



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900504002
Data Deposito	13/03/1996
Data Pubblicazione	13/06/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	H		

Titolo

CONIUGATI OLIGONUCLEOTIDE-ANTRACICLINA O OLIGONUCLEOTIDE- ANTRACICLINONE
--

Domanda di Brevetto per invenzione industriale dal
titolo:

Coniugati oligonucleotide-antraciclina o
oligonucleotide-antraciclinone

a nome: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

con sede-in: ROMA

a nome: A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE
Srl

con sede in: FIRENZE

a nome: BRISTOL-MYERS SQUIBB Spa

con sede in: ROMA

inventori designati: GARBESI Anna Maria, BONAZZI
Stefania, ZANELLA Stefania, CAPOBIANCO Massimo
Luigi, GIANNINI Giuseppe, ARCAMONE Federico

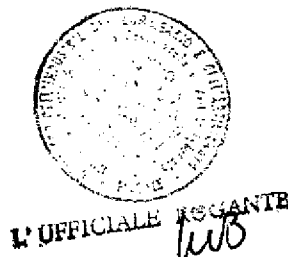
depositata il: con il N°.:

1. Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a coniugati in cui un oligonucleotide, naturale o modificato, capace di formare specificamente una tripla elica con una catena di DNA, è legato, per mezzo di un linker opportuno, all'aglicone di una antraciclina o ad un antraciclinone e al loro uso per il controllo specifico dell'espressione genica.

2. Stato dell'arte

E' noto [Claude Hélène et al. Biochimica et



Biophysica Acta 1049, 99 - 125 (1990); Uhlmann E. et al., Chemical Reviews, 90, 543-584 (1990)] che oligonucleotidi sintetici possono essere usati per inibire selettivamente l'espressione di un gene attraverso la loro associazione al mRNA (meccanismo antisenso) o DNA (meccanismo anti-gene). Nel primo caso l'oligonucleotide si lega, mediante legami a idrogeno, a una sequenza ad esso complementare secondo Watson-Crick presente nel mRNA bersaglio ed interferisce con la sintesi della proteina corrispondente. Nel secondo caso l'oligonucleotide può riconoscere e legarsi solo a una regione polipurinica:polipirimidinica della doppia elica del DNA, formando in detta regione una tripla elica grazie all'instaurarsi di legami a idrogeno Hoogsteen o anti-Hoogsteen tra il filamento purinico e l'oligomero sintetico, che si dispone nel solco maggiore dell'elica stessa. La presenza della struttura a tripla elica può influenzare la replicazione e la trascrizione del gene attraverso numerosi meccanismi. Per ottenere un effetto duraturo è necessario che esista una certa stabilità termodinamica della struttura a tripla elica. Detta stabilità può essere incrementata quando ad una od entrambe le estremità dell'oligonucleotide viene

attaccata una opportuna molecola intercalante [Nguyen T. Thuong et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 666-690 (1993)]. Fra le molecole intercalanti è stata ad esempio usata la daunorubicina [V. F. Zarytova et al. Nucleosides and Nucleotides, 10, 575-577 (1991); U. Asseline et al. Tetrahedron, 48, 1233 - 1254 (1992)]. I risultati ottenuti non sono stati tuttavia soddisfacenti, in quanto l'aumento di stabilizzazione del complesso a tripla elica così ottenuto non è superiore a quello di altri coniugati in precedenza studiati [T. Montaney-Garestier et al. in Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interaction, Kluwer Academic Publishers, p. 275 - 290, Netherlands (1990)]. E' evidente quindi l'importanza di preparare nuovi coniugati che consentano di ottenere una maggiore stabilità delle strutture a tripla elica che sono capaci di formare.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a nuovi coniugati nei quali un oligonucleotide, naturale o modificato, capace di formare triple eliche stabili con segmenti di DNA, viene legato in modo covalente per mezzo di un opportuno linker, all'aglicone di un'antraciclina o a un antraciclinone.

Questo particolare tipo di legame si è sorprendentemente rivelato particolarmente efficace per raggiungere lo scopo voluto, cioè una stabilizzazione significativamente superiore a quella ottenuta con i coniugati descritti nello stato dell'arte.

Oligonucleotidi capaci di formare una tripla elica con una catena di DNA sono noti e sono ad esempio descritti in : Nguyen T. Thuong et al. Angew, chem. Int. Ed. Engl., 32, 666-690 (1993).

Tra gli oligonucleotidi, secondo la presente invenzione, sono preferiti gli oligodesossinucleotidi (ODN).

In particolare secondo l'invenzione si possono usare: $5'd(T_3CT_2CT_2CT_2)$; $5'd(T_2GTG_2TG_2T_2GTG_2)$; $5'd(GAGA_6(GA)_3)$; $5'd(T_3C^{5Me}T_2C^{5Me}T_2C^{5Me}T_2)$; $5'd(TC^{5Me})_3T_6C^{5Me}TC^{5Me}$; $5'd(TGTGT_5GT_3GT_2T_4GT_3)$; $5'd(T_4C^{5Me}T_4G_6)$.

Anche i linker sono quelli comunemente usati nel campo [vedi, ad esempio: Nguyen T. Thuong et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 666-690 (1993); D. J. Kessler et al. Nucleic Acids Res., 21, 4810 - 4815 (1993)].

In particolare si sono usati linker del tipo:

$-(CH_2)_n-$, $-(CH_2-CH_2-O)_m-$, $-(CH_2-CH_2-CH_2-O)_p-$,

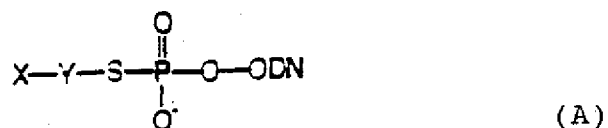
$[(CH_2)_2-5-NH]_q^-$, $[(CH_2)_2-5-S(O)_2]_q$ in cui n è un intero compreso fra 4 e 30, p è un intero compreso fra 1 e 6, m e q sono un intero compreso fra 2 e 9. Fra le antracicline utili secondo l'invenzione si possono ricordare quelle, sia di origine naturale che sintetica, aventi in posizione 4 e/o 6 un ossidrile libero. In particolare: daunorubicina, doxorubicina, carminomicina (o i rispettivi agliconi), i corrispondenti 5-immuno-derivati e i corrispondenti 3'(alfa-ciano)morfolinil derivati.

Secondo una particolare realizzazione dell'invenzione l'oligonucleotide è legato, per mezzo del linker, all'anello D dell'antraciclina o dell'aglicone, più in particolare in posizione 4.

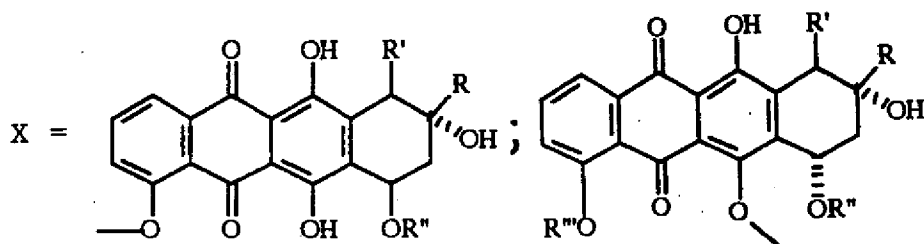
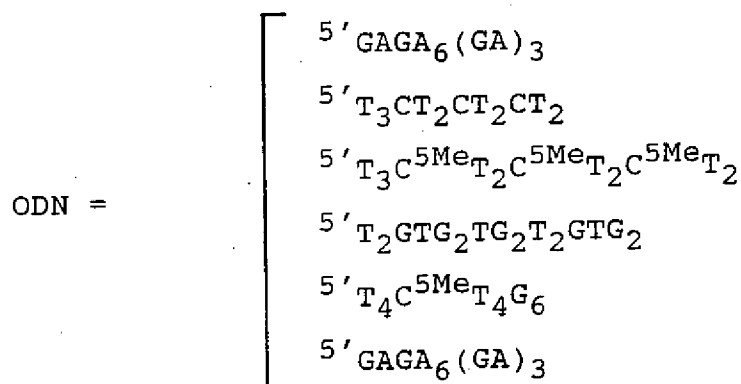
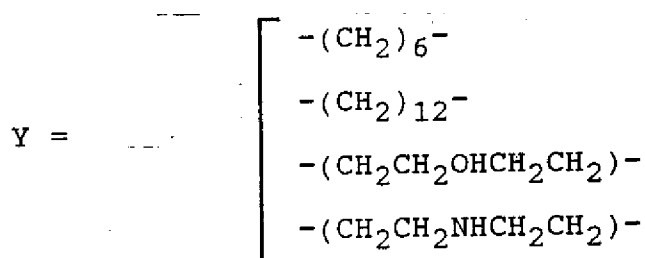
Secondo un'altra particolare realizzazione dell'invenzione l'oligonucleotide è legato all'anello B dell'aglicone, più in particolare in posizione 6.

L'invenzione si riferisce inoltre a coniugati in cui l'oligonucleotide capace di formare una tripla elica con una catena di DNA è legato, per mezzo di due linker, disposti ai suoi estremi opposti, a due antracicline (sui rispettivi agliconi) o antraciclinoni, dette antracicline o antraciclinoni essendo uguali o diversi tra loro.

Esempi particolari di coniugati secondo l'invenzione sono rappresentati schematicamente dalla formula A:



in cui



Ove:

$\text{R} = \text{COCH}_3, \text{COCH}_2\text{OH}, \text{COCH}_2\text{OAc}, \text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}' = \text{H}, \text{OH}, \text{COOCH}_3$; $\text{R}'' = \text{H}, \text{daunosamina}$; $\text{R}''' = \text{H}, \text{CH}_3$

I coniugati secondo l'invenzione sono stati preparati, ad esempio, secondo la procedura qui di seguito riportata.

Si sono dapprima preparati gli alogeno derivati dei rispettivi antraciclinoni o antracicline (vedi anche Schema 1).

L'aglicone 1, ottenuto in alte rese con tecniche note, è trattato con un eccesso di 1,6-diiodoesano in cloroformio a riflusso in presenza di ossido di argento. La cromatografia su colonna del grezzo così ottenuto permette di ottenere gli omega-iodoesametilen-derivati 2 e 3. Il composto 3 è facilmente glicosidato con lo zucchero protetto 4 in presenza di trimetilsililtriflato dando il composto 5.

Gli oligonucleotidi secondo l'invenzione sono stati preparati con una sintesi condotta in fase solida con sintetizzatore automatico Pharmacia utilizzando la chimica dei fosforamiditi, in modo da ottenere i corrispondenti 5'-tiofosfato derivati. Le sintesi sono eseguite sia su scala 1,3 micromoli che su scala 10 micromoli con una resa di accoppiamento di circa 96%. Dopo deprotezione gli oligonucleotidi sono purificati mediante cromatografia preparativa in scambio ionico. Le frazioni provenienti dalla

colonna preparativa sono analizzate mediante HPLC sempre in scambio ionico. Le frazioni con purezza superiore al 90% sono, scambiate a sale sodico e liofilizzate.

Gli alogeno derivati 2, 3, e 5 sopra descritti sono quindi fatti reagire con il sale sodico dell'oligonucleotide 5'-tiofosfato in presenza di 15-crown-5 in DMF/H₂O dando i coniugati finali voluti che sono stati purificati con HPLC (vedi Schema 2).

Esempio 1

O-alchilazione del carminomicinone

Ad una soluzione di carminomicinone [Composto di formula (1) in cui : $R = CO-CH_3$ e $R' = H$] (2,64 g; 6,9 mmol) in CHCl₃ anidro (400 ml) si aggiungono sotto agitazione 1,6-diiodoesano (16,88 g; 50 mmol) e Ag₂O (2,5 g; 11 mmol). Si lascia a riflusso per 4 giorni seguendo la scomparsa del prodotto di partenza per TLC (CH₂Cl₂/acetone 98:2) e aggiungendo Ag₂O (7 mmol) in terza e quarta giornata. Alla fine si filtra la miscela di reazione, a temperatura ambiente, su filtro di carta per rimuovere i sali d'argento e si allontana il solvente a pressione ridotta. Si tratta il residuo con pentano, per separare l'alogenuro non reagito, e il grezzo

ottenuto viene cromatografato su silice (CH_2Cl_2 /acetone 98:2). Si ottengono due prodotti solidi, uno rosso (620 mg) e uno giallo (579 mg), la cui struttura è stata determinata mediante spettrometria di massa e ^1H e ^{13}C -NMR.

Il prodotto rosso è 4-demetossi-4-O-(6-iodoesil)-carminomicinone, il prodotto giallo è 4-demetossi-6-O-(6-iodoesil)-carminocinone.

Esempio 2

Glicosidazione

A una miscela di 4-demetossi-4-O-(6-iodoesil)-carminomicinone (ottenuto secondo l'esempio 1) (270 mg; 0.454 mmol) e N-allilossi-1,4-bis-(4-nitrobenzoil)daunosammina (ottenuta in modo noto) (541 mg; 1,01 mmol) si aggiungono, in condizioni anidre, i setacci molecolari 4 A (2,8 gr) sfiammati sotto vuoto, quindi CH_2Cl_2 (90 ml) e Et_2O (23 ml) e, infine, a -5°C , trimetilsililtriflato (0,38 ml). Dopo 15' la reazione è terminata. A 0°C si aggiunge una soluzione di bicarbonato sodico all'1% (25 ml), si diluisce con CH_2Cl_2 e si estrae con lo stesso solvente. Gli estratti organici si lavano con bicarbonato 1% e quindi con acqua fino a pH neutro. Dalla fase organica anidrificata si ottiene, per evaporazione dei solventi, la 4-demetossi-4-O-(6-

iodoesil)daunomicina protetta, grezza (330 mg).

Esempio 3

Deprotezione

Il prodotto di cui all'esempio 2 (330 mg) viene sciolto in metanolo (144 ml) e cloruro di metilene (20 ml); la soluzione viene raffreddata a -5°C e addizionata di una soluzione 0,5 M di K_2CO_3 (1,8 ml). La reazione, seguita per TLC ($\text{CHCl}_3/\text{iPrOH}$ 95:5), termina in un'ora. La miscela di reazione viene addizionata di HCl 0,05 N fino al viraggio del colore da viola a arancio, quindi concentrata a pressione ridotta e bassa temperatura e addizionata di CH_2Cl_2 . La soluzione organica viene lavata con acqua e anidrificata, quindi i solventi organici allontanati a pressione ridotta. Il residuo viene sciolto in 50 ml di CH_2Cl_2 anidro e addizionato di Ph_3P (8,25 mg; 0,0315 mmol), $\text{Pd}(\text{O})$ -tetrakis (11 mg, 0,0095 mmol) e acido 2-metil-butirrico (80 mg; 0,78 mmol). La reazione viene effettuata al buio e seguita per TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:7,5:1,5:0,5). Alla fine la miscela di reazione viene diluita con CH_2Cl_2 , lavata con NaHCO_3 e H_2O , anidrificata e svaporata. Il prodotto grezzo, 4-demetossi-4-O-(6-iodoesil)-daunomicina viene purificato con HPCL preparativa. L'identità del

prodotto purificato è stata confermata per spettrometria di massa (FB^+ 724).

Esempio 4

Sintesi dell'oligodesossinucleotide 5'-fosforotioato

ps^{5'}TTT CTT CTT CTT

La sintesi è stata effettuata con sintetizzatore automatico applicando il metodo del "fosforoammidito". Al termine della fase di accrescimento dell'ODN, dopo lo stadio di detritilazione, una miscela di N,N-diisopropil-(bis)cianoetil fosfito 0,1 M in CH_3CN (100 microlitri) e tetrazolo 0,5 M in CH_3CN (150 microlitri) è stata riciclata nella colonna di reazione per 7 min. al flusso di 1 ml/min (tre volte). Successivamente, dopo lavaggio con CH_3CN , è stata condotta la reazione di ossidazione con zolfo, utilizzando una soluzione 0,1 M in CH_3CN di reattivo di Beaucage fatta passare attraverso la colonnina di reazione per 40 sec. al flusso di 1 ml/min. Al termine della sintesi, l'ODN legato al supporto solido è stato trattato con NH_3 al 28% a 50°C per 24 ore. Il grezzo così ottenuto è stato purificato mediante cromatografia preparativa a scambio ionico (colonna h = 12 cm; diam. = 2 cm) e le frazioni contenenti il prodotto sono state successivamente

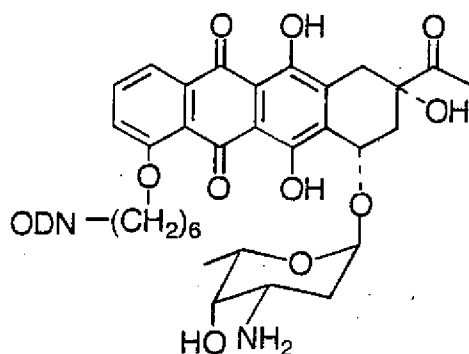
analizzate mediante HPLC in scambio ionico.

Le frazioni di purezza superiore al 90% sono riunite, convertite in sale sodico mediante una resina DOWEX 50 WX 8^R, trattate ripetutamente con resina CHELEX^R per eliminare eventuali tracce di metalli bivalenti e liofilizzate.

L'oligodesossinucleotide 5'-tiofosfato così ottenuto è stato caratterizzato, rispetto all'ODN non funzionalizzato per mezzo di TLC, ³¹P NMR, massa electrospray.

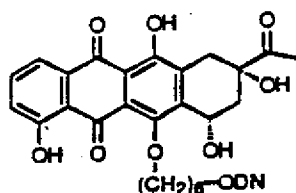
Esempio 5

Sintesi del coniugato (8)

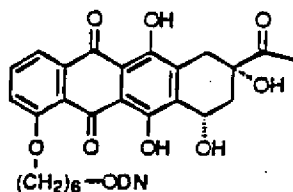


Al sale sodico dell'ODN (0,1 ~~mmol~~ mmol) disciolto in DMF (125 microlitri) e H₂O (50 microlitri) in presenza di 15-crown-5 (13 microlitri) è stato addizionato 1 mg di 4-demetossi-4-O-(6-iodoesil)daunomicina. La miscela di reazione è stata lasciata per 16 ore in termostato a 50°C, seguendo la formazione del coniugato mediante HPLC in fase inversa. Quando

l'ODN di partenza è scomparso si allontana l'antraciclina in eccesso mediante cromatografia su colonna, utilizzando come fase inversa silica gel RP 18. Il coniugato grezzo viene quindi purificato mediante HPCL in fase inversa e caratterizzato mediante: HPLC, UV e spettroscopia di fluorescenza. Procedendo come sopra descritto si sono ottenuti i seguenti prodotti:



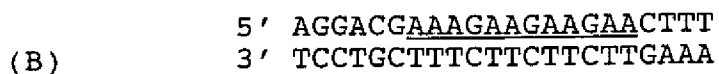
(6)



(7)

Tests di binding

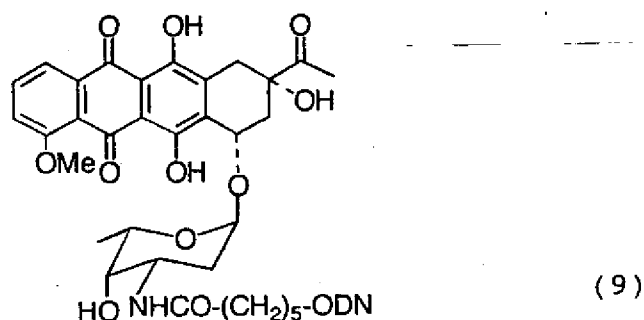
L'affinità dei coniugati per la sequenza bersaglio in doppio filamento (B):



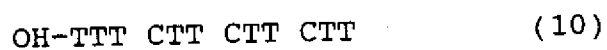
è stata valutata mediante spettroscopia UV e di fluorescenza. Poiché nell'ODN formante tripla elica

sono presenti delle citidine non metilate, la sua forza di legame dipende dal pH, quindi la stabilità dei complessi in tripla elica è stata misurata a pH 5,5; 6,5; 6,8.

Si è confrontata la dissociazione termica dei complessi a tripla elica formati dal bersaglio (B) rispettivamente: con i coniugati 6 - 8 sopra descritti, con il coniugato 9



[preparato secondo la procedura descritta da Asseline, U. et al. in Tetrahedron, 43, 1233-1254 (1992)], e con l'oligodesossinucleotide non derivatizzato



La dissociazione è stata seguita misurando il cambiamento di assorbanza a 260 nm all'aumentare della temperatura. Dalle curve di fusione, ottenute riportando in grafico i valori di assorbimento alle varie temperature, sono stati ricavati i valori di T_m (temperatura alla quale il 50% della tripla elica si è dissociata in doppia elica bersaglio e terzo

filamento) riportati in Tabella 1.

La formazione di triple eliche tra i leganti suddetti e il DNA bersaglio B è stata confermata mediante gel elettroforesi a pH 5,5 a 15°C.

L'analisi dei dati mostra che, a tutti i valori di pH, la presenza di un derivato della daunomicina legato covalentemente, attraverso il linker esametilenico, alla estremità 5' del dodecamero porta alla formazione di complessi più stabili di quello formato dall'ODN non derivatizzato 10. Il contributo dei cromofori antraciclinici alla stabilità termica della tripla elica è alto e paragonabile per i coniugati 6 - 8.

Al contrario, il coniugato 9 forma un complesso assai meno stabile.

Questa differenza è particolarmente evidente a pH 6,8, dove il contributo dell'ODN alla forza di legame è notevolmente ridotto: a 20°C, mentre le triple eliche formate da 6 - 8 sono largamente indissociate, quella formata da 9 è quasi completamente denaturata. Che la maggiore capacità legante dei coniugati sia dovuta all'intercalazione della parte agliconica nel DNA bersaglio è stato confermato spettrofluorometricamente. E' noto che la fluorescenza delle antracicline è diminuita dalla

loro intercalazione fra le coppie di basi del DNA. L'intensità del segnale di emissione fluorescente a 500 nm del complesso a tripla elica a pH 5,5 è stata misurata a 25°C e paragonata a quella ottenuta, alla stessa temperatura, dopo innalzamento del pH a 8,2, una condizione quest'ultima che non è compatibile con l'esistenza di triple eliche che coinvolgono citidine nel terzo filamento. Il segnale fluorescente a pH 8,2 era considerevolmente più intenso (circa tre volte) di quello ottenuto a pH acido ed era paragonabile a quello ottenuto allo stesso pH in assenza di DNA a doppia elica.

Questi risultati dimostrano che la forte affinità dei coniugati secondo l'invenzione per il DNA in doppia elica è conseguenza dell'intercalazione del cromoforo antraciclinico nel complesso in tripla elica. Il comportamento cooperativo di questi leganti bifunzionali del DNA è illustrato dall'impossibilità dei sistemi intercalanti a restare intercalati a valori di pH non compatibili con il modo di legame della catena oligopirimidinica.

E' evidente quindi che i coniugati secondo l'invenzione costituiscono prodotti che consentono di ottenere una maggiore stabilità dei complessi

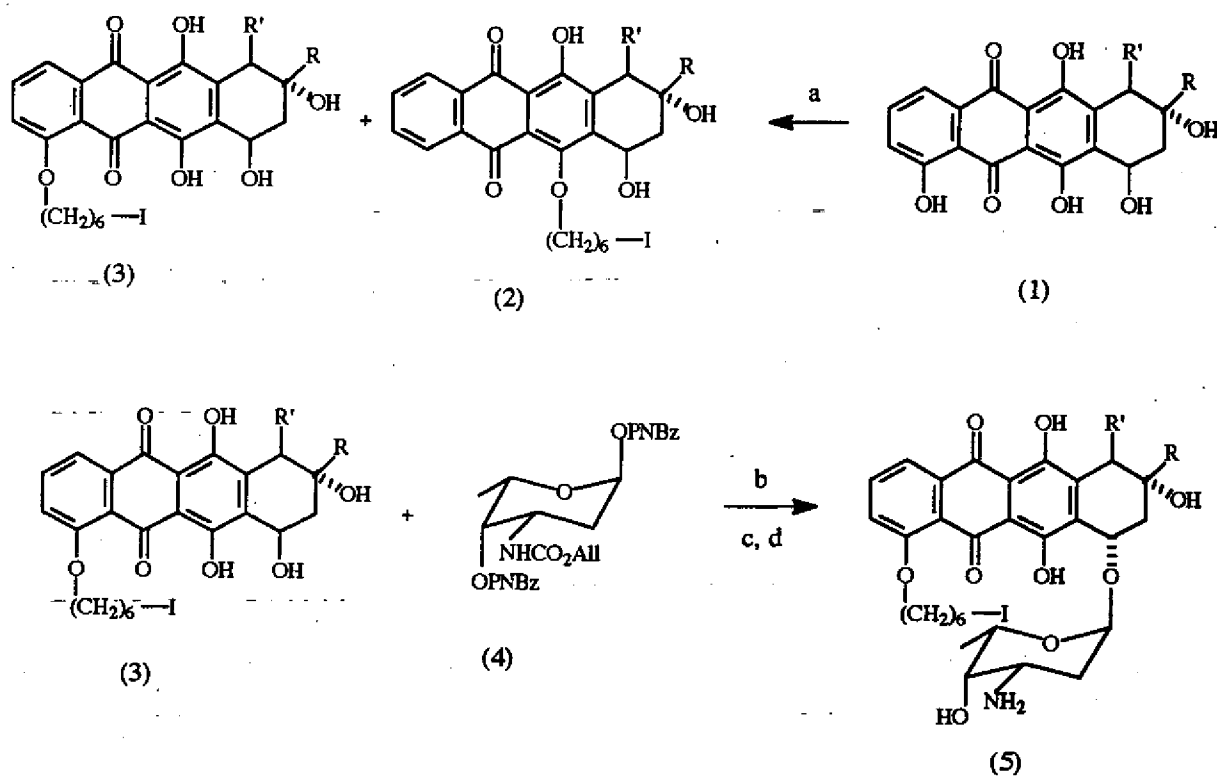
acido bersaglio/ oligonucleotide nella tecnologia antigene. Va inoltre considerato che unire con un legame covalente, del tipo presente nei coniugati qui descritti, un oligonucleotide a una molecola che, come molti agenti antitumorali antraciclinici, esercita la sua attività dopo intercalazione nella doppia elica di un DNA, permette di indirizzare questa stessa attività a siti specifici del genoma. Tale sistema di attacco selettivo permette di colpire solo i geni che sono coinvolti nella malattia e di farlo a livello del DNA, il principale bersaglio cellulare di questi agenti antitumorali. I coniugati secondo l'invenzione sono quindi adatti per essere usati per dirigere specificamente questi farmaci verso gli oncogeni attivati e verso i genomi provirali di un retro-virus, integrati nel DNA ospite, costituendo un valido strumento per indirizzare selettivamente farmaci citotossici sul bersaglio voluto e consentendo un loro stabile legame con il DNA nel punto voluto.

TABELLA 1

T_m (temperatura a cui si ha il 50% di dissociazione).

composti	pH 5,5	pH 6,5	pH 6,8
6	55°C	43°C	31°C
7	51°C	35°C	27°C
8	55°C	45°C	36°C
9	45°C	25°C	16°C
10	41°C	23°C	13°C

SCHEMA 1



in cui :

a = $I-(CH_2)_6-I/Ag_2O$

b = $TMSOTf/CH_2Cl_2/Et_2O$

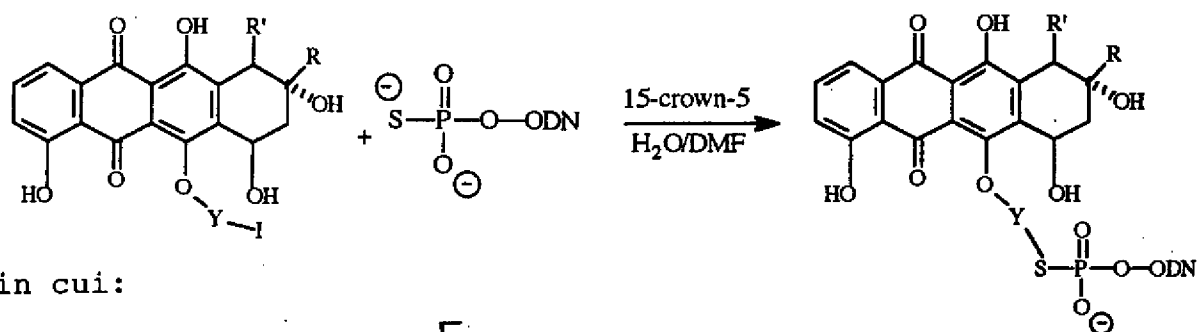
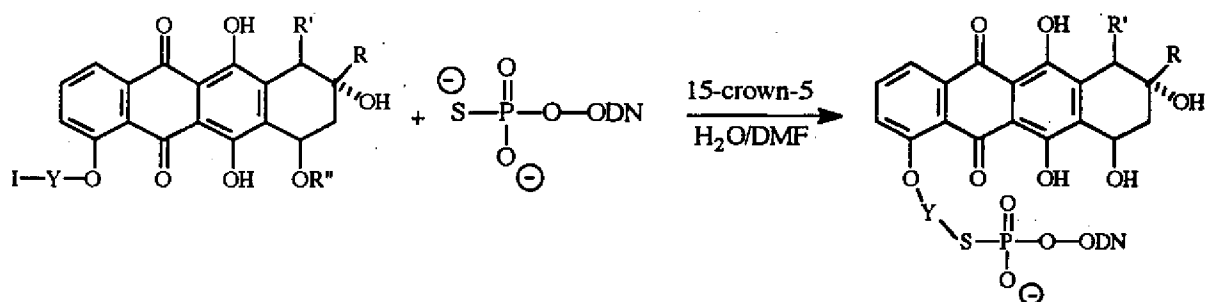
c = K_2CO_3 0,5 M/MeOH

d = $Pd(Ph_3P)_4$ /acido 2-metilbutirrico

R = $COCH_3$, $COCH_2OH$, $COCH_2OAc$, C_2H_5

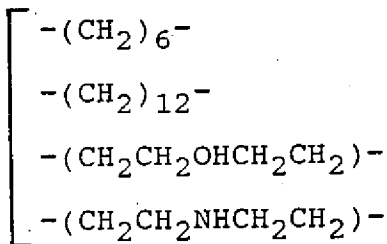
R' = H, OH, $COOCH_3$

SCHEMA 2

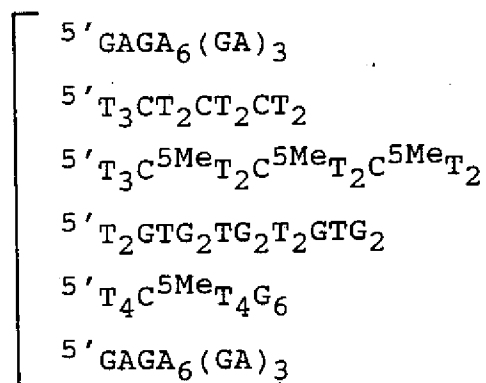


in cui:

Y =



ODN =



R ed R' sono come definiti nello SCHEMA 1 ed R'' = H,
daunosamina

RIVENDICAZIONI

1. Coniugati costituiti da un oligonucleotide, naturale o modificato, capace di formare una tripla elica con una catena di DNA, legato, attraverso un opportuno linker, all'aglicone di un'antraciclina o a un antraciclinone.
2. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui l'oligonucleotide è legato, per mezzo del linker, all'anello D dell'antraciclina o dell'aglicone.
3. Coniugati secondo la rivendicazione 2 in cui l'oligonucleotide è legato all'anello D in posizione 4.
4. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui l'oligonucleotide è legato all'anello B dell'antraciclina o dell'aglicone.
5. Coniugati secondo la rivendicazione 4 in cui l'oligonucleotide è legato all'anello B in posizione 6.
6. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui l'oligonucleotide è un oligodesossinucleotide.
7. Coniugati secondo la rivendicazione 6 in cui l'oligonucleotide capace di formare una tripla elica è scelto nel gruppo costituito da:

5'd(T ₃ CT ₂ CT ₂ CT ₂);	5'd(T ₂ GTG ₂ TG ₂ T ₂ GTG ₂);
5'd(GAGA ₆ (GA) ₃);	5'd(TGTGT ₅ GT ₃ GT ₂ T ₄ GT ₃);

5'd(TC^{5Me})₃T₆C^{5Me}TC^{5Me}); 5'd(T₃C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂C^{5Me}T₂);
5'd(T₄C^{5Me}T₄G₆).

8. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui il linker è rappresentato da: $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2-CH_2-O)_m-$, $-(CH_2-CH_2-CH_2-O)_p-$, $-[(CH_2)_2-5-NH]_q-$, $[(CH_2)_2-5-S(O)_2]_q$ in cui n è un intero compreso fra 4 e 30, p è un intero compreso fra 1 e 6, m e q sono un intero compreso fra 2 e 9.

9. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui l'antraciclina è un'antraciclina avente in posizione 4 e/o 6 un ossidrile libero.

10. Coniugati secondo la rivendicazione 9 in cui l'antraciclina è scelta nel gruppo costituito da: daunorubicina, doxorubicina, carminomicina (o i rispettivi agliconi), i corrispondenti 5-immino-derivati e i corrispondenti 3'(alfa-ciano)morfolinil derivati.

11. Coniugati secondo la rivendicazione 2 in cui l'aglicone è l'aglicone di una antraciclina secondo la rivendicazione 8.

12. Coniugati secondo la rivendicazione 2 in cui l'aglicone è l'aglicone di un'antraciclina secondo la rivendicazione 10.

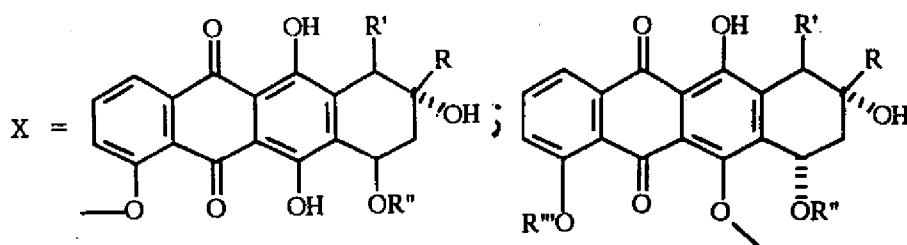
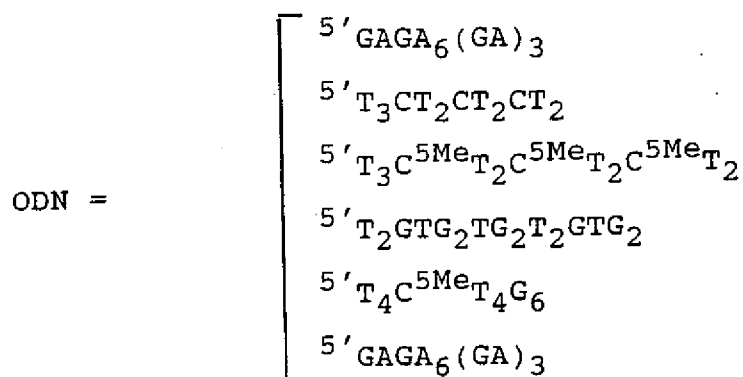
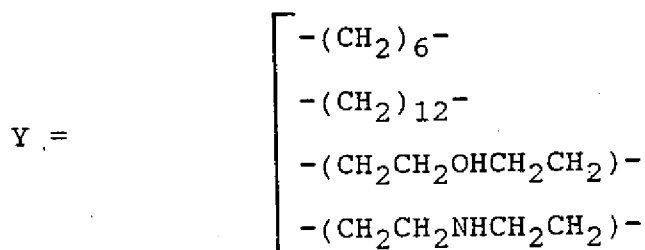
13. Coniugati secondo la rivendicazione 1 in cui l'oligonucleotide capace di formare una tripla elica

è legato, per mezzo di due linker, disposti ai suoi estremi opposti, a due antracicline (sui rispettivi agliconi) o antraciclinoni, dette antracicline o agliconi essendo uguali o diversi tra loro.

14. Coniugati secondo la rivendicazione 1, rappresentati schematicamente dalla formula A:



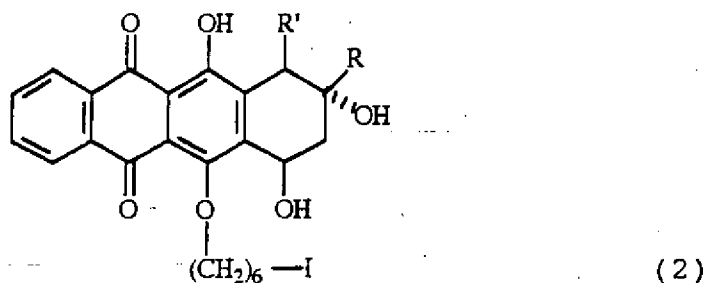
in cui



Ove:

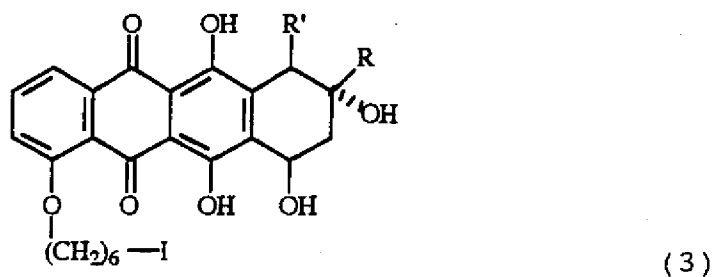
$R = \text{COCH}_3, \text{COCH}_2\text{OH}, \text{COCH}_2\text{OAc}, \text{C}_2\text{H}_5$; $R' = \text{H}, \text{OH}, \text{COOCH}_3$; $R'' = \text{H}, \text{daunosamina}$; $R''' = \text{H}, \text{CH}_3$.

15. Composto di formula generale (2):



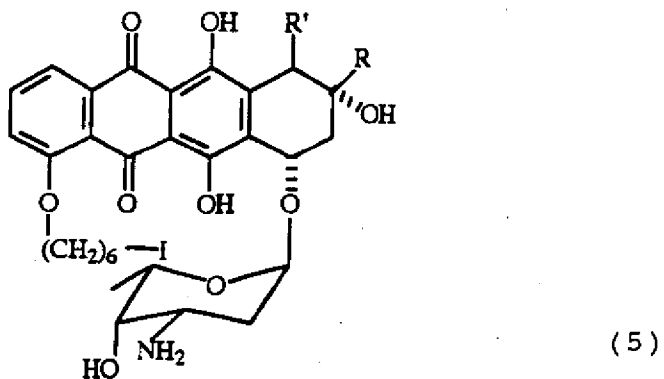
in cui R ed R' sono come sopra definiti.

16. Composto di formula generale (3):



in cui R ed R' sono come sopra definiti.

17. Composto di formula generale (5):



in cui R ed R' sono come sopra definiti.

18. Uso dei coniugati secondo la rivendicazione 1
per l'interazione con molecole di DNA.

Firenze, 13 Marzo 1996

p. CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

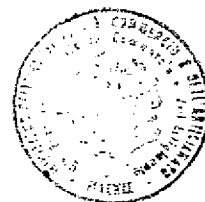
A. MENARINI INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE Srl

BRISTOL-MYERS SQUIBB Spa

Il Mandatario

Livio Brighenti
Dr. Livio Brighenti

della NOTARBARTOLO & GERVASI



L'UFFICIALE RGGANTE

lsg