

## Síntesis de Derivados Sustituídos de bis- $\alpha$ -naftilamina y de $\alpha$ -aminometil-naftaleno. Unión con ADN y Ensayos de su Actividad Antineoplásica

Ana M. BRUNO\*; Silvia E. ASIS y Carlos H. GAOZZA

*Centro de Síntesis y Estudio de Nuevos Compuestos Antineoplásicos  
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.,  
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina*

**RESUMEN.** Se han sintetizado dos compuestos bis-naftalénicos derivados de 1-naftilamina unidos por cadenas polimetilénicas y otros tres dotados estructuralmente con un sólo núcleo de naftaleno, evaluándose el grado de afinidad de éstos por el ADN en solución mediante espectroscopía UV y determinándose su actividad antineoplásica en líneas celulares humanas. Esto permitió dilucidar si la actividad biológica es propia de la molécula di-aromática simétrica o bien si se manifiesta aún en moléculas asimétricas dotadas de una cadena lateral aminoalquílica o similar. Las moléculas simétricas demostraron tener mayor actividad antineoplásica que las moléculas asimétricas, aunque la que posee cadena lateral de p-nitrofeniléter presentó baja acción citotóxica con respecto a su poder citostático, atribuyéndose su comportamiento a la presencia del grupo nitro como sustituyente.

**SUMMARY.** "Bis-Naphthylamine and Aminomethylamine and Aminomethyl-naphthalene Derivatives: Synthesis, DNA Affinity and Antineoplastic Activity Assays". Two bis-naphthalene compounds, having a polymethylene linking chain derived from 1-naphthylamine and three compounds with only a naphthalene nucleus have been synthesised. DNA binding of these compounds by UV spectroscopy and antineoplastic activity on human cellular lines were evaluated to determine if the biological activity is due to symmetrical or unsymmetrical structure. The symmetrical compounds were more active on certain cellular lines than the unsymmetrical ones. One of them, with a side chain of p-nitrophenylether, showed lower citotoxic than citostatic effect, which could be attributed to the presence of a nitro group as substituent.

### INTRODUCCION

En un trabajo anterior <sup>1</sup> se describió la síntesis y actividad antineoplásica de diversos bis-aminometilnaftalenos (I). Los compuestos en los que R corresponde a  $-(CH_2)_8-$ ,  $-(CH_2)_{12}$  y  $-(CH_2)_3-NC_4H_8N-(CH_2)_3-$  resultaron muy activos frente a diversas líneas celulares neoplásicas humanas hasta diluciones del orden de  $10^{-5}$  M en el medio de cultivo, pero en razón de que sus efectos citotóxicos ( $CL_{50}$ ) igualan o

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antineoplásica, Aminometilnaftaleno, Naftilamina, Unión al ADN.

**KEY WORDS:** Antineoplastic activity; Aminomethylnaphthalene; DNA Affinity; Naphthylamine.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia.

superan al efecto citostático ( $GI_{50}$ ), no resultaron adecuados para una experimentación terapéutica.

A fin de establecer parámetros estructurales que permitan lograr cómo disociar estos dos efectos, se consideró necesario obtener y ensayar compuestos similares, pero derivados de la sustitución de la 1-naftilamina (II). Asimismo, se evaluó la actividad de moléculas análogas a las anteriores y a estas nuevas pero dotadas de un solo núcleo de naftilo a efectos de dilucidar si la actividad es propia de la estructura "siamesa" o "bis-cromofórica" o bien si ya se manifiesta con un solo núcleo dotado de una cadena lateral aminoalquímica o similar.



## MÉTODOS Y MATERIALES

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares y están expresados sin corregir. Los espectros IR se efectuaron en un espectrofotómetro Jasco A-200 en pastillas de KBr. Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN se registraron en espectrómetros Perkin Elmer 137 y Bruker A80 (80 MHz). Los desplazamientos químicos están expresados en unidades de  $\delta$  (ppm) usando tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros UV se registraron en un espectrofotómetro UV-Vis Jasco 7850.

La estructura de los productos intermedios fue confirmada por análisis de sus elementos y espectroscopía IR.

Los compuestos finales pudieron ser purificados por cristalización y las respectivas estructuras confirmadas mediante análisis elemental, espectroscopía IR y de  $^1\text{H}$ -RMN.

### **Procedimiento general para $N,N'$ -bis-1-naftil- $N,N'$ -bis-*p*-toluen-sulfonil- $\alpha,\omega$ -diaminoalcanos. (compuestos IIIa y IVa)**

Se suspendieron 26,0 g (0,088 mol) de *N*-1-naftil-*p*-toluen-sulfonamida en 50 ml de etanol y se le agregó una disolución de 3,9 g de NaOH en 26 ml de agua, se filtró y evaporó al vacío, obteniéndose 25 g de la sal sódica correspondiente.

A una disolución de 2,0 g (6,27 mmol) de sal sódica obtenida según el paso anterior, en 20 ml de DMF, se le agregó 0,765 g (3,14 mmol) de 1,6-dibromohexano u 1,8-dibromooctano según corresponda y la mezcla se calentó a reflujo (12 h) en un baño de glicerina (100-110 °C). El NaBr producto de la reacción se separó por filtración y la disolución se evaporó al vacío. El residuo sólido se lavó con agua y se cristalizó de una mezcla de DMF-agua.

Compuesto IIIa: Rendimiento: 50%; p.f.: 199-201°C; Análisis calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ : C, 71,00; H, 5,92; N, 4,14; S, 9,47. Encontrado: C, 70,91; H, 6,01; N, 4,19; S, 9,49. IR, 2900 ( $\text{CH}_2$ ); 1600 (C-N); 1320 y 1140 (sulfonamida) y 740 y 800  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromáticos).

Compuesto IVa: Rendimiento: 42%; p.f.: 139-142 °C; Análisis calculado para  $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ : C, 71,59; H, 6,25; N, 3,98; S, 9,09. Encontrado: C, 71,64; H, 6,31; N, 4,03; S, 9,11. IR, 2920 ( $\text{CH}_2$ ); 1600 (C-N); 1360 y 1160 (sulfonamida); y 780 y 810  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromáticos).

***N,N'-bis-1-naftil- $\alpha$ , $\omega$ -diaminoalcanos, dibromhidratos (compuestos III y IV)***

Una mezcla de 3,20 mmol de la correspondiente ditosilamina (IIIa o IVa), 0,03 mol de fenol y 200 ml de una disolución al 33% de HBr en ácido acético glacial, se calentó con agitación a 90° durante 2,5 horas. Por enfriamiento cristalizó el producto crudo, que se lavó con benceno.

Compuesto III: Rendimiento: 92%; p.f.: 219-220 °C (d); Análisis calculado para  $C_{26}H_{30}Br_2N_2$ : C, 58,87; H, 5,66; Br, 30,19; N, 5,28. Encontrado: C, 58,83; H, 5,71; Br, 30,09; N, 5,24. IR, 2920 ( $CH_2$ ); 2700 y 1580 ( $^+NH_2-C$ ); 760 y 810  $cm^{-1}$  (CH aromático).  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ); 1,4 (s, 4H; C- $CH_2-CH_2-C$ ); 1,75 (s, 4H; C- $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C$ ); 3,4 (t, 4H; N- $CH_2-(CH_2)_4-CH_2-N$ ); 6 (s, 4H;  $+NH_2$ ); 7,2-8,3 (m, 14H; aromáticos).

Compuesto IV: Rendimiento: 94%; p.f.: 156-159 °C; Análisis calculado para  $C_{28}H_{34}Br_2N_2$ : C, 60,22; H, 6,09; Br, 28,67; N, 5,02. Encontrado: C, 60,27; H, 6,14; Br, 28,61; N, 4,98. IR, 2910 ( $CH_2$ ); 2690 y 1580 ( $^+NH_2-C$ ); 770 y 800  $cm^{-1}$  (CH aromático).  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ); 1,7 (m, 8H;  $-(CH_2)_4-$ ); 2,1 (m, 4H; N- $CH_2-CH_2$ ); 3,6 (t, 4H;  $-H_2N^+-CH_2$ ); 6,9 (m, 4H;  $-H_2N^+-C$ ); 7,1-8,8 (m, 14H; aromáticos).

***N-4-nitrofenoxietil-N-1-naftil-p-toluenosulfonamida (Va)***

A una disolución de 1,0 g (3,14 mmol) de la sal sódica de N-1-naftil-p-toluenosulfonamida en 20 ml de DMF se agregó 0,63 g (3,14 mmol) de 2-bromo-(4-nitrofenil)etiléter y la mezcla se calentó a reflujo durante 20 h en un baño de glicerina a 110 °C. Luego el disolvente se evaporó a vacío y el residuo sólido se lavó con agua y cristalizó de una mezcla de DMF-agua rindiendo 1,23 g (42%) de Va, p.f.: 185-186 °C. Análisis calculado para  $C_{25}H_{22}N_2O_5S$ : C, 64,93; H, 4,76; N, 6,06; S, 6,93. Encontrado: C, 64,88; H, 4,80; N, 6,02; S, 6,90. IR, 2910 ( $CH_2$ ); 1300 y 1170 (sulfonamida); 1340 y 1520 ( $-NO_2$ ); 1260 (éter aromático); 810 y 780  $cm^{-1}$  (CH aromáticos).

***N-4-nitrofenoxietil-1-naftilamina (V)***

Una mezcla de 0,8 g (0,0017 mol) del compuesto Va, 1,73 g (0,018 mol) de fenol y 60 ml de una solución al 33% de HBr en ácido acético glacial se calentó a 90°C durante 2,5 h. Por enfriamiento cristalizó el producto crudo, que se lavó con benceno, rindiendo 0,70 g (96%) de V, p.f.: 208-209 °C (d). Análisis calculado para  $C_{18}H_{17}BrN_2O_3$ : C, 55,53; H, 4,37; Br, 20,56; N, 7,20. Encontrado: C, 55,49; H, 4,42; Br, 20,52; N, 7,23. IR, 2900 ( $CH_2$ ); 2720 y 1600 ( $-NH_2-C$ ); 1520 y 1350 ( $-NO_2$ ); 1260 (alquilariléter); 810 (CH aromático); 750 y 780  $cm^{-1}$  (CH aromático).  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ ); 4 (t, 2H; N- $CH_2-C$ ); 4,8 (t, 2H; C- $CH_2-O$ ); 7,0 (m, 2H;  $+NH_2$ ); 7,4-8,6 (m, 11H; aromáticos).

***N-1-naftilmetil-N'-dimetil-1,3-diaminopropano, diclorhidrato (VI)***

A una disolución de 1,73 g (0,011 mol) de 1-naftaldehído, 1,23 g (0,012 mol) de 3-dimetilamino-1-propilamina y 0,3 ml de ácido metanosulfónico en 30 ml de metanol se le agregó 0,5 g de catalizador Pd/C (10%) y la mezcla se sometió a hidrogenación a 35 p.s.i. hasta presión constante. La suspensión se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en benceno y se le agregó cantidad suficiente de éter saturado de cloruro de hidrógeno obteniéndose 2,13 g (64%) de diclorhidrato VI, p.f.: 114-116 °C. Análisis calculado para  $C_{16}H_{24}Cl_2N_2$ : C,

60,95; H, 7,62; Cl, 22,54; N, 8,89. Encontrado: C, 60,91; H, 7,66; Cl, 22,50; N, 8,91. IR, 2950 ( $\text{CH}_2$ ); 2810 y 2770 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2600 ( $+\text{NH}_2$ ); 2470 ( $+\text{NH}$ ); 810 y 780  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromático).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ); 2,4 (m, 2H;  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 3,2 (s, 6H;  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 3,7 (m, 6H;  $\text{naftil-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ); 7,8 (m, 3H;  $+\text{NH}_2$  y  $+\text{NH}$ ); 8,0-8,2 (m, 7H; aromáticos).

### ***N-1-(3-dimetilamino)propil-1-naftilcarboxamida (VII)***

A una mezcla de 1,85 g (0,018 mol) de 3-dimetilamino-1-propilamina y 12 ml de una disolución al 10% de NaOH a 5 °C se le adicionó lentamente y con agitación, una disolución de 3 g (0,016 mol) de cloruro de naftoilo en 21 ml de cloroformo. La fase orgánica se decantó, secó y evaporó a vacío, cristalizando el producto deseado, que se lavó con ciclohexano, obteniéndose 3,09 g (76,4%) de VII, p.f.: 50-51 °C. Análisis calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ : C, 75,0; H, 7,81; N, 10,94. Encontrado: C, 75,08; H, 7,89; N, 10,91. IR, 3290 y 3275 (NH); 2950 ( $\text{CH}_2$ ); 2825 y 2780 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 1650 y 1540 (amida I y II); 800 y 740  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromático).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ); 1,8 (m, 2H;  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ ); 2,1 (s, 6H;  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,4 (t, 2H;  $-\text{CH}_2\text{-N}$ ); 3,5 (c, 2H;  $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ); 7,2-7,9 (m, 7H, aromáticos); 8,3 (m, 1H;  $\text{CO-NH-}$ ).

### ***Ensayos de unión al ADN***

Disolución de ADN: se disolvieron 60 mg de ADN de timo bovino (Sigma) en 100 ml de buffer tris-HCl de pH 7,4 en concentración 10 mM, mediante lenta agitación durante 24 horas a 4 °C.

Disolución de los compuestos a ensayar: se prepararon disoluciones  $10^{-4}$  M utilizando etanol y agua; estas disoluciones se diluyeron luego a  $2 \times 10^{-5}$  M con el mismo regulador.

Se mezclaron 3,0 ml de esta última disolución de ADN y se registró el espectro UV a 20 °C en el intervalo de máxima absorbancia utilizando una cubeta de 1 cm.

El grado de afinidad por el ADN de estos compuestos se estimó espectroscópicamente <sup>7</sup> mediante una adaptación del procedimiento de Seshadri <sup>8</sup>, por la modificación que produce en sus respectivos espectros UV la adición de ADN nativo de timo bovino en una banda de 40 nm centrada en el valor máximo de absorbancia de cada compuesto hasta 24 horas después de efectuada la mezcla, utilizando una relación droga-ADN (en pares de bases) de 1:5. El grado de unión se expresa por la relación del área de absorbancia final ( $a_{24}$ ) y del compuesto puro en igual concentración ( $a_0$ ). Las áreas fueron calculadas automáticamente por el mismo instrumento; valores inferiores a 1 expresan, progresivamente, mayor afinidad por el ADN. En nuestras condiciones experimentales, para el bromuro de etidio <sup>9</sup>, se encontró un valor de 0,20; para la amsacrina 0,30 y 0,0 para la mitoxantrona.

### ***Actividad antineoplásica***

Este ensayo fue efectuado por el National Cancer Institute (NCI, USA) según el procedimiento de selección <sup>10</sup> utilizado a partir del año 1990. Este consiste en aplicar concentraciones del orden entre  $10^{-4}$  y  $10^{-8}$  M de los compuestos sobre una variedad de 60 líneas celulares derivadas de siete tipos de carcinomas humanos de

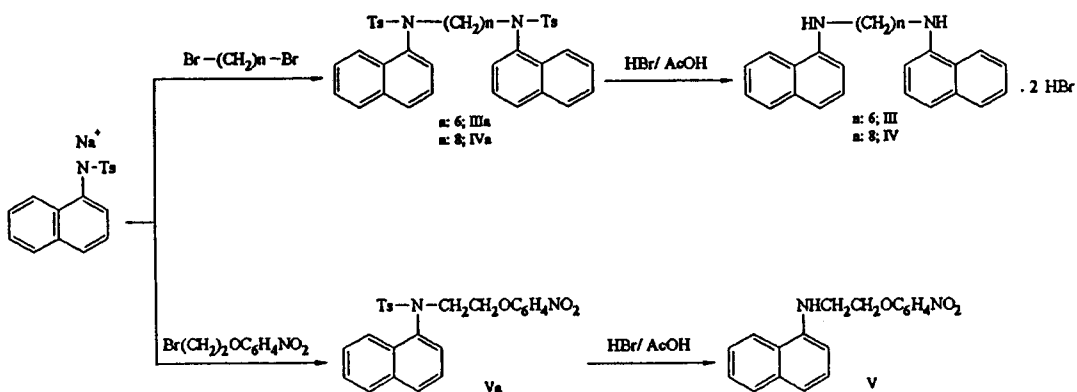
pulmón, colon, melanoma, ovario, cerebro, leucemia y riñón. Los resultados se evaluaron espectrofotométricamente en forma automática con sulforrodamina B (SRB). Este colorante, en solución de ácido acético diluido, constituye una molécula aniónica que se une electrostáticamente a los aminoácidos básicos de las proteínas (indicando proteínas totales), controlándose además el número de células viables. Los datos obtenidos se analizaron trazando las curvas de la relación dosis-respuesta. Para obtener una medida relativa de la sensibilidad de cada línea celular para una droga dada, se compara la concentración requerida de ésta para producir el mismo efecto citostático ( $GI_{50}$ ) en cada línea celular. Con estos valores se construyen por computación, barras proyectadas hacia la izquierda o la derecha de la media general (*mean graphs*), que son proporcionales a la diferencia entre el logaritmo de la  $GI_{50}$  de cada línea celular.

## RESULTADOS Y DISCUSION

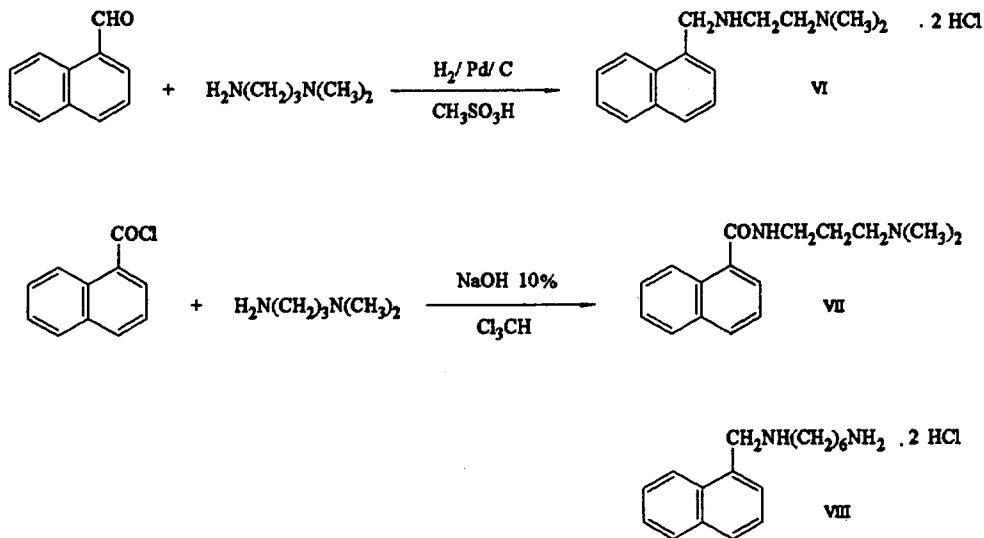
### Síntesis

Obviamente, el procedimiento más sencillo para la obtención de compuestos del tipo II sería mediante la reacción de derivados  $\alpha,\omega$ -dihalogenados con la 1-naftilamina; sin embargo, la alquilación directa de esta amina con derivados monohalogenados <sup>2</sup> no ha sido realizada. Esta característica de la naftilamina fue confirmada por cuanto su calentamiento a reflujo con 1,6-dibromohexano en presencia de carbonato de potasio anhidro en diferentes disolventes no produjo reacción alguna, recuperándose el material de partida. Por lo tanto se ensayó luego el procedimiento de Birkofer <sup>3</sup>, que consiste en la activación del grupo amino por silanización. La N-trimetilsilil-1-naftilamina se obtuvo fácilmente mediante calentamiento de la naftilamina con un exceso de hexametildisilazano, pero este compuesto por calentamiento con derivados halogenados sólo experimenta desilanzación con descomposición del derivado halogenado, recuperándose la naftilamina como bromhidrato. En consecuencia se intentó el procedimiento clásico y específico para la obtención de aminas secundarias que parte de la p-toluensulfonamida de la amina primaria elegida, la que transformada en sal sódica se hace reaccionar con un derivado halogenado y, por fin, se procede a remover el resto toluensulfonilo por una posterior hidrólisis. La N-1-naftil-p-toluensulfonamida por tratamiento con hidróxido de sodio en etanol formó la sal cuantitativamente, y ésta, perfectamente seca, reaccionó sin inconvenientes con 1,6-dibromohexano o 1,8-dibromooctano en DMF a 120 °C, obteniéndose los productos deseados (Figura 1). El calentamiento a 90 °C de una disolución de estos compuestos en ácido acético glacial saturado de bromuro de hidrógeno <sup>4</sup> produjo la remoción de los restos toluensulfonilo, obteniéndose las bis-naftilaminas deseadas (III) y (IV) con rendimientos satisfactorios. Este mismo procedimiento pudo también ser aplicado con éxito también para la obtención de una mononaftilamina N-sustituída por un resto de alquil-p-nitrofeniléter (V).

Otro compuesto mononaftalénico, el N-(3-dimetilaminopropil)-1-aminometilnaftaleno (VI), se obtuvo mediante el procedimiento de aminación reductiva, sometiendo a hidrogenación una mezcla de 1-naftaldehído, N-dimetilamino-1,3-diaminopropano, y Pd sobre carbón con catálisis ácida. La N-(3-dimetilaminopropil)-1-naftilamida (VII), ha sido sintetizada por reacción del cloruro de 1-naftoilo con la correspondiente diamina <sup>5</sup> (Figura 2).



**Figura 1.** Esquema de obtención de las bis-naftilaminas (III) y (IV) y de la mononaftilamina N-sustituida (V).



**Figura 2.** Esquema de obtención del N-(3-dimetilaminopropil)-1-aminometilnaftaleno (VI) y de la N-(3-dimetilaminopropil)-1-naftilamida (VII). La síntesis del N-(6-aminohexil)-1-aminometilnaftaleno (VIII) se ha descrito en una publicación anterior <sup>6</sup>.

Un compuesto similar, el N-(6-aminohexil)-1-aminometilnaftaleno (VIII), cuya síntesis se ha descrito en una publicación anterior <sup>6</sup>, fue también ensayado en cuanto su afinidad por el ADN y su actividad antineoplásica.

### Unión al ADN

El grado de afinidad por el ADN de los derivados de bis-naftilamina (III) y (IV) y el de mononaftilamina (V) no pudo determinarse, debido a que la zona donde se observan sus máximos de absorbancia (entre 200-230 nm) no se presta a una cuantificación fidedigna de las posibles modificaciones. Los compuestos asimétricos (VI) y (VIII), produjeron valores de  $a_{24}/a_0$  de 0,47 y 0,60 respectivamente, que corresponden a un grado medio de afinidad por el ADN, sin desplazamiento

batocrómico. La naftilamida (VII) evidenció carecer de afinidad por el ADN, obteniéndose un valor de  $a_{24}/a_0$  de 0,95.

### **Actividad antineoplásica**

Los compuestos simétricos (III) y (IV) resultaron activos contra todas las líneas celulares sólo a concentración  $10^{-4}$  M y con un efecto citostático ( $GI_{50}$ ) prácticamente igual al citotóxico ( $LC_{50}$ ). El compuesto (III) fue más específico contra algunos tipos de leucemias y una línea de cerebro mientras que el (IV) no posee ninguna especificidad en particular.

Los compuestos asimétricos (VI), (VII) y (VIII) resultaron muy poco activos a una concentración de  $10^{-4}$  M. En cuanto al compuesto asimétrico (V), que posee una cadena lateral con p-nitrofeniléter, resultó ser activo a concentración  $10^{-4}$  M en algunas leucemias, cáncer de pulmón y de colon; en este último caso la actividad se mantiene aun a una dilución  $10^{-5}$  M. Una propiedad notable e inesperada de este compuesto es su baja actividad citotóxica con respecto al poder citostático. Estas características diferenciales al resto de la serie podrían atribuirse a la presencia del grupo nitro, que actuaría como catalizador generador de oxi-radicales a través de un proceso redox reversible. El grupo nitro, en general, suele incrementar la citotoxicidad de los compuestos. Recientemente, Denny *et al.*<sup>11</sup> han descrito nitroquinolinas similares a (V), que actuarían según este mecanismo.

Comparando los resultados observados con la actividad que presentan los bis-aminonaftalenos del trabajo anterior<sup>1</sup>, se concluye que las estructuras moleculares mínimas netamente activas (que según el criterio adoptado por el NCI son aquellas que manifiestan actividad citotóxica-citostática a concentraciones  $10^{-4}$  M o menor) son las de estructura siamesa. La actividad es mayor cuando el grupo amino secundario se encuentra separado del núcleo de naftaleno por un metileno y desaparece al ser reemplazado por amido<sup>5</sup>, por lo que el grado de actividad aparentemente guardaría relación con la basicidad del compuesto. En consecuencia, el mecanismo de acción podría consistir en una captación primaria de la molécula por los restos fosfatos del ADN como proceso primario de interacción con el ADN, a lo que sucedería un proceso más complejo de estabilización (intercalación e introducción en el surco menor, etc.).

Dado que el grado de afinidad por el ADN de todos estos compuestos no ha sido determinado, no puede concluirse si la actividad biológica observada es resultado directo de la unión con el ADN o bien ésta es sólo una condición necesaria pero no suficiente.

**Agradecimientos.** Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la financiación de este trabajo y al National Cancer Institute (U.S.A.) por los ensayos de actividad antineoplásica.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Bruno, A.M., J. Gaeta & C.H. Gaozza (1992) *An. Quím.* **88**: 267-9
2. Werbel, L.H., D.B. Capps, E.F. Elslager, W. Pearlman, F.W. Short, E.A. Weinstein & D.F. Worth (1963) *J. Med. Chem.* **6**: 637-46

3. Birkofer, L., H.P. Kuhlthaan & A. Ritter (1960) *Chem. Ber.* **93**: 2810-6
4. Dietrich, B., M.W. Hosseini, J.M. Lehn & R.B. Sessions (1983) *Helvética Chim. Acta* **66**, Fasc. 4: 1262-78
5. Bruno, A.M., S.E. Piatti, J. Gaeta, M. Carpy & C.H. Gaozza (1993) *An. Quím.* **89**: 275-8
6. Bruno, A.M., S. Ivanovic & C.H. Gaozza (1994) *An. Quím.* **90**: 135-8
7. Porumb, H. (1978) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **34**: 175-95
8. Seshadri, R., M. Israel & W.J. Pegg (1983) *J. Med. Chem.* **26**: 11-5
9. Waring, M.J. (1970) *J. Mol. Biol.* **54**: 247-79
10. Boyd, M.R. (1989) *Principles and Practice of Oncology* **3**: 1-12
11. Denny, W.A., G.J. Atwell & W.R. Wilson (1992) *J. Med. Chem.* **35**: 4832-41