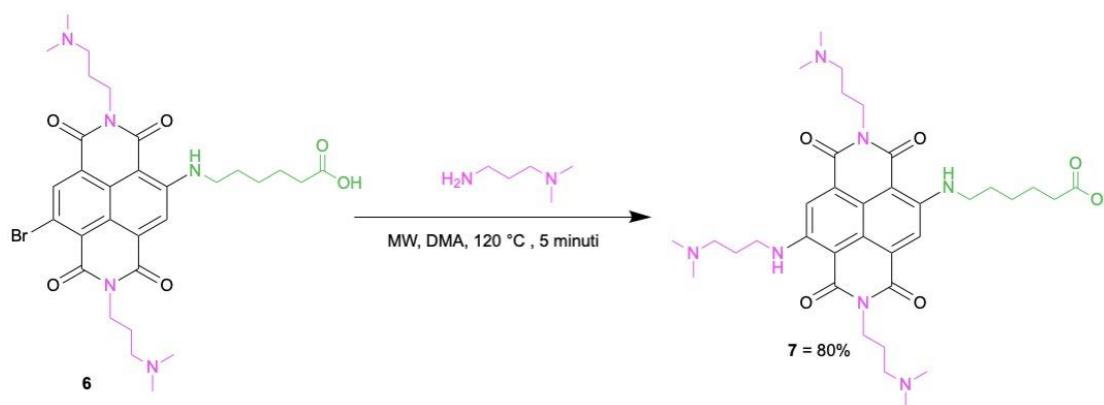
La miscela di composti **21** e **22** (0,250 g, 1,0 eq.) sono stati disciolti in DMA. Successivamente è stato aggiunto acido 6-amminoesanoico (2,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 10 minuti, al fine di promuovere la sostituzione nucleofila aromatica del gruppo bromuro presente sul core NDI. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa, al fine di separare il composto **23** dal composto **24**. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo C**.

La frazione **23** e **24** sono state concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor, ottenendo così i composti puri **23** e **24**.

Composto **23** Resa = 30,42 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 6,28 minuti (98.1%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 572,50 [571,58 + 1H]⁺ m/z.

Composto **24** Resa = 43,60 %. Tempo di ritenzione HPLC analitica: 6,67 minuti (99.5%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 652,40 [650,48 + 1H]⁺ m/z.

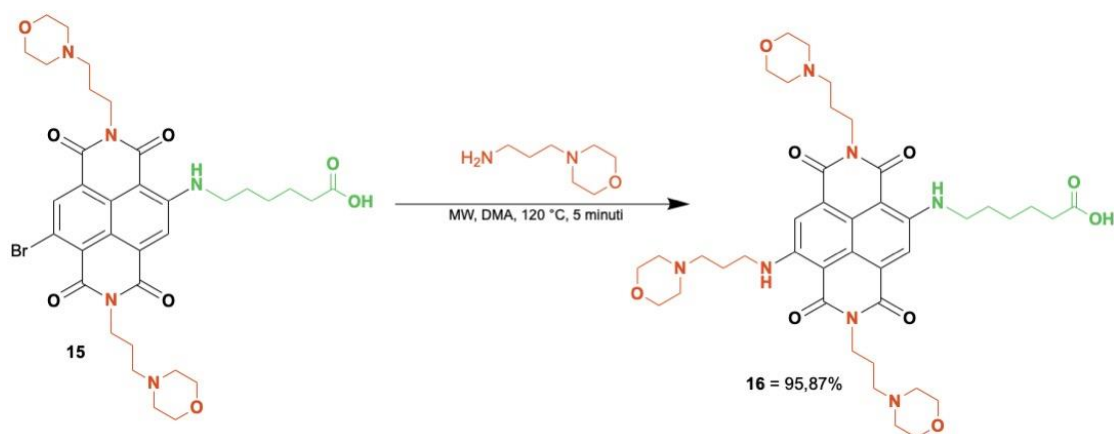
- 6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-9-((3-(dimethylamino)propyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthroline-4-yl)amino)hexanoic acid (**7**)



Il composto **6** (0,250 g, 1,0 eq.) è stato disciolto in DMA. Successivamente è stata aggiunta l'ammina **39** (1,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 5 minuti, al fine di sostituire il secondo atomo di bromo presente sul core NDI mediante una reazione di sostituzione nucleofila aromatica. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo B**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor, ottenendo il composto puro **7**.

Composto **7** Resa = 80%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,40 minuti (99,05%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 666,60 [665,84 + 1H]⁺ m/z.

- 6-((2,7-bis(3-morpholinopropyl)-9-((3-morpholinopropyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenantrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**16**)



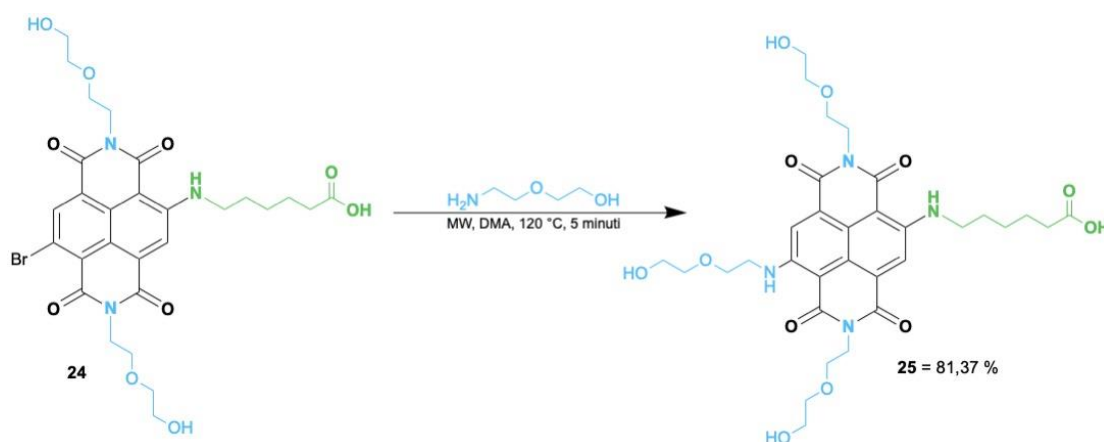
Il composto **15** (0,250 g, 1,0 eq.) è stato disciolto in DMA. Successivamente è stata aggiunta l'ammina **41** (1,5 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 5 minuti, al fine di sostituire il secondo atomo di bromo presente sul core NDI mediante una reazione di sostituzione nucleofila aromatica. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo B**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor, ottenendo il composto puro **16**.

Composto **16** Resa = 95,87%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,88 minuti (99,95%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 792,70 [$791,95 + 1\text{H}$] $^+$ m/z.

δ (ppm): ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): δ_{H} (400 MHz, MeOD) 7.92 (2 H, s), 4.25 (4 H, t, J 6.8), 3.93 (13 H, d, J 100.1), 3.66 (3 H, dd, J 13.0, 6.0), 3.61 – 3.36 (11 H, m), 3.31 (21 H, dt, J 3.3, 1.6), 2.40 (2 H, t, J 7.3), 2.32 – 2.24 (2 H, m), 2.20 (4 H, td, J 13.4, 8.7), 1.85 (2 H, p, J 7.2), 1.76 (2 H, q, J 7.6), 1.61 (2 H, tt, J 9.0, 5.6).

^{13}C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO) 174.40, 165.57 (d, J 2.5), 162.35, 148.55, 148.22, 125.46 (d, J 7.1), 120.62 (d, J 16.0), 118.64, 101.64, 101.00, 63.47, 56.01, 53.91, 51.33, 51.12, 33.60, 28.54, 26.03, 24.17, 22.22, 1.14.

- 6-((2,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-9-((2-(hydroxymethoxy)ethyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoic acid (**25**)



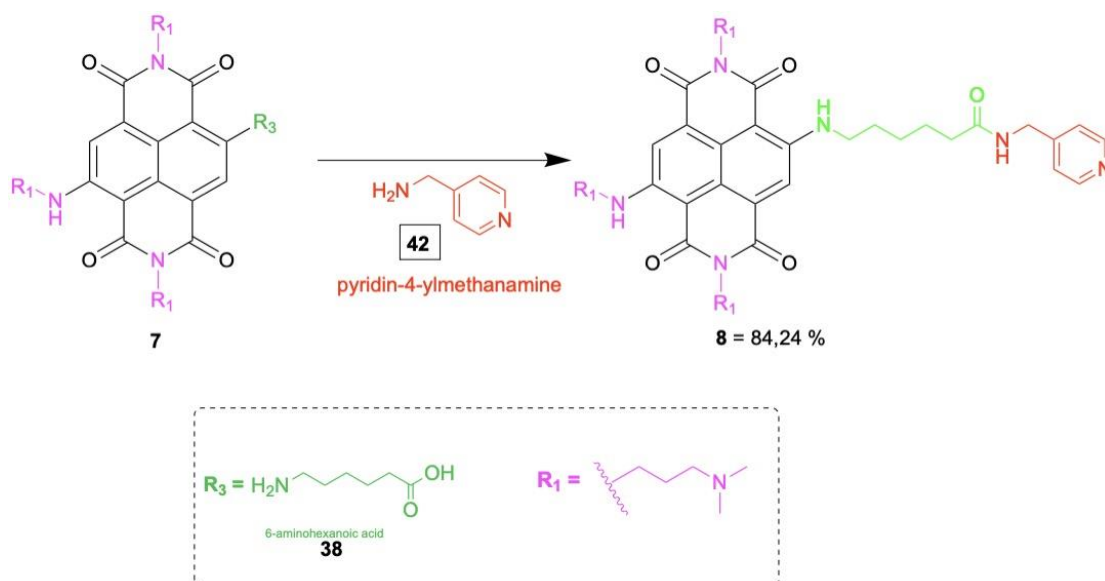
Il composto **24** (0,250 g, 1,0 eq.) è stato disciolto in DMA. Successivamente è stata aggiunta l'ammina **40** (12,0 eq.) e la miscela di reazione è stata sottoposta a irradiazione a microonde a 120 °C per 5 minuti, al fine di sostituire il secondo atomo di bromo presente sul core NDI mediante una reazione di sostituzione nucleofila aromatica. Al termine della reazione, la miscela è stata diluita con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposta a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo D**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor, ottenendo il composto puro **25**.

Composto **25** Resa = 81,37%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 6,48 minuti (98,5%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 675,50 [674,70+ 1H]⁺ m/z.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): δ_{H} (400 MHz, MeOD) 7.06 (1 H, d, J 10.3), 3.96 (2 H, t, J 7.8), 3.86 – 3.79 (2 H, m), 3.75 – 3.70 (3 H, m), 3.67 – 3.62 (4 H, m), 3.39 – 3.34 (1 H, m), 3.13 (1 H, s), 2.45 (1 H, t, J 7.3), 1.83 – 1.73 (2 H, m), 1.63 – 1.56 (1 H, m).

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, MeOD) 175.79, 162.88, 148.89, 124.90, 120.44, 101.13, 73.62 (d, J 14.8), 70.11, 68.75, 62.29 (d, J 14.0), 34.70, 29.84, 27.80, 25.80, 0.77.

- 6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-9-((3-(dimethylamino)propyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenanthroline-4-yl)amino)-N-(pyridine-4-ylmethyl)hexanamide(**8**)

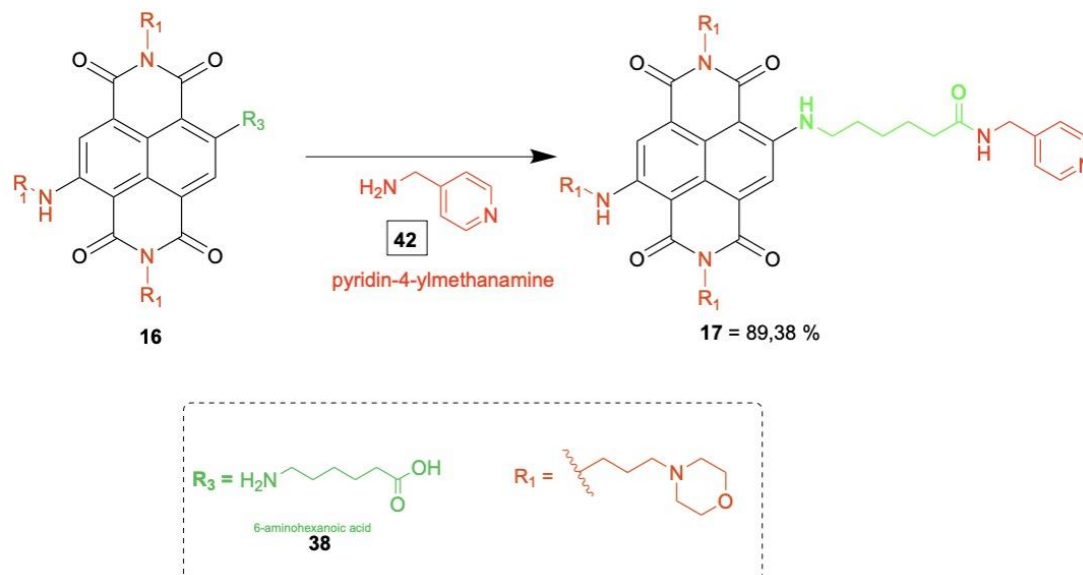


Il composto **7** (50 mg, 1,0eq.) è stato disciolto in 3 mL di N,N-dimetilformammide anidra (DMF dry) in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante, è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stata aggiunta piridin-4-ilmetanamina (**42**) (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori 10 minuti, è stata aggiunta la DIPEA (1,5 eq.). terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata a reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluito con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa.

La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo E**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **8**.

Composto **8** Resa = 84,24%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 4,78 minuti (99,5%). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 757,70 [755,95+ 1H]⁺ m/z.

- 6-((2,7-bis(3-morpholinopropyl)-9-((3-morpholinopropyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenantrolin-4-yl)amino-N-(pyridin-4-yl)methyl)hexanamide (**17**)

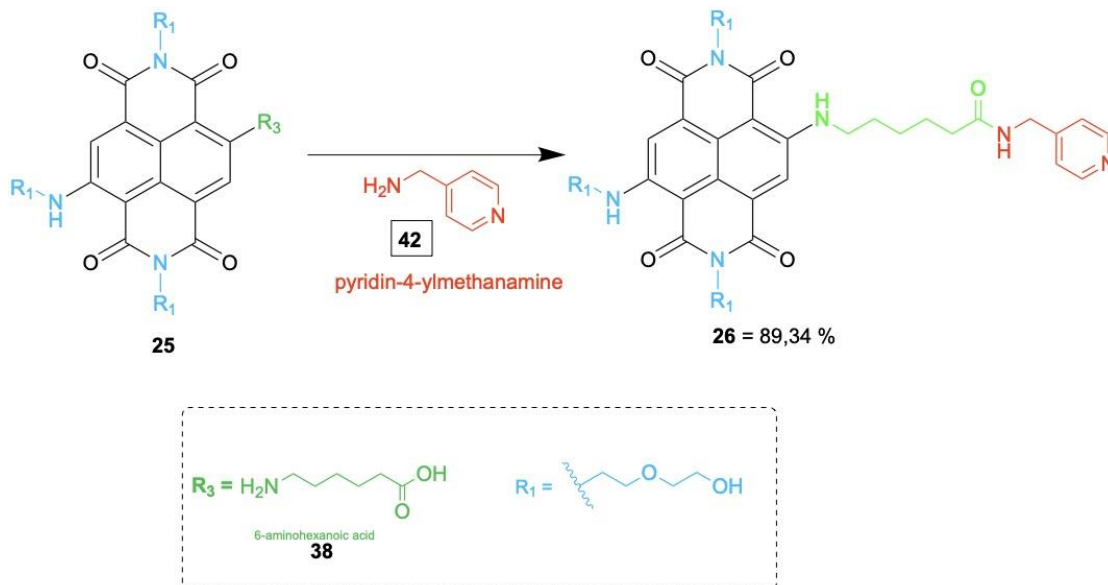


Il composto **16** (50 mg, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante, è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stata aggiunta la piridina **42** (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori minuti, è stata aggiunta DIPEA (1,5 eq.). terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMFF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluiti con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa.

La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo E**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **17**

Composto **17** Resa = 89,38%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,11 minuti (99,3 %). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 882,80 [881,09+ 1H]⁺ m/z.

- 6-((2,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-9-((2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[lmn][3,8]phenantroli-4-yl)amino)-N-(pyridin-4-ylmethyl)hexanamide (**26**)

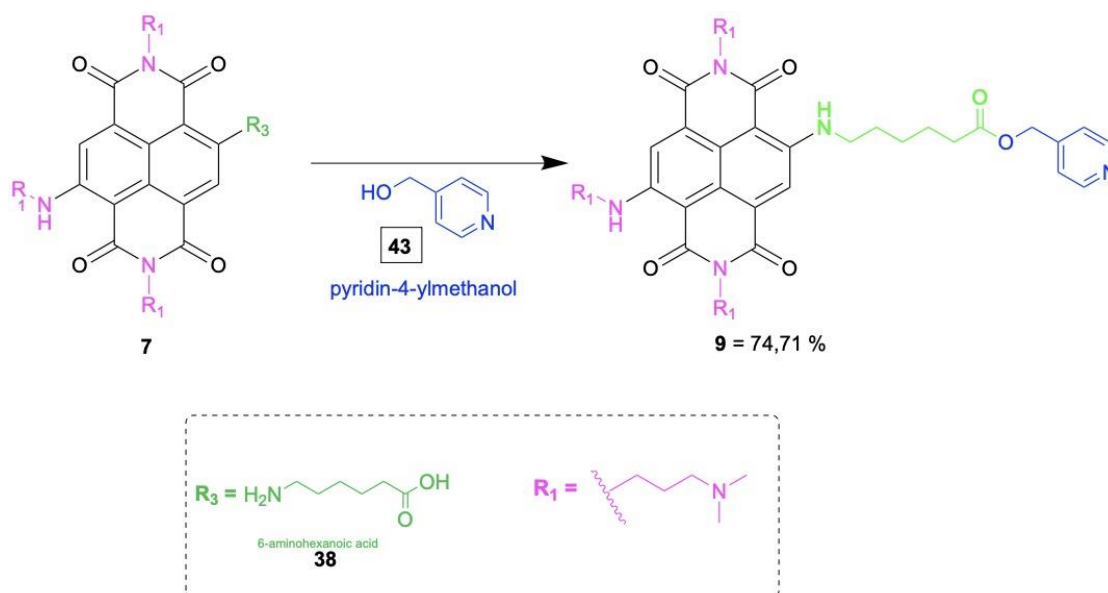


Il composto **25** (50 mg, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante, è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stata aggiunta la piridina **42** (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori minuti, è stata aggiunta DIPEA (1,5 eq.). terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluiti con una soluzione acquosa di HCl al 10 % e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa.

La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo F**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **26**

Composto **26** Resa = 89,34%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 7,20 minuti (98,7 %). HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 765,60 [764,83+ 1H]⁺ m/z.

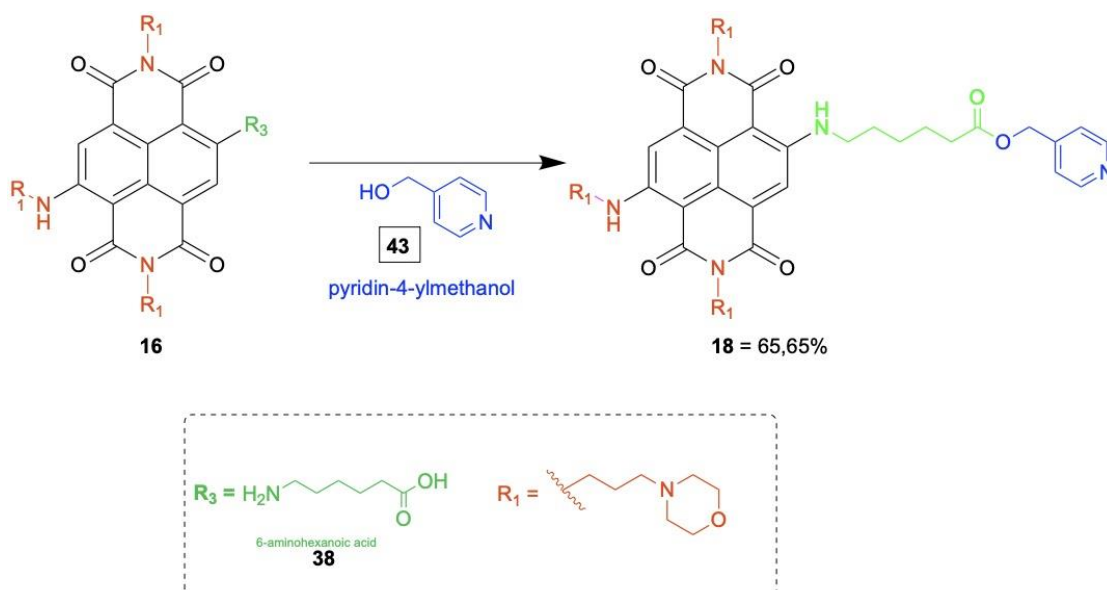
- pyridin-4-ylmethyl-6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-9-((3-(dimethylamino)propyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoate (**9**)



Il composto **7** (0,50, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stato aggiunto pyridin-4-ylmethanol (**43**) (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori 10 minuti, è stata aggiunta la DIPEA (1,5 eq.). terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluito con una soluzione acquosa di HCl e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo E**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **9**.

Composto **9** Resa = 74,71%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,35 minuti. HPLC-MS (ESI, modalità positiva) :757,70 [756,96+ 1H]⁺ m/z.

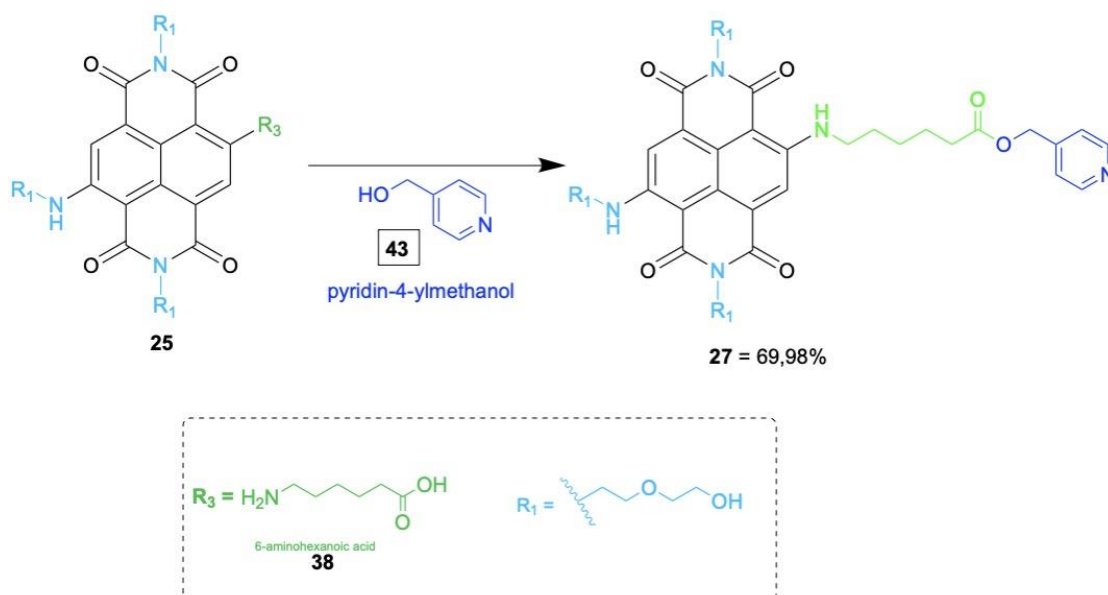
- pyridin-4-ylmethyl-6-((2,7-bis(3-morpholinopropyl)-9-((3-morpholinopropyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoate (**18**)



Il composto **16** (0,50, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stata aggiunta la piridina (**43**) (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori 10 minuti, è stata aggiunta la DIPEA (1,5 eq.). terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluito con una soluzione acquosa di HCl e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo E**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **18**.

Composto **18** Resa = 65,65%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,59 minuti. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 883,80 [882,08+ 1H]⁺ m/z.

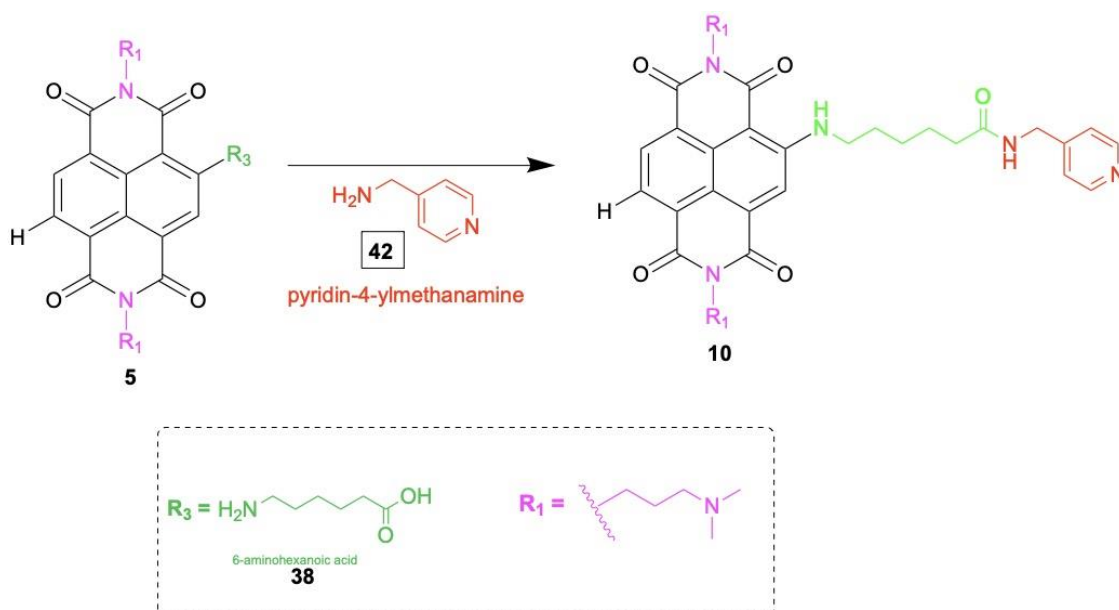
- pyridin-4-ylmethyl-6-((2,7-bis(2-(2-aminoethoxy)ethyl)-9-((2-(2-aminoethoxy)ethyl)amino)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)hexanoate (**27**)



Il composto **25** (0,50, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). dopo 10 minuti di agitazione è stato aggiunta la piridina (**43**) (1,2 eq.) e, trascorsi ulteriori 10 minuti, è stata aggiunta la DIPEA (1,5 eq.). Terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluito con una soluzione acquosa di HCl e sottoposto a purificazione mediante HPLC preparativa in fase inversa. La purificazione è stata eseguita utilizzando il **metodo F**. Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state riunite, concentrate a pressione ridotta mediante rotavapor e successivamente liofilizzate, ottenendo il composto puro **27**.

Composto **27** Resa = 69,98%. Tempo di ritenzione HPLC analitica = 5,54 minuti. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 766,60 [765,83+ 1H]⁺ m/z.

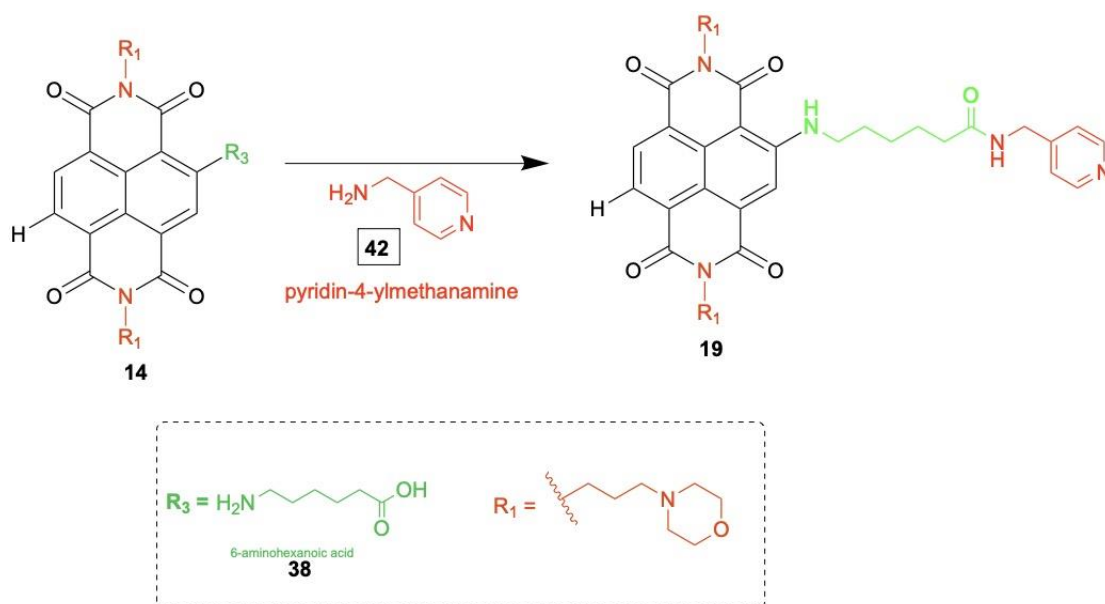
- 6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)-*N*-(pyridin-4-ylmethyl)hexanamide (**10**)



Il composto **5** (0,50 mg, 1,0 eq.) è stato disciolto in 3 mL di DMF dry in atmosfera inerte. La soluzione è stata raffreddata a 0°C mediante bagno di ghiaccio e, mantenendo la temperatura costante, è stato aggiunto HATU (1,8 eq.). Dopo 10 minuti di agitazione è stata aggiunta la piridina **42** (1,2 eq.) e trascorsi ulteriori 10 minuti, è stata aggiunta la DIPEA (1,5 eq.). Terminata l'aggiunta dei reagenti, il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata lasciata reagire per tutta la notte a temperatura ambiente, mantenendo l'atmosfera inerte per tutta la durata della reazione. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor. Il residuo di reazione è stato quindi diluito con una soluzione acquosa di HCl 10 %, ottenendo cos' il prodotto grezzo **10**, successivamente destinato alle fasi di purificazione, caratterizzazione e complessazione.

Composto **10** Resa = 80,3%. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 665,80 [666,81+1H]⁺ m/z.

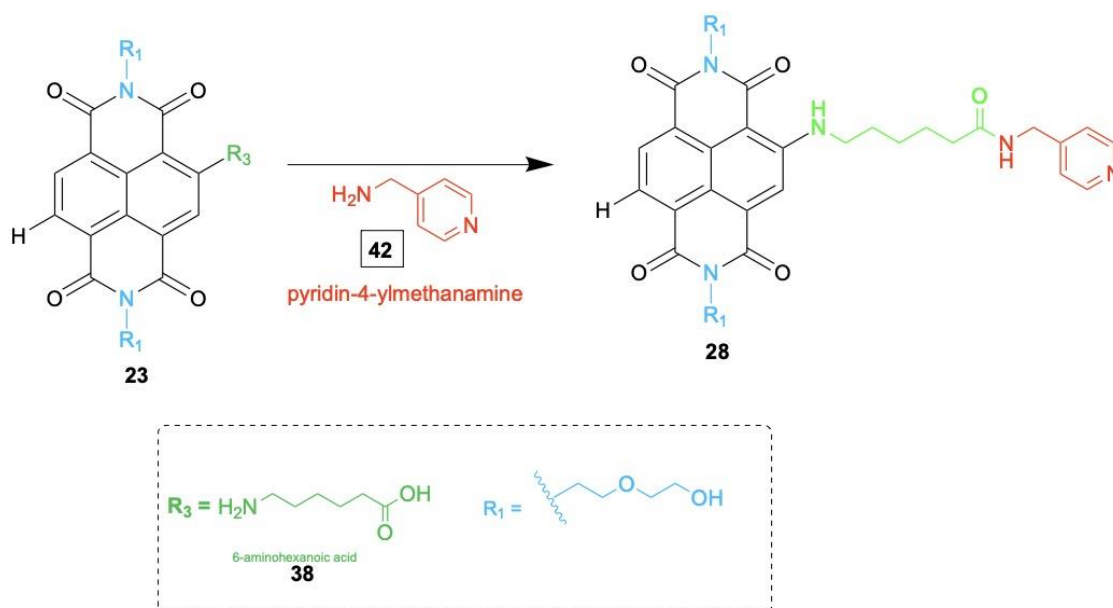
- 6-((2,7-bis(3-(dimethylamino)propyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)-*N*-(pyridin-4-ylmethyl)hexanamide (**19**)



Il composto **19** è stato ottenuto a partire dal composto **14** seguendo la medesima procedura sperimentale descritta per la sintesi del composto **10**. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor e il residuo di reazione è stato diluito con una soluzione acquosa di HCl al 10%, ottenendo il prodotto grezzo **19**, successivamente destinato alle fasi di purificazione, caratterizzazione e complessazione.

Composto **19** Resa = 73,60,%. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 740,87 [739,87+1H]⁺ m/z.

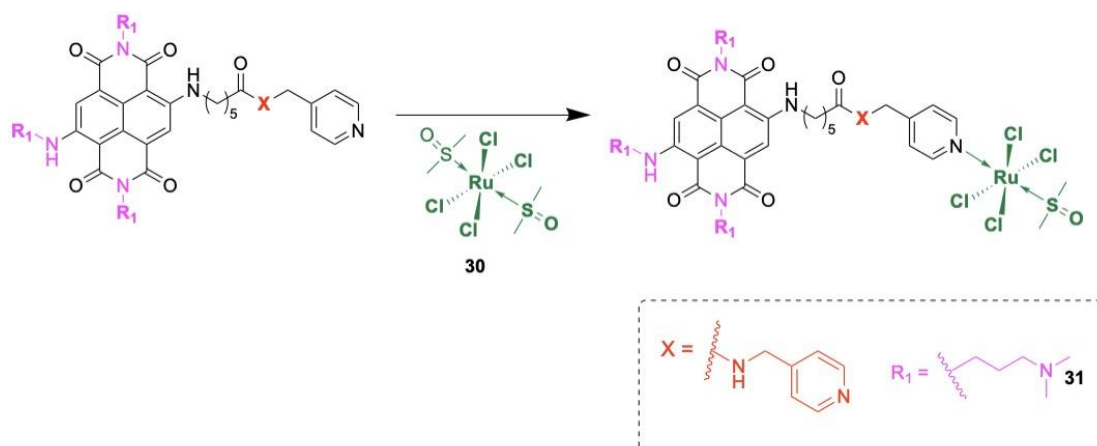
- 6-((2,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1,3,6,8-tetraoxo-1,2,3,6,7,8-hexahydrobenzo[*lmn*][3,8]phenanthrolin-4-yl)amino)-*N*-(pyridin-4-ylmethyl)hexanamide (**28**)



Il composto **28** è stato ottenuto a partire dal composto **23** seguendo la medesima procedura sperimentale descritta per la sintesi del composto **10**. Al termine della reazione, la DMF dry è stata rimossa a pressione ridotta mediante rotavapor e il residuo di reazione è stato diluito con una soluzione acquosa di HCl al 10%, ottenendo il prodotto grezzo **28**, successivamente destinato alle fasi di purificazione, caratterizzazione e complessazione.

Composto **28** Resa = 65,90,%. HPLC-MS (ESI, modalità positiva): 662,72 [661,71+1H]⁺ m/z.

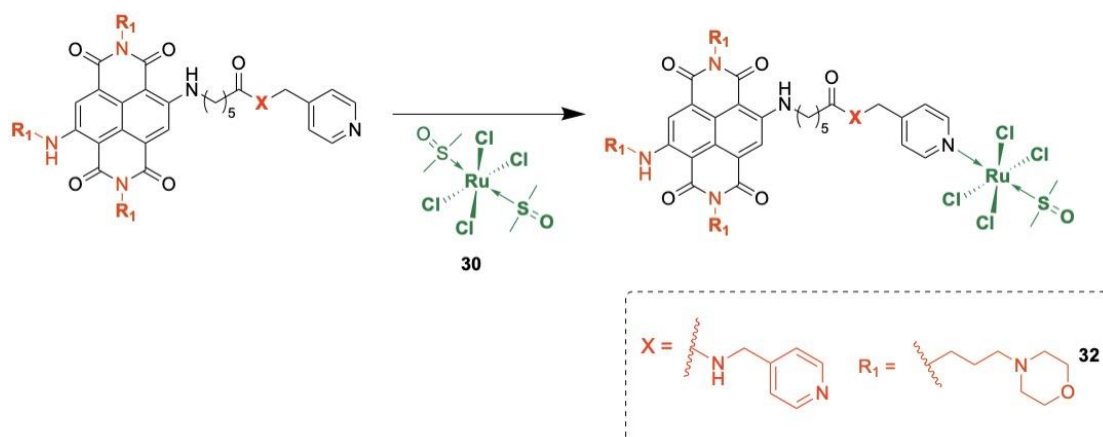
- Sintesi del composto **31**- complessazione del derivato NDI con il precursore di Ru (III) (**31**)



La sintesi del composto **31** è stata effettuata mediante complessazione del derivato **8** con il precursore di rutenio (III) **30**. Il composto **8** (0,025 g, 1,0 eq.) è stato disciolto nel solvente di reazione e trattato con il complesso **30** (2,0 eq.). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente. La procedura è stata inizialmente eseguita utilizzando acetone come solvente, successivamente, la medesima procedura è stata ripetuta sostituendo l'acetone con la DMF, mantenendo invariati la stechiometria dei reagenti, la temperatura e il tempo di reazione.

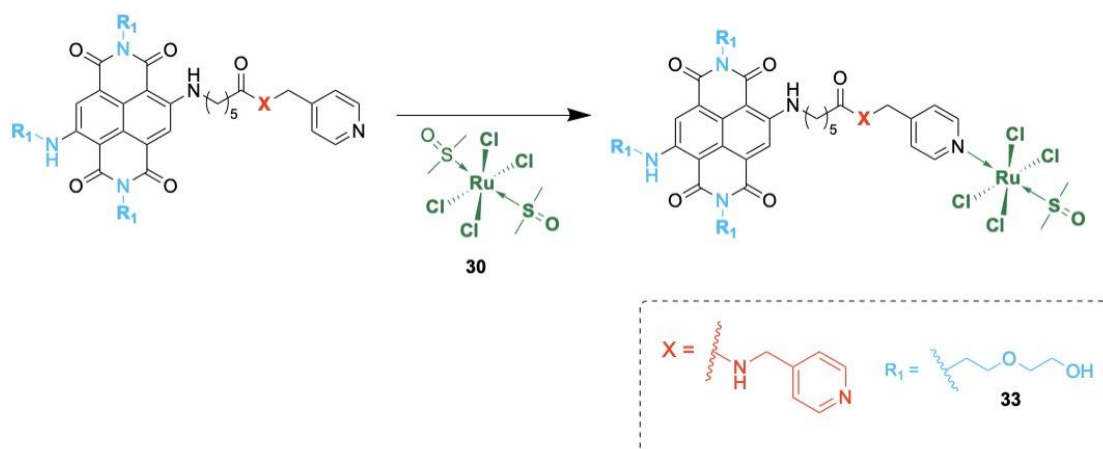
Ulteriori prove di complessazione sono state eseguite impiegando la DMF dry come solvente e operando in atmosfera inerte. Infine, la stessa procedura è stata ripetuta utilizzando acetonitrile anidro (MeCN dry) e mantenendo l'atmosfera inerte, senza apportare ulteriori modifiche alle condizioni sperimentali.

- Sintesi del composto 32- complessazione del derivato NDI con il precursore di Ru (III) (**32**)



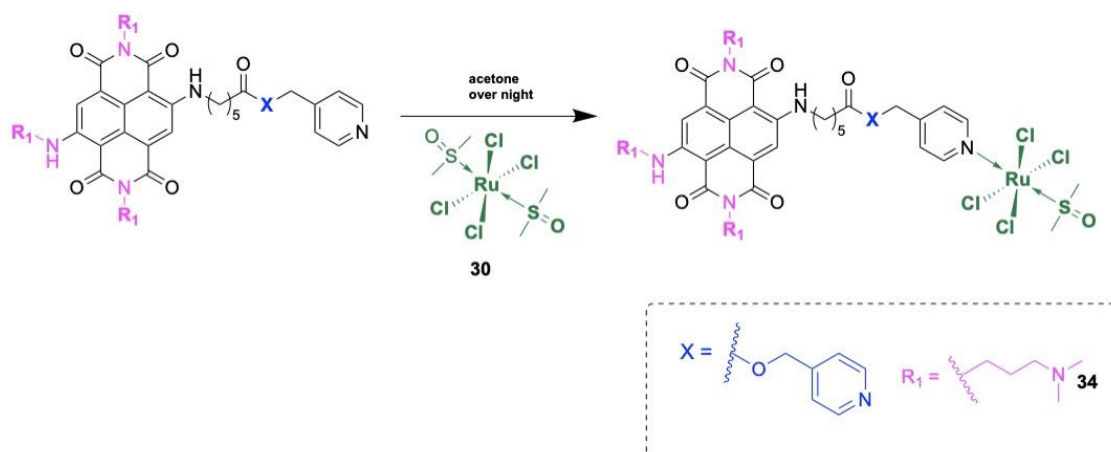
Il composto **32** è stato ottenuto a partire dal composto **17** (0,025 g, 1,0 eq.) mediante complessazione con il precursore di rutenio (III) **30** (2,0 eq.), seguendo le medesime procedure sperimentali descritte per la sintesi del composto **31**.

- Sintesi del composto 33- complessazione del derivato NDI con il precursore di Ru (III) (**35**)



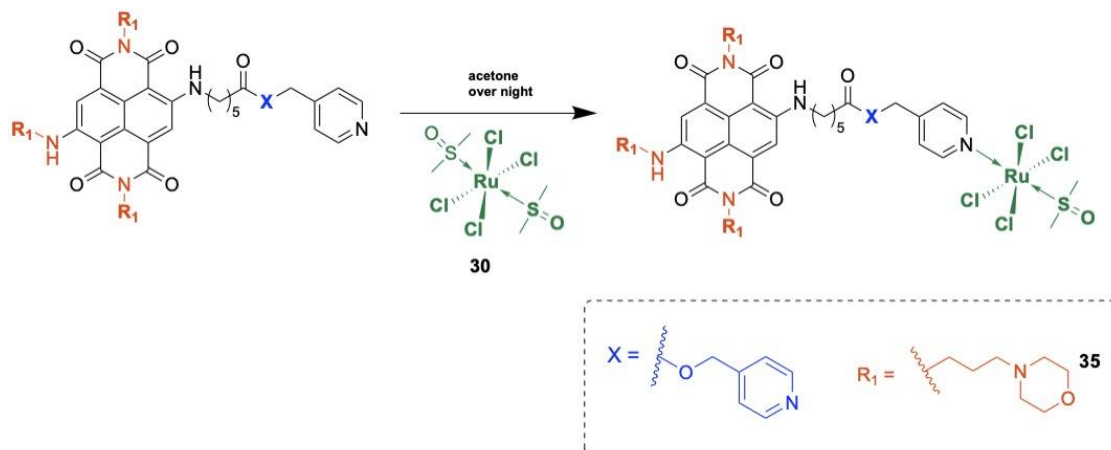
Il composto **33** è stato ottenuto a partire dal composto **26** (0,025 g, 1,0 eq.) mediante complessazione con il precursore di rutenio (III) **30** (2,0 eq.), seguendo le medesime procedure sperimentali descritte per la sintesi del composto **31**.

- Sintesi del composto **34**- complessazione del derivato NDI con il precursore di Ru (III) (**34**)



Il composto **34** è stato ottenuto a partire dal composto **9** (0,025 g, 1,0 eq.) mediante complessazione con il precursore di rutenio (III) **30** (2,0 eq.), seguendo le medesime procedure sperimentali descritte per la sintesi del composto **31**.

- Sintesi del composto **35**- complessazione del derivato NDI con il precursore di Ru (III) (**35**)



Il composto **35** è stato ottenuto a partire dal composto **18** (0,025 g, 1,0 eq.) mediante complessazione con il precursore di rutenio (III) **30** (2,0 eq.), seguendo le medesime procedure sperimentali descritte per la sintesi del composto **31**.

5.3 SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE (HRMS)

La caratterizzazione dei composti sintetizzati è stata effettuata mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione (High-Resolution Mass Spectrometry, HRMS) e sono stati acquisiti mediante ionizzazione elettrospray in modalità positiva (ESI+). I campioni, in quantità di pochi milligrammi, sono stati disciolti in acqua contenente acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,1% prima dell'analisi. Gli spettri ottenuti sono stati utilizzati per confermare la massa molecolare dei composti sintetizzati e verificare l'identità mediante il confronto tra il valore di massa calcolato e quello sperimentale.

L'analisi HRMS è stata eseguita sui derivati NDI ottenuti mediante coupling ammidico, appartenenti alle tre diverse famiglie funzionalizzate con N,N-dimetilpropan-1,3-diammina, 3-morfolinopropan-1-ammina e 2-(2-amminoetossi)etan-1-olo. Gli spettri dei tre composti sono riportati di seguito.

- Derivato NDI 8

HRMS (ESI+): m/z calcolato = $[755,95 + 1H]^+ m/z$; trovato = 756,4507

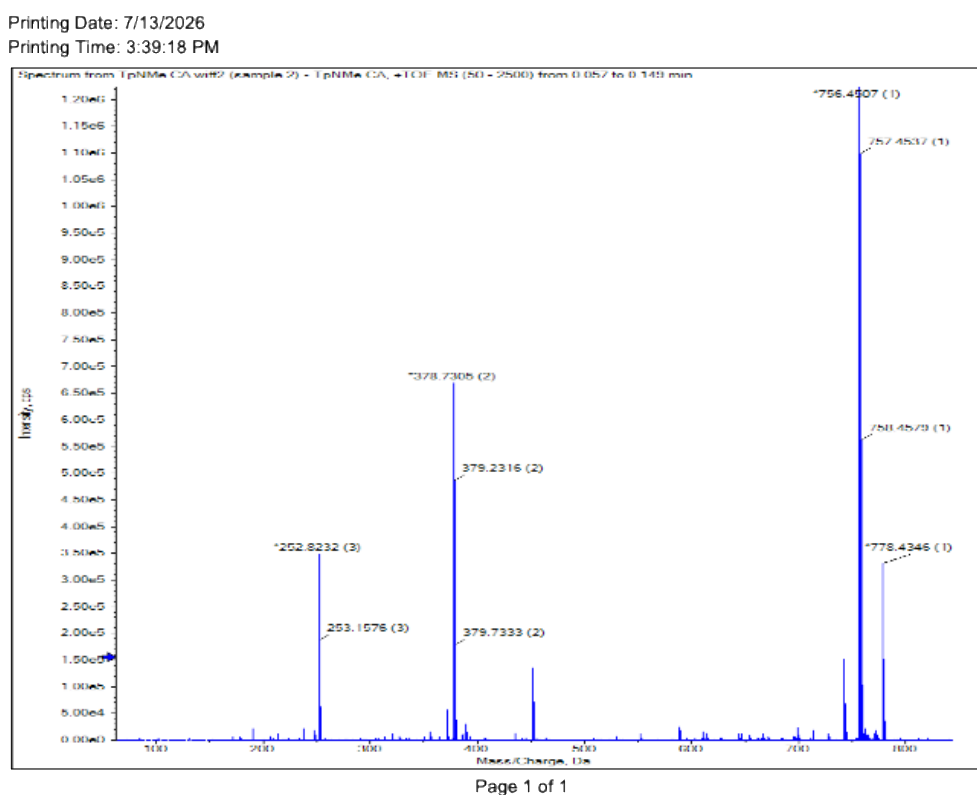
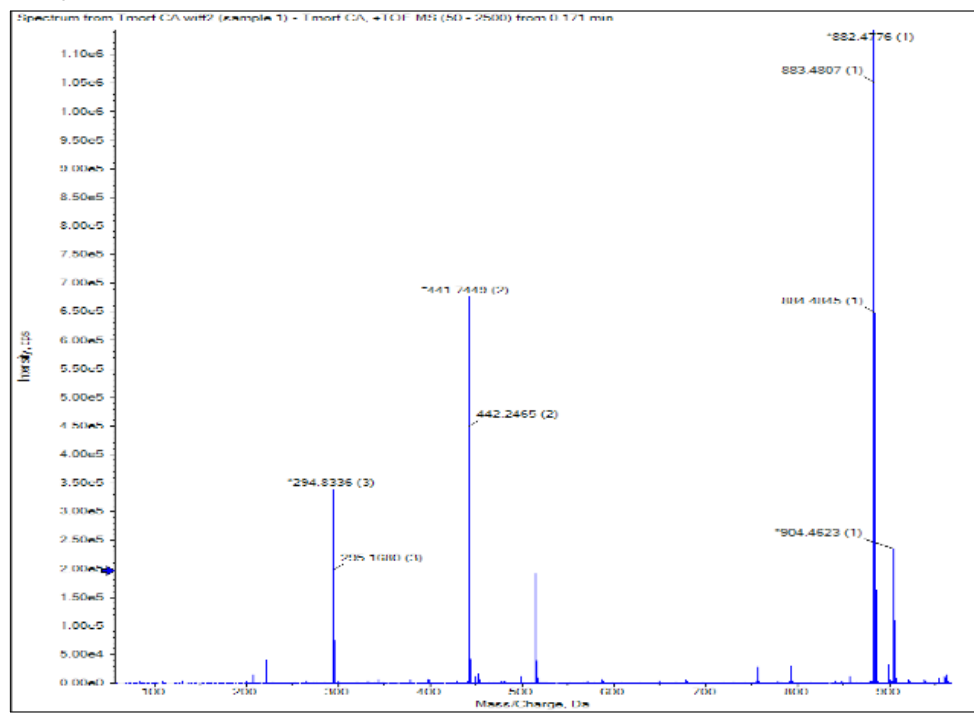


Figura 12 Spettro HRMS (ESI+) del derivato NDI 8

- Derivato NDI 17

HRMS (ESI⁺): m/z calcolato = [881,09+ 1H]⁺ m/z; trovato = 882.4776

Printing Date: 7/13/2026
Printing Time: 3:50:49 PM



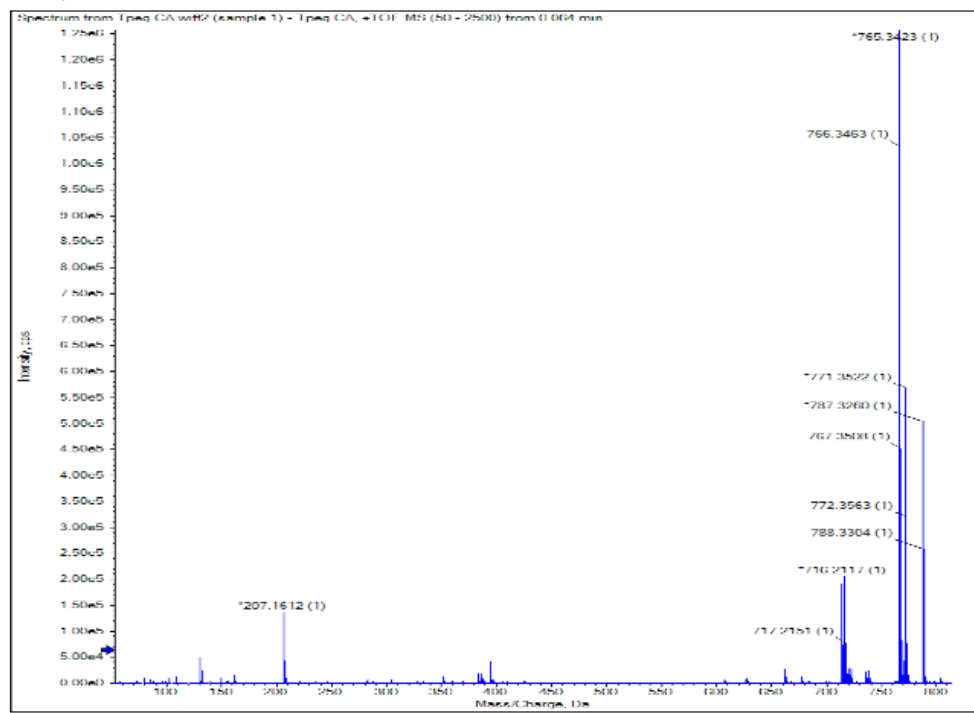
Page 1 of 1

Figura 13 Spettro HRMS (ESI⁺) del derivato NDI 17

- Derivato NDI 26

HRMS (ESI⁺): m/z calcolato = [764,83+ 1H]⁺ m/z; trovato = 765,3423

Printing Date: 7/13/2026
Printing Time: 3:47:37 PM



Page 1 of 1

Figura 14 Figura 15 Spettro HRMS (ESI⁺) del derivato NDI 26

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Pnas00235-0023.
- (2) Varshney, D.; Spiegel, J.; Zyner, K.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. The Regulation and Functions of DNA and RNA G-Quadruplexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21* (8), 459–474. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0236-x>.
- (3) Rhodes, D.; Lipps, H. J. G-Quadruplexes and Their Regulatory Roles in Biology. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (18), 8627–8637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv862>.
- (4) Kosiol, N.; Juranek, S.; Brossart, P.; Heine, A.; Paeschke, K. G-Quadruplexes: A Promising Target for Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20* (1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01328-4>.
- (5) Małgowska, M. Overview of RNA G-Quadruplex Structures. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *63* (4). https://doi.org/10.18388/abp.2016_1335.
- (6) Brázda, V.; Hároníková, L.; Liao, J.; Fojta, M. DNA and RNA Quadruplex-Binding Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (10), 17493–17517. <https://doi.org/10.3390/ijms151017493>.
- (7) Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (19), 5402–5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
- (8) Jana, J.; Mohr, S.; Vianney, Y. M.; Weisz, K. Structural Motifs and Intramolecular Interactions in Non-Canonical G-Quadruplexes. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2* (2), 338–353. <https://doi.org/10.1039/D0CB00211A>.
- (9) Lyu, K.; Chow, E. Y.-C.; Mou, X.; Chan, T.-F.; Kwok, C. K. RNA G-Quadruplexes (rG4s): Genomics and Biological Functions. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (10), 5426–5450. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab187>.
- (10) Phan, A. T. Human Telomeric G - quadruplex: Structures of DNA and RNA Sequences. *FEBS J.* **2010**, *277* (5), 1107–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07464.x>.
- (11) Farag, M.; Mouawad, L. Comprehensive Analysis of Intramolecular G-Quadruplex Structures: Furthering the Understanding of Their Formalism. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52* (7), 3522–3546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae182>.
- (12) Grün, J. T.; Schwalbe, H. Folding Dynamics of Polymorphic G - QUADRUPLEX Structures. *Biopolymers* **2022**, *113* (1), e23477. <https://doi.org/10.1002/bip.23477>.
- (13) Nishio, M.; Tsukakoshi, K.; Ikebukuro, K. G-Quadruplex: Flexible Conformational Changes by Cations, pH, Crowding and Its Applications to Biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *178*, 113030. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113030>.
- (14) Yuan, W.; Wan, L.; Peng, H.; Zhong, Y.; Cai, W.; Zhang, Y.; Ai, W.; Wu, J. The Influencing Factors and Functions of DNA G - quadruplexes. *Cell Biochem. Funct.* **2020**, *38* (5), 524–532. <https://doi.org/10.1002/cbf.3505>.
- (15) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. Prevalence of Quadruplexes in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908–2916. <https://doi.org/10.1093/nar/gki609>.
- (16) Bedrat, A.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L. Re-Evaluation of G-Quadruplex Propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (4), 1746–1759. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw006>.

- (17) Murat, P.; Balasubramanian, S. Existence and Consequences of G-Quadruplex Structures in DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *25*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.10.012>.
- (18) Spiegel, J.; Adhikari, S.; Balasubramanian, S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. *Trends Chem.* **2020**, *2* (2), 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.07.002>.
- (19) Savva, L.; Georgiades, S. N. Recent Developments in Small-Molecule Ligands of Medicinal Relevance for Harnessing the Anticancer Potential of G-Quadruplexes. *Molecules* **2021**, *26* (4), 841. <https://doi.org/10.3390/molecules26040841>.
- (20) Tosoni, B.; Nadai, M.; Caramiello, A. M.; Doria, F.; Freccero, M.; Richter, S. N. The Versatile NDI-Based Compounds: Emerging Anticancer and Antimicrobial Agents. *Med. Chem. Res.* **2024**, *33* (11), 2030–2049. <https://doi.org/10.1007/s00044-024-03329-6>.
- (21) Teng, F.-Y.; Jiang, Z.-Z.; Guo, M.; Tan, X.-Z.; Chen, F.; Xi, X.-G.; Xu, Y. G-Quadruplex DNA: A Novel Target for Drug Design. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78* (19–20), 6557–6583. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03921-8>.
- (22) Ou, T.; Lu, Y.; Tan, J.; Huang, Z.; Wong, K.; Gu, L. G - Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem* **2008**, *3* (5), 690–713. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700300>.
- (23) Cashman, D. J.; Buscaglia, R.; Freyer, M. W.; Dettler, J.; Hurley, L. H.; Lewis, E. A. Molecular Modeling and Biophysical Analysis of the C-MYC NHE-III1 Silencer Element. *J. Mol. Model.* **2008**, *14* (2), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0254-z>.
- (24) Dang, C. V. MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3* (8), a014217–a014217. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014217>.
- (25) Dang, C. V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* **2012**, *149* (1), 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>.
- (26) Carroll, P. A.; Freie, B. W.; Mathsyaraja, H.; Eisenman, R. N. The MYC Transcription Factor Network: Balancing Metabolism, Proliferation and Oncogenesis. *Front. Med.* **2018**, *12* (4), 412–425. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0650-z>.
- (27) Bahls, B.; Aljnadi, I. M.; Emídio, R.; Mendes, E.; Paulo, A. G-Quadruplexes in c-MYC Promoter as Targets for Cancer Therapy. *Biomedicines* **2023**, *11* (3), 969. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030969>.
- (28) Brooks, T. A.; Hurley, L. H. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* **2010**, *1* (6), 641–649. <https://doi.org/10.1177/1947601910377493>.
- (29) Maestroni, L.; Matmati, S.; Coulon, S. Solving the Telomere Replication Problem. *Genes* **2017**, *8* (2), 55. <https://doi.org/10.3390/genes8020055>.
- (30) Okazaki, T. Days Weaving the Lagging Strand Synthesis of DNA — A Personal Recollection of the Discovery of Okazaki Fragments and Studies on Discontinuous Replication Mechanism —. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2017**, *93* (5), 322–338. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.020>.
- (31) Nandakumar, J.; Cech, T. R. Finding the End: Recruitment of Telomerase to Telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14* (2), 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm3505>.
- (32) Shay, J. W.; Wright, W. E. Telomeres and Telomerase: Three Decades of Progress. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20* (5), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>.

- (33) Fundamentals of G-Quadruplex Biology. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Elsevier, 2020; Vol. 54, pp 3–44. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.06.004>.
- (34) Bryan, T. M. G-Quadruplexes at Telomeres: Friend or Foe? *Molecules* **2020**, 25 (16), 3686. <https://doi.org/10.3390/molecules25163686>.
- (35) Figueiredo, J.; Mergny, J.-L.; Cruz, C. G-Quadruplex Ligands in Cancer Therapy: Progress, Challenges, and Clinical Perspectives. *Life Sci.* **2024**, 340, 122481. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122481>.
- (36) Chaudhuri, R.; Bhattacharya, S.; Dash, J.; Bhattacharya, S. Recent Update on Targeting c-MYC G-Quadruplexes by Small Molecules for Anticancer Therapeutics. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (1), 42–70. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01145>.
- (37) Balasubramanian, S.; Hurley, L. H.; Neidle, S. Targeting G-Quadruplexes in Gene Promoters: A Novel Anticancer Strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10 (4), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrd3428>.
- (38) Awadasseid, A.; Ma, X.; Wu, Y.; Zhang, W. G-Quadruplex Stabilization via Small-Molecules as a Potential Anti-Cancer Strategy. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 139, 111550. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111550>.
- (39) Pirota, V.; Nadai, M.; Doria, F.; Richter, S. N. Naphthalene Diimides as Multimodal G-Quadruplex-Selective Ligands. *Molecules* **2019**, 24 (3), 426. <https://doi.org/10.3390/molecules24030426>.
- (40) Platella, C.; Napolitano, E.; Riccardi, C.; Musumeci, D.; Montesarchio, D. Disentangling the Structure–Activity Relationships of Naphthalene Diimides as Anticancer G-Quadruplex-Targeting Drugs. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (7), 3578–3603. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00125>.
- (41) Al Kobaisi, M.; Bhosale, S. V.; Latham, K.; Raynor, A. M.; Bhosale, S. V. Functional Naphthalene Diimides: Synthesis, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (19), 11685–11796. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00160>.
- (42) Doria, F.; Salvati, E.; Pompili, L.; Pirota, V.; D’Angelo, C.; Manoli, F.; Nadai, M.; Richter, S. N.; Biroccio, A.; Manet, I.; Freccero, M. Dyads of G - Quadruplex Ligands Triggering DNA Damage Response and Tumour Cell Growth Inhibition at Subnanomolar Concentration. *Chem. – Eur. J.* **2019**, 25 (47), 11085–11097. <https://doi.org/10.1002/chem.201900766>.
- (43) Thalacker, C.; Röger, C.; Würthner, F. Synthesis and Optical and Redox Properties of Core-Substituted Naphthalene Diimide Dyes. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (21), 8098–8105. <https://doi.org/10.1021/jo0612269>.
- (44) Paprocka, R.; Wiese-Szadkowska, M.; Janciauskiene, S.; Kosmalski, T.; Kulik, M.; Helmin-Basa, A. Latest Developments in Metal Complexes as Anticancer Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 452, 214307. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214307>.
- (45) Riccardi, C.; Musumeci, D.; Trifuoggi, M.; Irace, C.; Paduano, L.; Montesarchio, D. Anticancer Ruthenium(III) Complexes and Ru(III)-Containing Nanoformulations: An Update on the Mechanism of Action and Biological Activity. *Pharmaceuticals* **2019**, 12 (4), 146. <https://doi.org/10.3390/ph12040146>.
- (46) Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. Recent Developments in Ruthenium Anticancer Drugs. *Metallomics* **2009**, 1 (6), 458. <https://doi.org/10.1039/b904071d>.
- (47) Antonarakis, E. S.; Emadi, A. Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 66 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1293-1>.

- (48) D'Amato, A.; Mariconda, A.; Iacopetta, D.; Ceramella, J.; Catalano, A.; Sinicropi, M. S.; Longo, P. Complexes of Ruthenium(II) as Promising Dual-Active Agents against Cancer and Viral Infections. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (12), 1729. <https://doi.org/10.3390/ph16121729>.
- (49) Kapitza, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M. A.; Hefeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B. K.; Marian, B. Heterocyclic Complexes of Ruthenium(III) Induce Apoptosis in Colorectal Carcinoma Cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2005**, *131* (2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0617-0>.
- (50) Zegers, J.; Peters, M.; Albada, B. DNA G-Quadruplex-Stabilizing Metal Complexes as Anticancer Drugs. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2022**, *28* (2), 117–138. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01973-0>.
- (51) Pirola, V.; Lunghi, E.; Benassi, A.; Crespan, E.; Freccero, M.; Doria, F. Selective Binding and Redox-Activity on Parallel G-Quadruplexes by Pegylated Naphthalene Diimide-Copper Complexes. *Molecules* **2021**, *26* (16), 5025. <https://doi.org/10.3390/molecules26165025>.
- (52) Alessio, E.; Balducci, G.; Calligaris, M.; Costa, G.; Attia, W. M.; Mestroni, G. Synthesis, Molecular Structure, and Chemical Behavior of Hydrogen Trans-Bis(Dimethyl Sulfoxide)Tetrachlororuthenate(III) and Mer-Trichlorotris(Dimethyl Sulfoxide)Ruthenium(III): The First Fully Characterized Chloride-Dimethyl Sulfoxide-Ruthenium(III) Complexes. *Inorg. Chem.* **1991**, *30* (4), 609–618. <https://doi.org/10.1021/ic00004a005>.