

1. INTRODUZIONE

La ricerca di nuovi approcci terapeutici delle cardiovasculopatie si è rivolta, nell'ultimo decennio, allo studio dei *recettori attivati da proteasi* (PARs).

Dati riportati in letteratura hanno, infatti, messo in evidenza che determinate proteasi, tradizionalmente considerate come enzimi capaci di degradare proteine extracellulari, svolgono un'azione anche come molecole segnale che regolano una molteplicità di funzioni cellulari attivando una particolare categoria di recettori presenti sulla membrana plasmatica [1-3].

Gli enzimi in oggetto fanno parte della numerosa famiglia delle proteasi seriniche, così denominate perché l'azione catalitica è dovuta all'-OH in catena laterale della serina, reso reattivo dall'instaurarsi di interazioni tra i residui istidina- serina- aspartato, che sono vicini nella struttura terziaria dell'enzima. Le proteasi seriniche sono enzimi ubiquitari nei procarioti e negli eucarioti ed hanno una notevole importanza in diverse funzioni biologiche tra cui l'emostasi, la fibrinolisi, la formazione del complemento e la digestione di proteine alimentari. La capacità di queste proteasi di metabolizzare determinate sequenze aminoacidiche si manifesta anche quando queste sequenze sono incluse in recettori che, subito l'intervento dell'enzima proteolitico, vengono attivati. Per queste proprietà, questa classe di recettori è stata definita come recettori attivati da proteasi (PARs).

1.1 RECETTORI ATTIVATI DA PROTEASI (PARs)

Sono noti vari tipi di recettori per le proteasi tra i quali i recettori per il fattore Xa della coagulazione, dotato di un singolo dominio transmembrana, e il recettore per l'urochinasi legato al fosfatidilinositolo.

Entrambi hanno però la caratteristica di non richiedere un'azione proteolitica per la loro attivazione.

I recettori attivati da proteasi (PARs, Protease Activated Receptors) sono membri di una superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) che presentano 7 domini transmembranari con una regione NH₂-terminale extracellulare ed una regione COOH-terminale intracellulare [4] (Figura 1).

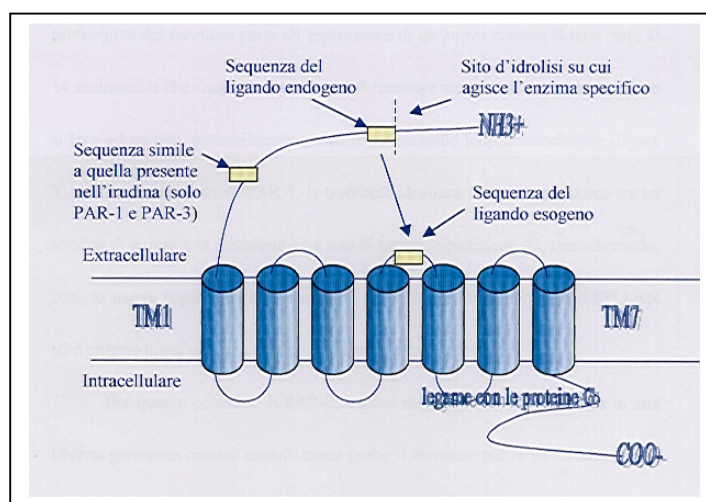


Figura 1 – Struttura dei recettori PARs

Secondo quanto riportato in letteratura, i PARs possono essere ulteriormente suddivisi in 4 gruppi recettoriali: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Tale suddivisione deriva dall'ordine temporale in cui sono stati scoperti e clonati e dalla diversità dei loro agonisti endogeni preferenziali. Infatti i recettori di tipo 1 e 3 sono attivati preferenzialmente dalla trombina, il tipo 2 dalla tripsina pancreatica e da enzimi con attività tripsinica simile [5,6], il tipo 4 è attivato da trombina e tripsina.

Il progetto di ricerca, oggetto della mia tesi di dottorato, ha riguardato la progettazione e la sintesi di derivati pseudopeptidici ligandi

del recettore PAR-1, coinvolto nei meccanismi molecolari responsabili delle manifestazioni patologiche a livello cardiovascolare.

Proprietà	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Attivatore enzimatico selettivo	Trombina	Tripsina	Trombina	Trombina
Cromosoma (umano)	5q13	5q13	5q13	19p12
Altri attivatori enzimatici	Tripsina, triptasi mastocitaria	Triptasi mastocitaria	---	---
Sito d'idrolisi (umano)	Arg ⁴¹ -Ser ⁴²	Arg ³⁴ -Ser ³⁵	Lys ³⁸ -Thr ³⁹	Arg ⁴⁷ -Gly ⁴⁸
Nuova sequenza N-terminale	SFLLRN (u) TFRIID (x) SFLLRN (t,r)	SLIGRL (t,r) SLIGKV	TFRGAP (u) SFNGCP (t)	GYPGKF (t) GYPGQV (u)

Abbreviazioni: u, umano; t, topo; r, ratto; x, Xenopus

Tabella 1 - Classificazione dei recettori attivati da proteasi (PARs).

Il PAR-1 ha come agonista endogeno preferenziale la trombina [7-9]. Questo enzima si genera in seguito a danno vascolare ed è uno dei componenti più importanti della cascata della coagulazione. La trombina è una proteasi simile alla tripsina che svolge un ruolo centrale nell'omeostasi e nella trombosi ed è implicata in fenomeni biologici quali infiammazione, aggregazione piastrinica, stimolazione della replicazione cellulare e modulazione della contrattilità vascolare. Inoltre numerosi studi hanno evidenziato che la trombina ha un'azione pro-infiammatoria e un'azione broncocostrittiva. Ciò suggerisce che essa contribuisca allo

stato infiammatorio che è alla base delle patologie cardiovascolari ed asmatiche.

Inoltre in questi ultimi anni è stato dimostrato che il recettore PAR-1 media molte azioni cellulari della trombina come l'aggregazione piastrinica, la proliferazione cellulare, le reazioni infiammatorie, quali l'asma bronchiale, e la neurodegenerazione [10-12].

La trombina esplica la sua azione scindendo la catena peptidica extracellulare NH₂-terminale dal suo recettore, chiamato *recettore 1 attivato da proteasi* (PAR-1), tra l'Arg⁴¹ e la Ser⁴² per esporre un nuovo terminale amminico che porta la sequenza peptidica di riconoscimento SFLLRN [13].

Alla scoperta iniziale che la trombina, mediante attività proteolitica specifica, attiva il recettore PAR-1 ha fatto seguito l'evidenza che la tripsina pancreatica, con meccanismo analogo, attiva il recettore PAR-2. La tripsina è una proteasi pancreatica [1] secreta come proenzima inattivo, il tripsinogeno, poi attivato nel lume intestinale da una enterochinasi. L'endopeptidasi tripsina è capace di scindere le molecole proteiche esogene assunte con la dieta, in peptoni e polipeptidi; la sua azione proteolitica è però anche rivolta a proteine endogene, quali altri proenzimi pancreatici o molecole recettoriali.

Il recettore PAR-2 presenta un'omologia di struttura con il recettore PAR-1 pari al 30%.

1.2 MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DEI PARs

Le proteasi attivano i loro recettori per mezzo di un processo che coinvolge tre fasi: il riconoscimento del recettore da parte dell'enzima; il legame tra queste due molecole; il successivo clivaggio del recettore in un sito enzimatico specifico all'interno della regione NH₂-terminale extracellulare. Il nuovo dominio extracellulare NH₂-terminale agisce

come un *tethered or anchored ligand* che ripiega sulla molecola recettoriale tagliata, attivandola.

La porzione minima di *tethered or anchored ligand* attivante il recettore è costituita da 5 o 6 aminoacidi. Proprio per questa particolarità i PARs possono essere considerati un gruppo speciale di recettori nei quali una parte del recettore stesso, opportunamente smascherata dall'azione enzimatica delle proteasi, funziona come agonista.

Il posizionamento del *tethered ligand* sul recettore produce il cambiamento conformazionale dello stesso, anche se a tutt'oggi gli aspetti di tale cambiamento sono sconosciuti. Il recettore nella forma attiva può, in ogni modo, dare inizio alla reazione del complesso eterotrimerico delle proteine G, le quali promuovono la trasduzione del segnale (Figura 2) [14,15].

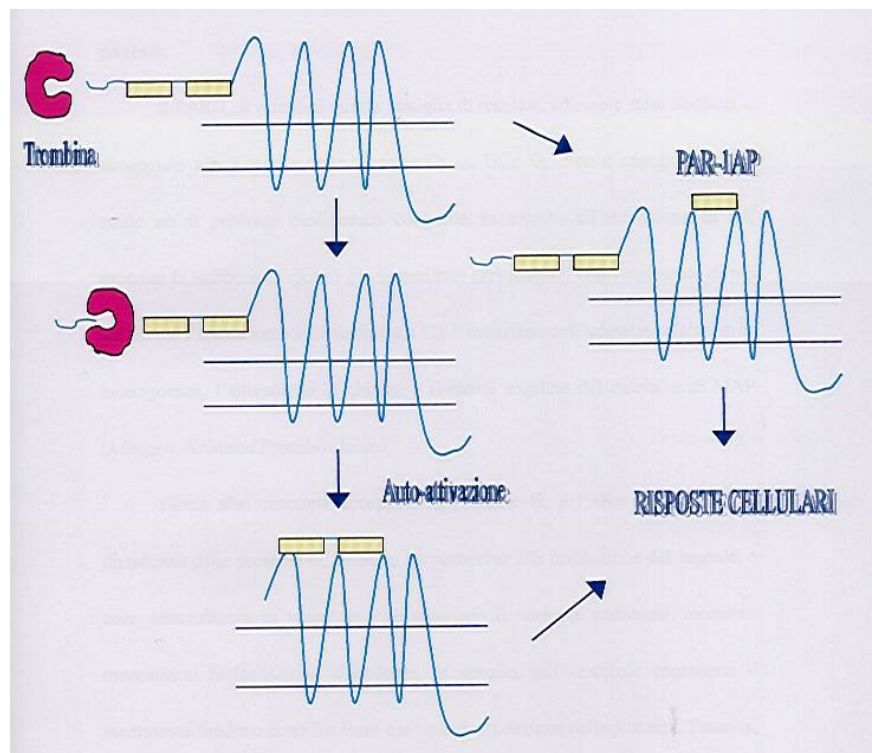


Figura 2 – Meccanismo di attivazione del recettore PAR-1

Nella figura 2 sono riportati, a destra, il meccanismo di attivazione del PAR-1 da parte di un peptide attivatore (PAR-1AP), a sinistra, il meccanismo di attivazione dei recettori accoppiati alle proteine G da parte della trombina (gli altri recettori sono attivati in maniera analoga). Il peptide agonista si lega al suo sito specifico sul recettore e ne provoca la variazione conformazionale che dà inizio alla trasduzione del segnale.

I PAR-1AP possono essere rimossi dal fluido extracellulare da fenomeni di diffusione, uptake cellulare e degradazione enzimatica e questi sono tra i più comuni meccanismi di attenuazione del segnale. Il *tethered ligand*, invece, una volta attivato, è sempre disponibile a legare il recettore e non può essere rimosso da alcun fenomeno di diffusione, diluizione o uptake. La continua presenza di un agonista, che è fisicamente parte del recettore, presenta il problema specifico di come il segnale attivatore possa essere terminato.

Come altri recettori accoppiati a proteine G, i PARs rapidamente si distaccano dalle proteine G in modo da porre fine alla traduzione del segnale e sono internalizzati in vescicole, che prendono il nome di endosomi, mediante meccanismi fosforilazione-dipendenti. In seguito tali vescicole, contenenti il recettore, si fondono con i lisosomi e si ha la degradazione della proteina.

Tuttavia alcune molecole possono andare incontro ad un destino diverso; possono, infatti, ritornare sulla superficie cellulare insieme alla loro sequenza legando in uno stato inattivo, oppure possono essere “riciclate” e conservate in pools intracellulari.

La natura irreversibile dell’attivazione dei PARs in seguito a proteolisi rende il recettore “attivato” resistente ad ulteriori attivazioni proteolitiche. Per questo motivo, il catabolismo dei recettori causato dalla trombina rende le cellule non responsive alle proteasi per un notevole

periodo di tempo, almeno fino a che la membrana plasmatica non si sia ricaricata di recettori di nuova sintesi, intatti e che quindi possano essere attivati [4].

1.3 STRUTTURA E CARATTERISTICHE DEI RECETTORI PARs

La sequenza aminoacidica della regione extracellulare dei PARs è di importanza cruciale per il meccanismo e la selettività dell'attivazione di questo tipo di recettori. Il dominio extracellulare NH₂-terminale del PAR-1 umano contiene un sito proteolitico selettivo per la trombina (LDPR⁴¹S⁴²FLLRN) seguito da una sequenza di un dominio carico negativamente (D⁵¹KYEPF⁵⁶), il quale interagisce con un sito di legame ionico della trombina inducendo, probabilmente, un cambio conformazionale sul recettore per accomodare il suo sito metabolico sul substrato catalitico della trombina. E' stato dimostrato che l' α -trombina taglia la sequenza del PAR-1 tra l'Arg⁴¹ e la Ser⁴², mentre la γ -trombina, la quale è priva del sito di legame cationico, è 100 volte meno potente. La notevole importanza di questo sito di taglio è sottolineata dal fatto che la trombina perde la sua attività proteolitica quando si osserva la mutazione della Ser⁴² con una Pro e di conseguenza il recettore non viene attivato. Studi di relazione struttura-attività (SAR) riguardanti la sequenza aminoacidica SFLLRN (terminale amminico attivatore del recettore PAR-1), nella quale i residui individuali sono sostituiti con altri aminoacidi, e studi di mutagenesi diretta dei siti del *tethered ligand* dimostrano che i residui critici all'interno di questo dominio includono Phe², Leu⁴, e Arg⁵. Nell'interazione tra il *tethered ligand* ed il PAR-1 è di fondamentale importanza la definizione della regione del recettore che lega il *tethered ligand*. Tale regione si trova nel secondo loop extracellulare ed il residuo che riveste un'importanza critica è il Glu²⁶⁰ (Figura 3). Sostituzioni aminoacidiche infatti, in tale regione, possono

portare all'attivazione spontanea del recettore anche in assenza di trombina.

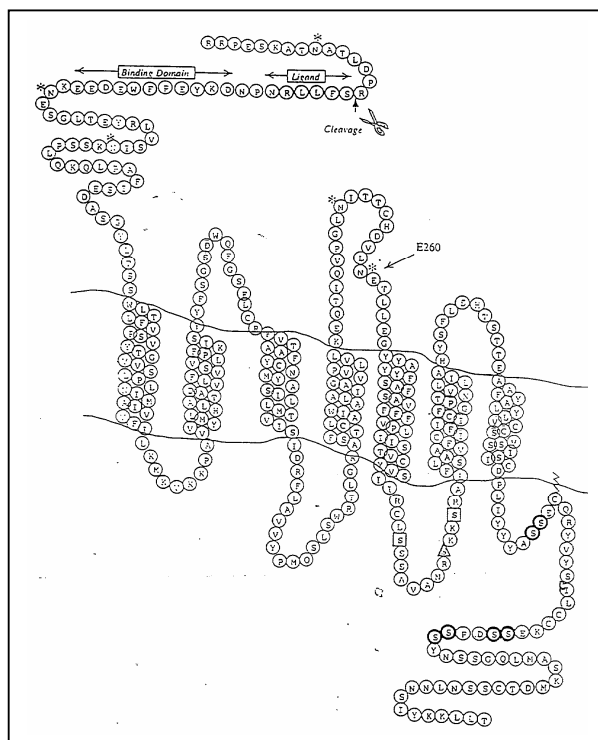


Figura 3 – Struttura transmembrana del recettore PAR-1

1.4 PEPTIDI ATTIVATORI DEI PARs

I peptidi attivatori dei PARs (PAR-APs) sono peptidi sintetici di lunghezza compresa tra 5 e 7 aminoacidi, aventi sequenza aminoacidica uguale a quella del ligando ancorato attivatore dei PARs. La grande importanza di questi PAR-APs sta nel fatto che essi sono in grado di attivare i rispettivi recettori senza effettuare un taglio proteolitico. Per questo motivo, possono essere utili molecole per lo studio delle funzioni biologiche e fisiopatologiche di tali recettori. Infatti, mentre le proteasi (trombina, tripsina pancreatica, ecc..) sono agonisti potenti ma a limitata specificità a causa della loro attività proteolitica, i PAR-APs, privi di

capacità proteolitiche, possono rappresentare degli agonisti più specifici seppure meno potenti. La scarsa potenza è probabilmente dovuta al fatto che questi peptidi solubili sono esposti alla regione di legame in modo meno efficace rispetto al ligando ancorato. Inoltre, poiché i PAR-APs sono rapidamente inattivati dagli enzimi proteolitici, sono stati trasformati nei corrispondenti derivati carbossamidici, ottenendo in tal modo anche un incremento dell'attività biologica.

2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Il PAR-1 è attivato dalla trombina ed è espresso in vari tessuti (tratto gastrointestinale, piastrine e cellule vascolari). Il suo coinvolgimento nelle risposte cellulari associate all'emostasi ed alla proliferazione cellulare lo rende un attraente *target* per la scoperta di farmaci utilizzabili per il trattamento di vari disturbi come la trombosi, l'aterosclerosi, l'infiammazione e le metastasi neoplastiche. Un derivato che agisca da PAR-1 antagonista, quindi, potrebbe essere capace di interferire con le azioni cellulari della trombina senza modificare il suo ruolo nella coagulazione e nell'emostasi; inoltre, l'antagonista PAR-1, unitamente agli agonisti PAR-1, sarebbero un utile strumento farmacologico per la caratterizzazione del ruolo fisiologico del PAR-1, che tutt'oggi non è stato del tutto definito. Sono stati condotti molti studi sulle relazioni struttura-attività della sequenza del PAR-1AP (SFLLRN). Sostituzioni di singoli aminoacidi hanno indicato che, sebbene la Ser¹ sia fondamentale nel meccanismo di *binding* recettoriale, la sua sostituzione può essere tollerata se viene conservato il gruppo amminico libero. La Phe² è risultata, invece, essenziale ai fini dell'attività agonista; la sua sostituzione con l'Ala determina, infatti, una completa perdita di attività [16]. I due residui di Leu in posizione 3 e in posizione 4 non sembrano essere molto importanti ai fini dell'attività; al contrario, risulta indispensabile la presenza dell'Arg⁵. Sulla base di queste prime indicazioni è stato, quindi, elaborato un modello di distribuzione spaziale a tre punti dei gruppi amminico, aromatico e guanidinico, risultati fondamentali per l'attività agonista del peptide SFLLRN (Figura 4).

Studi condotti al fine di individuare la conformazione bioattiva del PAR-1AP (SFLLRN) hanno ipotizzato che il peptide attivatore interagisca con il recettore PAR-1 in una conformazione pseudociclica, che porta i residui di Phe² e di Arg⁵ ad essere spazialmente vicini [17].

Recenti studi hanno, poi, ulteriormente definito le caratteristiche

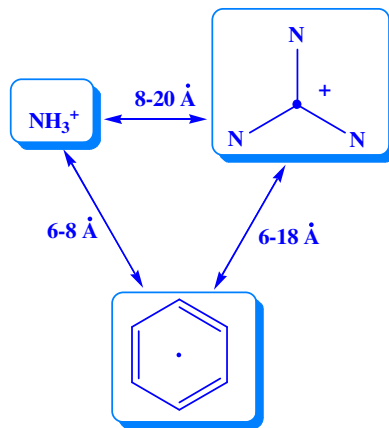


Figura 4 - Modello di distribuzione spaziale a tre punti del recettore PAR-1

dell'interazione tra il PAR-1 e i suoi ligandi portando alla sintesi di una serie di tetra- e pentapeptidi con una pronunciata attività agonista.

La possibilità di impiego di molecole peptidiche come veri e propri farmaci è, però, limitata dalle proprietà intrinseche dei peptidi stessi quali:

- a) bassa stabilità metabolica;
- b) scarso assorbimento, dopo somministrazione orale, dovuto all'elevato peso molecolare o all'assenza di un adeguato sistema di trasporto;
- c) impossibilità di attraversamento della BEE;
- d) rapida escrezione attraverso il fegato e i reni;

- e) effetti indesiderati causati dall'interazione dei peptidi conformazionalmente flessibili con diversi sottotipi recettoriale;
- f) effetti su diversi tipi di cellule ed organi poiché i recettori dei peptidi sono ampiamente distribuiti nell'organismo.

Lo sviluppo di potenti peptidi, agonisti ed antagonisti del recettore PAR-1, con attività biologica paragonabile a quella del ligando endogeno, si è rivelato un lavoro piuttosto impegnativo e questo perché, da un punto di vista entropico, l'attivazione intramolecolare del recettore da parte di un "tethered ligand" risulta molto più favorita rispetto all'attivazione da parte di un peptide libero, isolato.

La sostituzione della Phe² con la *p*-F-Phe, ma non con alogeni più grandi, incrementa la potenza agonista di circa cinque volte, molto probabilmente, aumentando l'interazione π - π tra il ligando e il recettore. Anche l'introduzione di aminoacidi neutri o basici in posizione 3 determina un aumento dell'affinità nei confronti del recettore.

Sulla base di queste considerazioni e come risultato di uno studio razionale condotto su una serie di derivati peptidici variamente sostituiti, è stato individuato il primo potente antagonista PAR-1, l'*N-trans*-cinnamoil-*p*-fluoro-Phe-*p*-guanidino-Phe-Leu-Arg-NH₂ [18].

Gli studi condotti, tesi all'identificazione dei requisiti strutturali e conformazionali essenziali per promuovere il legame della molecola al sito recettoriale, hanno dimostrato che l'attività è legata essenzialmente alla presenza di almeno un pentapeptide caratterizzato dai seguenti requisiti:

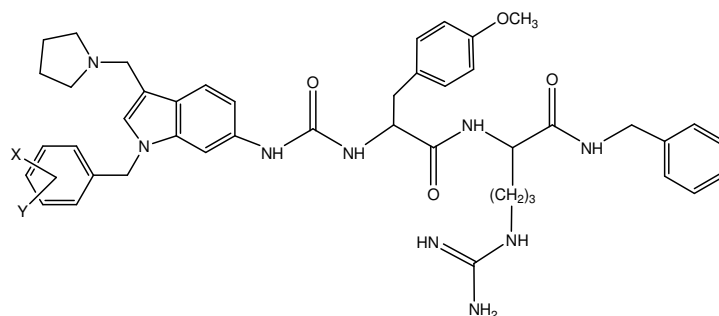
- gruppo amminico terminale in posizione 1-;
- residuo aromatico (es. Phe) in posizione 2-;
- residuo basico (es. Arg) in posizione 5-.

Sulla base dei risultati SAR, ottenuti dai peptidi agonisti analoghi del PAR-1AP, l'interesse è stato rivolto alla possibilità di progettare composti peptidomimetici, agonisti ed antagonisti del recettore PAR-1, caratterizzati dai seguenti requisiti:

- introduzione di vincoli conformazionali nel ligando SFLLRN, quali isosteri del legame peptidico ed aminoacidi non convenzionali;
- introduzione di un *template* eterociclico idoneo per ottimizzare spazialmente i gruppi funzionali necessari, riportati precedentemente.

2.1 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 1-4

Nella prima fase della ricerca il nucleo 6-amminoindolico è stato scelto come *scaffold* in quanto presenta i requisiti spaziali e sintetici adatti per l'introduzione dei gruppi chiave necessari per l'attività. Sono stati quindi sintetizzati composti pseudopeptidici la cui struttura generale è riportata in Tabella 2, dove X e Y rappresentano gruppi elettron-donatori e/o attrattori.

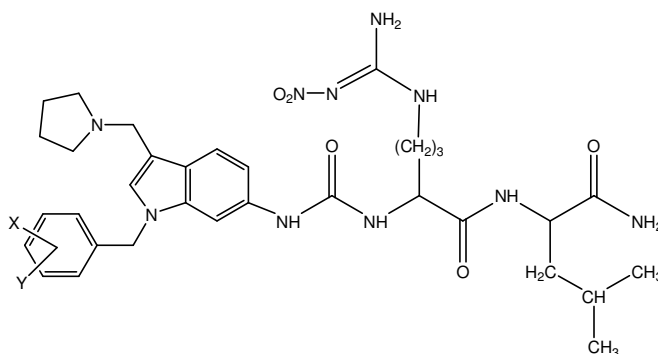


Composto	X	Y
TECA 1	2-Cl	H
TECA 2	4-F	H
TECA 3	2-Cl	6-Cl
TECA 4	4-OCF ₃	H

Tabella 2 - Composti a nucleo indolico della serie **TECA 1-4**.

2.2 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 5-19

Successivamente, al fine di valutare l'importanza della funzione basica del residuo guanidinico dell'Arg⁵, sono stati sintetizzati composti pseudopeptidici la cui struttura generale è riportata in Tabella 3, caratterizzati da un residuo guanidinico bloccato mediante l'impiego di un gruppo -NO₂ e dal gruppo benzilico, legato all'azoto indolico, opportunamente sostituito.



Composto	X	Y	Composto	X	Y
TECA 5	H	H	TECA 13	4-OCF ₃	H
TECA 6	2-CH ₃	H	TECA 14	2-OCF ₃	6-OCF ₃
TECA 7	4-CH ₃	H	TECA 15	2-Cl	H
TECA 8	2-CH ₃	5-CH ₃	TECA 16	4-Cl	H
TECA 9	2-OCH ₃	H	TECA 17	2-Cl	6-Cl
TECA 10	4-OCH ₃	H	TECA 18	2-F	H
TECA 11	2-OCH ₃	6-OCH ₃	TECA 19	4-F	H
TECA 12	2-OCF ₃	H			

Tabella 3 - Composti a nucleo indolico della serie **TECA 5-19**.

In tutti i derivati il gruppo guanidinico dell'arginina è stato nitrato poiché tale sostituzione può influire positivamente sulle proprietà conformazionale favorendo l'interazione con il sito recettoriale.

Difatti, come è stato confermato da analisi ai raggi X e IR su modelli di nitroguanidina ed L-nitroarginina, la nitratura dell'Arg forma una η^1 -nitroimmina stabilizzata dalla formazione di un forte legame idrogeno intramolecolare (Figura 5) che produce un sistema coniugato quasi planare.

I dati farmacologici ottenuti per queste due serie di composti hanno fornito interessanti relazioni struttura-attività.

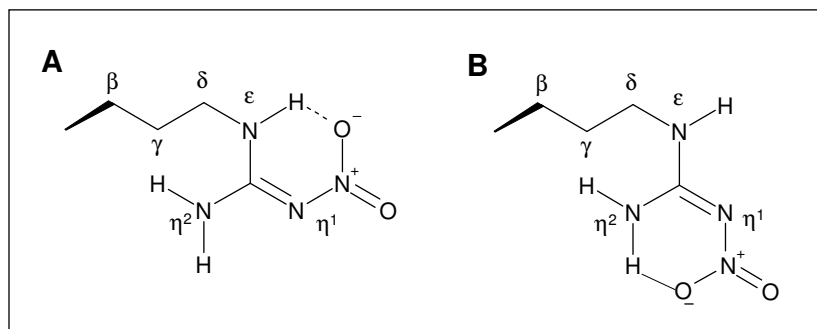


Figura 5 – Sistema coniugato della nitroguanidina.

–NH₂ sulla struttura benzilica stabilizzano la struttura farmacoforica, ma rendono difficile il legame al recettore PAR-1.

L'anello nitroguanidinico così formato potrebbe interagire con la struttura benzoile aromatica al terminale amminico, attraverso una favorevole interazione di sovrapposizione π - π , per dare una struttura molecolare simile a quella proposta per la conformazione bioattiva dei PAR-APs lineari.

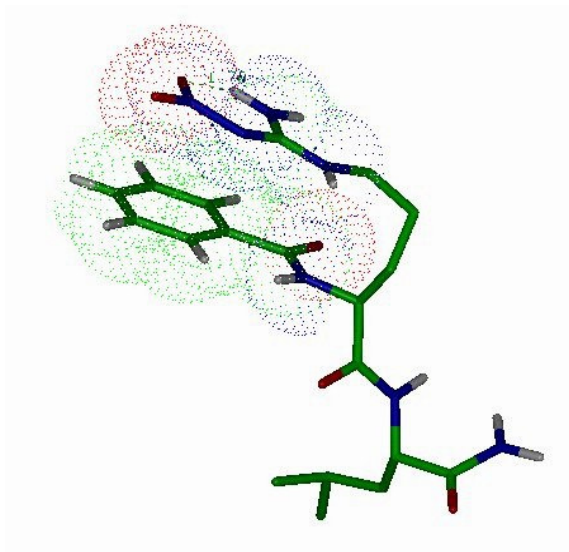


Figura 6 – Modello di sovrapposizione π - π tra l'anello nitroguanidinico e l'anello aromatico.

Analisi statistiche della geometria delle interazioni tra anelli aromatici effettuate su dati cristallografici di proteine e piccole molecole, hanno rilevato che la conformazione T-shaped, cioè quella in cui i due anelli assumono una posizione ortogonale fra loro è preferita nelle proteine, mentre una conformazione in cui i due anelli sono disposti in modo parallelo leggermente spostati, è più largamente rappresentata in piccole molecole organiche ed in corte catene peptidiche in mezzo acquoso.

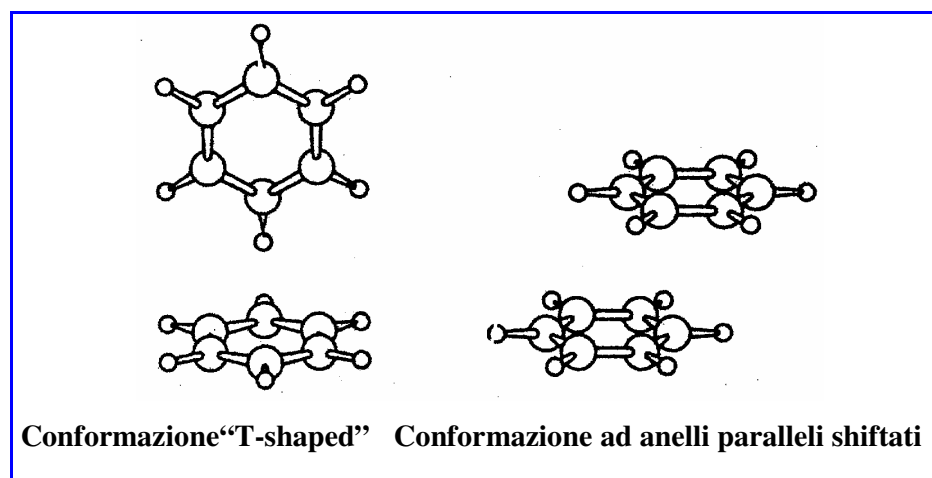


Figura 7 – Interazioni spaziali tra l’anello nitroguanidinico e la struttura benzoile aromatica.

Un dato orientamento risulta, in effetti, da un bilancio di interazioni attrattive tra elettroni π e struttura σ , repulsioni π - π ed effetti idrofobici. Questi ultimi, in particolare, favoriscono in mezzo acquoso la sovrapposizione di piccole molecole.

Bisogna dire però, che a causa delle interazioni Arg-anello aromatico, la sovrapposizione parallela leggermente spostata del gruppo guanidinico dell’Arg con la struttura aromatica è osservata molto più frequentemente nelle proteine di quanto non ci si potrebbe aspettare. Nel

nostro caso, la nitratura dell'Arg produce un sistema coniugato accettore di elettroni più grande di quello guanidinico; questo sistema, perciò, può interagire più fortemente con l'anello aromatico.

A questo punto, se la proposta interazione di sovrapposizione π - π tra la benzammide e la nitroguanidina veramente gioca un ruolo nello stabilizzare la conformazione bioattiva del PAR-1 antagonista, la densità elettronica sull'anello aromatico dovrebbe influenzare la forza di questa interazione, e, quindi, aumentare l'affinità per il recettore PAR-1. In particolare, ci si aspetta che i gruppi elettron-donatori o elettron-attrattori aumentino o riducano rispettivamente la capacità di legarsi al recettore.

2.3 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 20-31

Contestualmente alla sintesi dei composti **TECA 5-19**, in letteratura è stato riportato un derivato, denominato RWJ-54003 (Figura 8), strutturalmente correlato ai composti precedentemente sintetizzati e con una notevole potenza antagonista [19]; esso, infatti, insieme ai prodotti precedenti, è stato assunto come prodotto di riferimento per la progettazione di una nuova serie di composti denominati **TECA 20-31**.

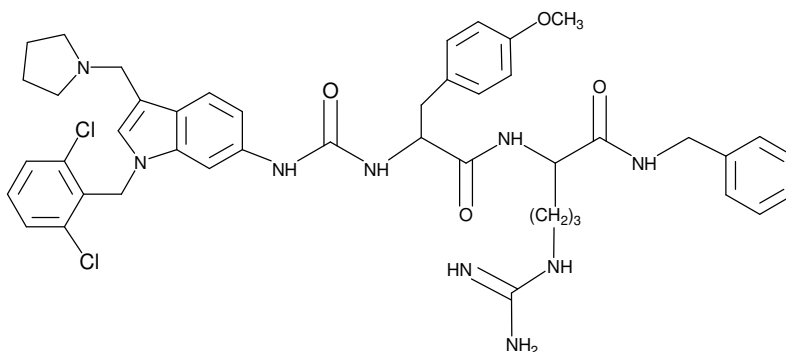
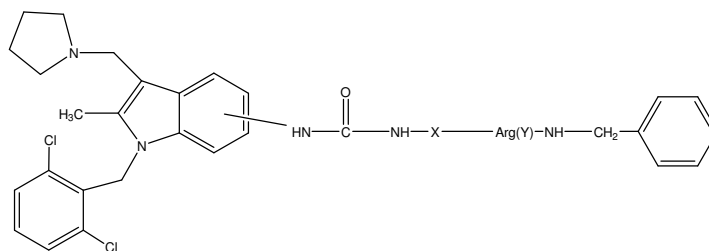


Figura 8 - Struttura dell'antagonista RWJ-54003.

I derivati di questa nuova serie (**TECA 20-31**) riportati in Tabella 4, sono strutturalmente caratterizzati, rispetto alla struttura di riferimento, dall'inserimento di un gruppo metilico in posizione 2 dell'anello indolico. Tale gruppo, spingendo il nucleo pirrolidinico fuori dal piano dell'anello indolico, potrebbe favorire l'instaurarsi di una interazione di tipo ionico tra l'atomo di azoto della pirrolidina, protonato a pH fisiologico, e la struttura del recettore. Inoltre, poiché tutti i composti sintetizzati fino a quel momento presentavano il frammento dipeptidico ancorato sull'anello indolico in posizione 6, si è pensato di sintetizzare dei derivati in cui la porzione peptidica fosse legata in posizione 5. In alcuni composti la presenza della Tyr(Me) è rimasta invariata, in altri essa è stata sostituita da aminoacidi non naturali come la 3,4 di F-Phe, oppure la 1-Nal e la 2-Nal, allo scopo di verificare se anche l'isomeria strutturale dell'aminoacido potesse influenzare l'attività. E' rimasta invariata, invece, la presenza sull'azoto indolico di un gruppo benzilico 2,6-diclorosostituito.



Composto	Posizione di ancoraggio	X	Y
TECA 20	5	Tyr(Me)	H
TECA 21	5	1-Nal	H
TECA 22	6	Tyr(Me)	H
TECA 23	6	1-Nal	H
TECA 24	5	2-Nal	H
TECA 25	6	3,4 di F-Phe	H
TECA 26	6	Tyr(Me)	Pbf
TECA 27	5	Tyr(Me)	Pbf
TECA 28	5	1-Nal	Pbf
TECA 29	6	1-Nal	Pbf
TECA 30	5	2-Nal	Pbf
TECA 31	6	3,4 di F-Phe	Pbf

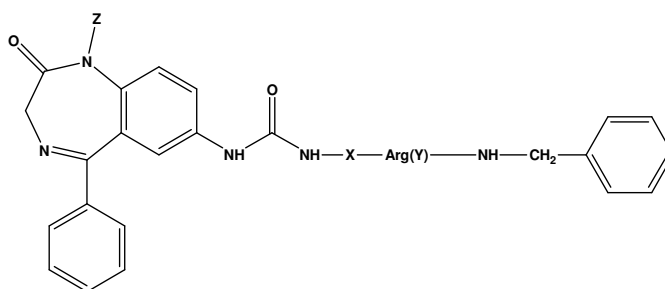
Tabella 4 – Composti della serie **TECA 20-31** a nucleo indolico

2.4 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO BENZODIAZEPINICO DELLA TECA 32-47

Sebbene l'impiego del nucleo indolico in tutte le serie di composti finora descritte avesse dato risultati soddisfacenti, l'ampio progetto in cui si cala il mio lavoro di dottorato prevedeva la sostituzione dello scaffold indolico con nuclei eterociclici bioisostero di diversa natura. A tale scopo sono stati sintetizzati i composti della serie **TECA 32-47**, che presentano uno scaffold di tipo benzodiazepinico al fine di valutare se tale nucleo

eterociclico potesse permettere un migliore adattamento spaziale dei residui farmacoforici nella controparte recettoriale.

Il nucleo benzodiazepinico è stato opportunamente funzionalizzato mediante legame ureico, con gli stessi sostituenti presenti nella serie indolica, al fine di annullare tutte le altre potenziali variabili e di poter confrontare direttamente l'attività biologica delle due serie di composti (Tabella 5).

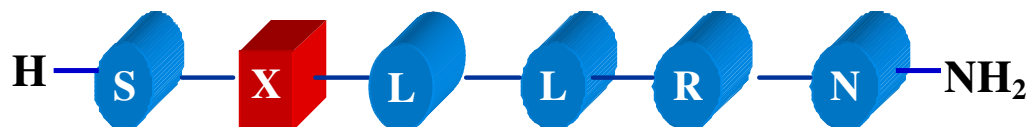


Composto	X	Y	Z
TECA 32	Tyr(Me)	Pbf	H
TECA 33	Tyr(Me)	H	H
TECA 34	Tyr(Me)	Pbf	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 35	Tyr(Me)	H	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 36	1-Nal	Pbf	H
TECA 37	1-Nal	H	H
TECA 38	1-Nal	Pbf	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 39	1-Nal	H	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 40	2-Nal	Pbf	H
TECA 41	2-Nal	H	H
TECA 42	2-Nal	Pbf	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 43	2-Nal	H	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 44	3,4-diF-Phe	Pbf	H
TECA 45	3,4-diF-Phe	H	H
TECA 46	3,4-diF-Phe	Pbf	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)
TECA 47	3,4-diF-Phe	H	-CH ₂ -N-c(C ₄ H ₈)

Tabella 5 – Composti della serie **TECA 32-47** a nucleo benzodiazepinico.

2.5 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALL'INTRODUZIONE DI N-ALCHIL GLICINE NELLA SEQUENZA DEL PAR-1AP

Uno degli obiettivi del mio lavoro di dottorato è stato l'introduzione di vincoli conformazionali nella sequenza del PAR-1AP, al fine di irrigidire la struttura tridimensionale bioattiva della molecola. A tale scopo si è pensato di sostituire la Phe in posizione 2 con nuovi "scaffold" peptidici, le N-alcil glicine (Figura 9).



dove X:

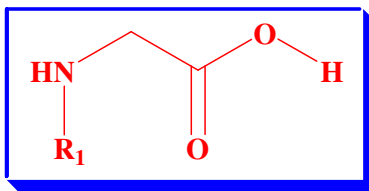


Figura 9 - Struttura generale dei composti peptidomimetici contenenti N-alcil glicine.

Gli aminoacidi introdotti nella sequenza ed i relativi composti ottenuti sono riportati in Tabella 6.

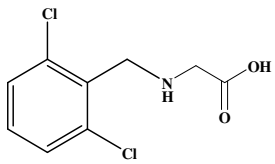
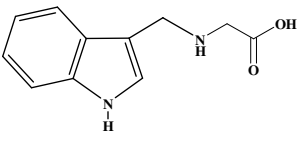
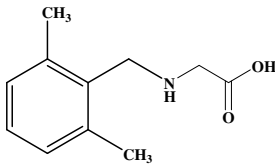
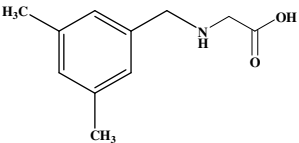
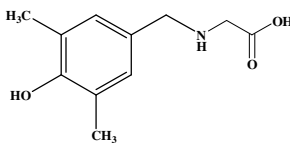
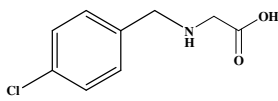
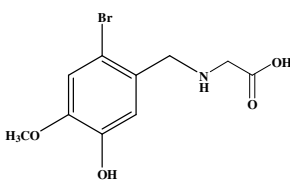
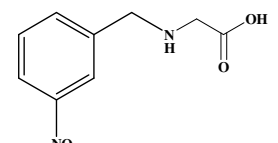
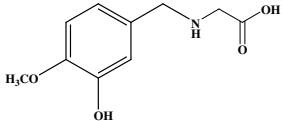
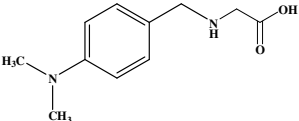
Composto	X	Composto	X
TECA 48		TECA 53	
TECA 49		TECA 54	
TECA 50		TECA 55	
TECA 51		TECA 56	
TECA 52		TECA 57	

Tabella 6 - Composti pseudopeptidici analoghi del PAR-1AP contenenti N-alchil glicine.

Tali residui aminoacidici modificati sono caratterizzati dallo spostamento della catena laterale degli aminoacidi dal carbonio α all'azoto.

Le N-alchil glicine sono importanti “building blocks” che possono essere inseriti nella sintesi di un grande numero di

peptidomimetici, consentendo l'introduzione di gruppi funzionali farmacologicamente rilevanti in una posizione non convenzionale del peptide.

Per la sintesi di questi derivati aminoacidici N-alchilati sono state riportate in letteratura una grande varietà di condizioni di reazione sia in soluzione che in fase solida. Di tutti questi metodi, l'alchilazione riduttiva gioca un ruolo chiave e, quindi, sono stati utilizzati a tal fine numerosi agenti riducenti.

Conoscendo l'importanza della sostituzione degli aminoacidi con i corrispondenti derivati della glicina N-alchil sostituiti, il nostro obiettivo è stato rivolto al miglioramento della sintesi di questi residui modificati, tenendo in considerazione la possibilità di utilizzare nuove metodologie sintetiche nonché la loro introduzione nella sequenza del PAR-1AP [20].

Negli ultimi anni, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato ha rivolto la propria attenzione al miglioramento della sintesi di peptidomimetici, ed in particolare, all'applicazione dell'irraggiamento mediante microonde nella sintesi peptidica in abbinamento a metodologie di chimica combinatoriale.

Partendo da queste considerazioni, è stata sviluppata una libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti, ottenuta proprio mediante riscaldamento a microonde e con strategie di sintesi combinatoriali parallele e non-parallele.

2.6 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALLA INTRODUZIONE DEL Tic E DEI SUOI ANALOGHI 5-,6-, 7- E 8-GTic NELLA SEQUENZA DEL PAR-1AP

L'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic) è un analogo stericamente costretto della Phe [21]. Tale aminoacido non naturale ed i suoi derivati basici, che presentano un gruppo guanidinico in posizione 5,

6, 7 e 8 sono stati introdotti nella sequenza del PAR-1AP in sostituzione della Phe, al fine di ottenere nuovi composti stericamente vincolati che potessero attivare il recettore PAR-1.

Il Tic ed i suoi analoghi sono caratterizzati dalla seguente struttura generale:

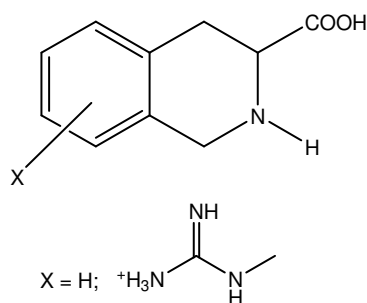


Figura 10 - Struttura generale del Tic e dei suoi analoghi

I composti sintetizzati, riportati in Tabella 7, presentano una struttura generale analoga a quella riportata per i composti peptidomimetici contenenti N-alchil glicine.

Composto	Sequenza
TECA 58	H-S-Tic-L-L-R-N-NH ₂
TECA 59	H-S-5-GTic-L-L-R-NH ₂
TECA 60	H-S-6-GTic-L-L-R-N-NH ₂
TECA 61	H-S-7-GTic-L-L-R-N-NH ₂
TECA 62	H-S-8-GTic-L-L-R-N-NH ₂

Tabella 7 – Struttura dei composti peptidomimetici contenenti il Tic ed i suoi analoghi basici.

2.7 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALLA PRESENZA DI UN ISOSTERO DEL LEGAME PEPTIDICO: IL LEGAME METILENAMMINICO

I surrogati del legame ammidico mimano il legame peptidico e sono più stabili alla idrolisi enzimatica. Molte di queste modifiche sono accompagnate da variazioni della geometria e della struttura topochimica del peptide nonché della distribuzione elettronica e delle proprietà lipofile e idrofile. Inoltre l'introduzione di isosteri del legame ammidico porta anche a variazioni locali e globali dei momenti dipolari nel modello intramolecolare nonché nella formazione di legami a idrogeno nel complesso peptide-recettore (Figura 11).

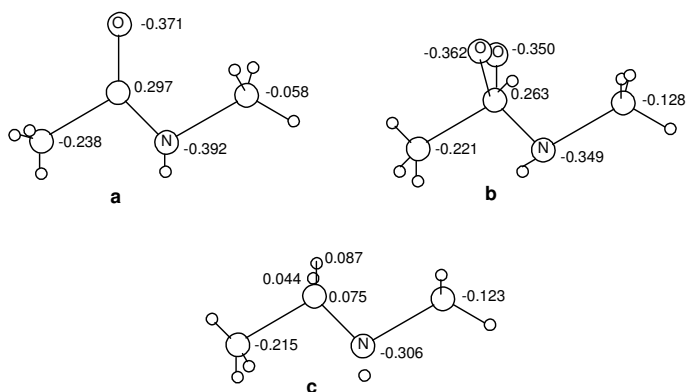


Figura 11 – (a) legame peptidico, (b) stato di transizione del legame peptidico, (c) legame metilenamminico $\psi(\text{CH}_2\text{NH})$.

Perciò modificazioni del legame peptidico non solo aumentano la stabilità enzimatica ma possono anche aumentare la selettività verso i sottotipi recettoriali, variare il profilo farmacologico e migliorare le proprietà farmacocinetiche come la biodisponibilità orale, il trasporto a

livello della barriera ematoencefalica e la durata d'azione. Inoltre va considerato il fatto che il “backbone” può formare complessi con il Ca^{++} e tale complessazione può portare a drastici cambi a livello della conformazione del peptide.

Come nel caso dell'incorporazione di aminoacidi conformazionalmente costretti, le modificazioni del legame peptidico ad un determinato livello della sequenza aminoacidica possono agire come sonda conformazionale variando la libertà rotazionale a livello dello scheletro peptidico.

Il simbolo ψ , relativo ai legami ammidici sostituiti, indica che il legame ammidico tra due residui è sostituito dall'unità in parentesi che segue il ψ ; ad esempio: $-\text{Gly}\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Gly}-$ rappresenta un segmento glicina-glicina in cui il legame peptidico è sostituito con uno ridotto.

Le modifiche apportate a livello del legame peptidico sono di diverso tipo e la nostra attenzione è stata rivolta, in particolare, alla sintesi del legame metilen-amminico tramite l'utilizzo del riscaldamento mediante microonde [22].

L'efficienza delle microonde nella sintesi di composti biologicamente attivi è oggi ormai consolidata, poichè riduce drasticamente i tempi di reazione (in alcuni casi da giorni a ore o minuti) e nella maggior parte dei casi comporta un aumento delle rese.

Sulla base di quest'ultima affermazione, l'obiettivo è stato quello di migliorare le procedure sintetiche precedentemente riportate in letteratura utilizzate per la sintesi di tali derivati e di introdurre tali modifiche nella sequenza del PAR-1AP.

In particolare il mio interesse è stato rivolto alla sintesi mediante irraggiamento a microonde in soluzione e senza solvente di derivati peptidomimetici caratterizzati dalla presenza del legame metilen-amminico (legame peptidico ridotto), analoghi del PAR-1AP (Tabella 8).

COMPOSTO	SEQUENZA
TECA 63	H-S-ψ[CH ₂ NH]-F-L-L-R-N-NH ₂
TECA 64	H-S- F-ψ[CH ₂ NH]-L-L-R-N- NH ₂
TECA 65	H-S-F-L-ψ[CH ₂ NH]-L-R-N- NH ₂
TECA 66	H-S-F-L-L- ψ[CH ₂ NH]-R-N- NH ₂
TECA 67	H-S-F-L-L-R- ψ[CH ₂ NH]-N- NH ₂

Tabella 8 - Struttura dei composti peptidomimetici analoghi del PAR-1AP caratterizzati dal legame metilenamminico.

2.8 IL NUCLEO 1,2,4-OSSADIAZOLICO

Nuclei eterociclici come gli 1,2,4-ossadiazoli e gli 1,3,4-ossadiazoli possono essere introdotti in sequenze peptidiche come isosteri del legame peptidico.

Il nucleo 1,2,4-ossadiazolico presenta interessanti requisiti spaziali e funzionali (Figura 12), esso infatti è stericamente vincolato e può essere opportunamente funzionalizzato con i gruppi farmacoforici ritenuti responsabili dell'attivazione recettoriale.

Come modello di questo nucleo, al fine di ottimizzarne le condizioni di reazione e preparazione e di introdurlo successivamente nelle posizioni prescelte della sequenza attivante il recettore PAR-1, è stato da noi sintetizzato sia in soluzione che in assenza di solvente mediante irraggiamento a microonde [23].

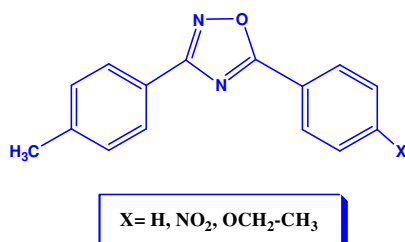


Figura 12 - Struttura del nucleo 1,2,4-ossadiazolico

3. SINTESI

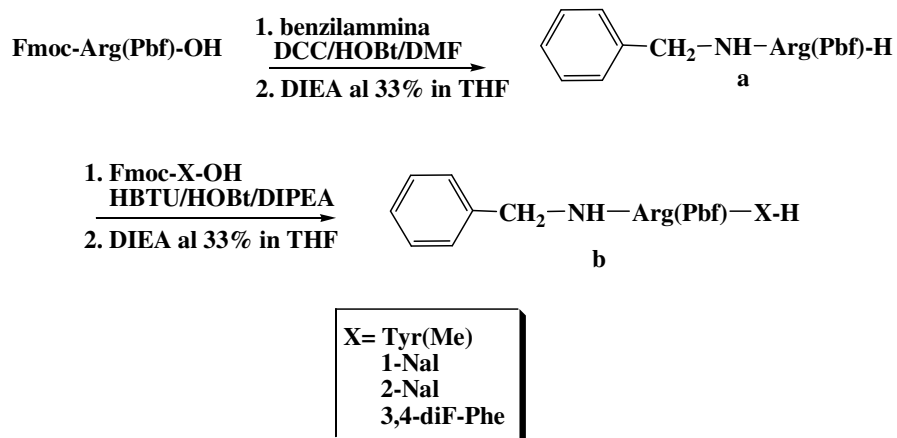
In questa sezione sono riportate le procedure sintetiche impiegate per l'ottenimento dei composti peptidomimetici nonché dei surrogati peptidici e degli aminoacidi non naturali precedentemente riferiti e utilizzati nella sequenza del PAR-1AP.

I prodotti **TECA 1-47** sono stati sintetizzati secondo una procedura di sintesi a blocchi, che prevede separatamente la preparazione del derivato eterociclico e del frammento peptidico ed infine la loro condensazione per l'ottenimento dei prodotti finali.

I prodotti **TECA 48-67** sono stati sintetizzati secondo una strategia in fase solida via Fmoc.

3.1 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI RELATIVI AI COMPOSTI TECA 1-47

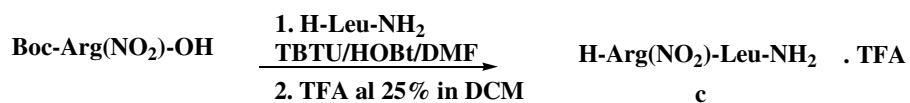
Per la sintesi del frammento peptidico impiegato per la preparazione dei derivati **TECA 1-4 e 20-47**, la Fmoc-Arg(Pbf)-OH è stata condensata con la benzilammina via DCC/HOBt in DMF. La rimozione del gruppo protettore Fmoc con dietilammina (DIEA) al 33% in tetraidrofurano (THF) ha fornito il derivato **a**; il successivo *coupling* con Fmoc-X-OH via O-benzotriazolo-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU) e 1-idrossibenzotriazolo (HOBt) in presenza di N,N'-diisopropiletilammina (DIPEA), ha fornito il corrispondente derivato dipeptidico protetto. La rimozione del gruppo Fmoc con DIEA al 33% in THF e la successiva precipitazione con etere dietilico/n-esano, ha fornito lo pseudo peptide **b** come solido bianco (Schema 1).



Schema 1

Il dipeptide impiegato per la preparazione dei derivati **TECA 5-19** è stato sintetizzato come riportato nello Schema 2.

La H-Leu-NH₂ è stata condensata con la Boc-Arg(NO₂)-OH via O-benzotriazolo-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU)/HOBt in presenza di DIPEA a fornire il corrispondente dipeptide protetto. La rimozione del gruppo Boc con TFA al 25% in DCM e la successiva precipitazione da etere etilico ha fornito il prodotto **c** come solido bianco.

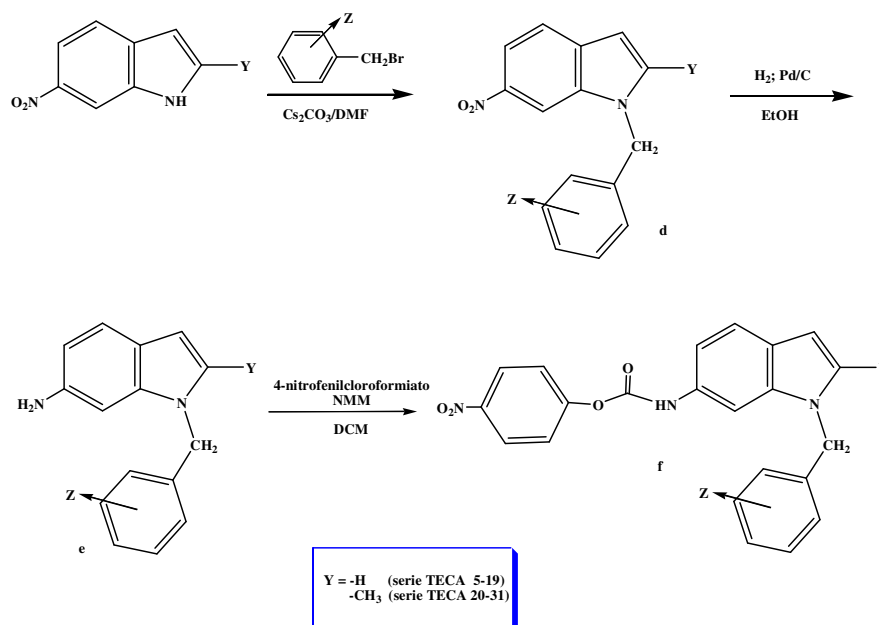


Schema 2

3.2 DERIVATO 6-AMINO INDOLICO

L'intermedio **f**, derivato 6-aminoindolico, è stato ottenuto partendo dal 2-Y-6-nitroindolo disciolto in DMF che, trattato con carbonato di cesio e con l'opportuno benzilbromuro sostituito, ha fornito il derivato **d**.

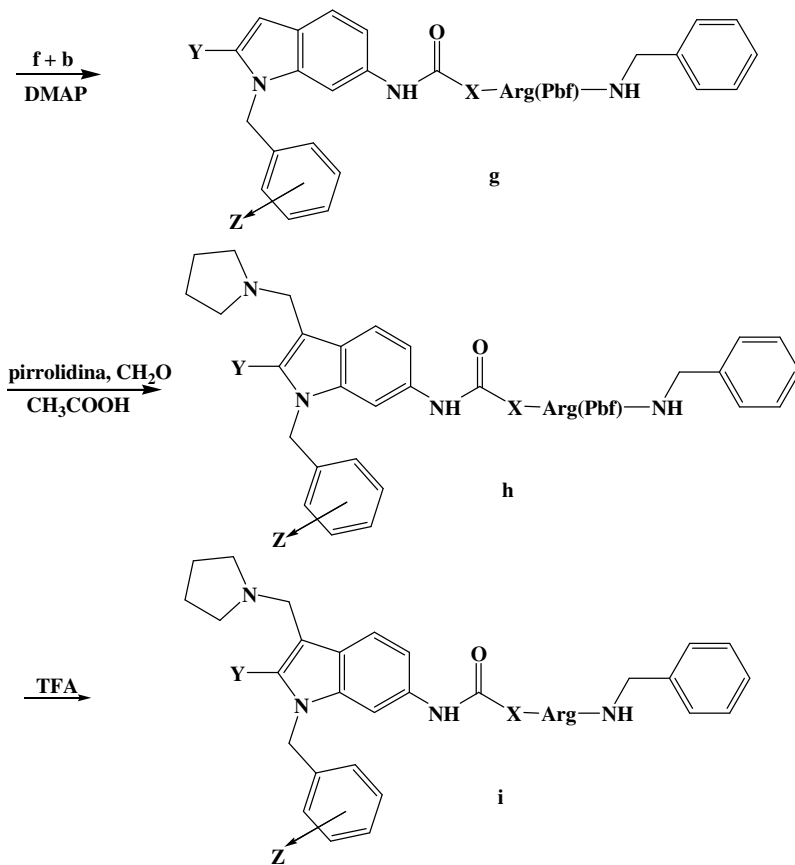
Quest'ultimo è stato sottoposto a idrogenazione catalitica in etanolo fornendo il derivato **e** che è stato fatto reagire con *p*-nitrofenil-cloroformiato, in presenza di N-metilmorfolina (NMM), a -20 °C in diclorometano (Schema 3).



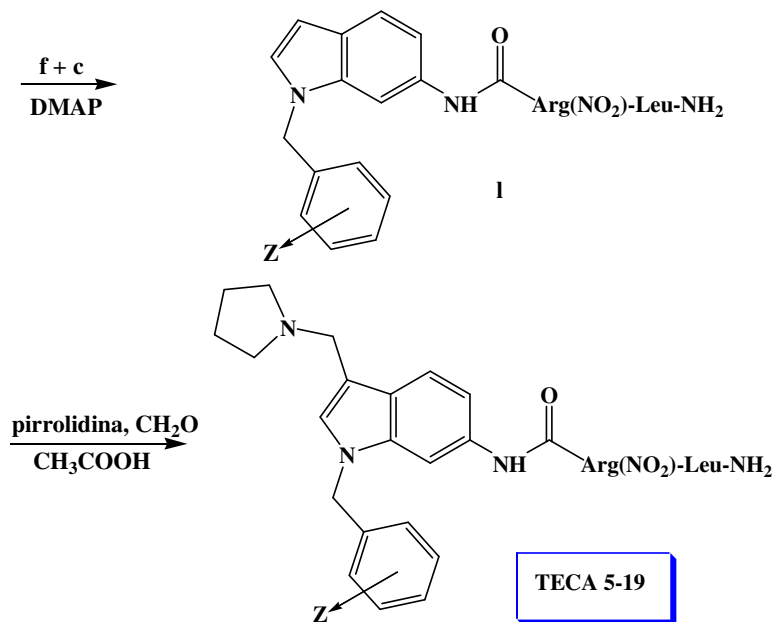
Schema 3

L'intermedio **f**, così ottenuto, è stato fatto reagire, senza ulteriori purificazioni, con l'intermedio **b**, ottenuto come precedentemente descritto. Sul derivato ureico **g** è stata effettuata una condensazione di Mannich con una soluzione di pirrolidina e formaldeide in acido acetico glaciale. L'intermedio **h**, così ottenuto, corrisponde ai prodotti finali della

serie **TECA 20-31** a nucleo indolico che presentano il gruppo guanidinico dell'Arg protetto con Pbf; la rimozione di tale gruppo con TFA permette l'ottenimento dei prodotti finali con il gruppo guanidinico libero (Schema 4).



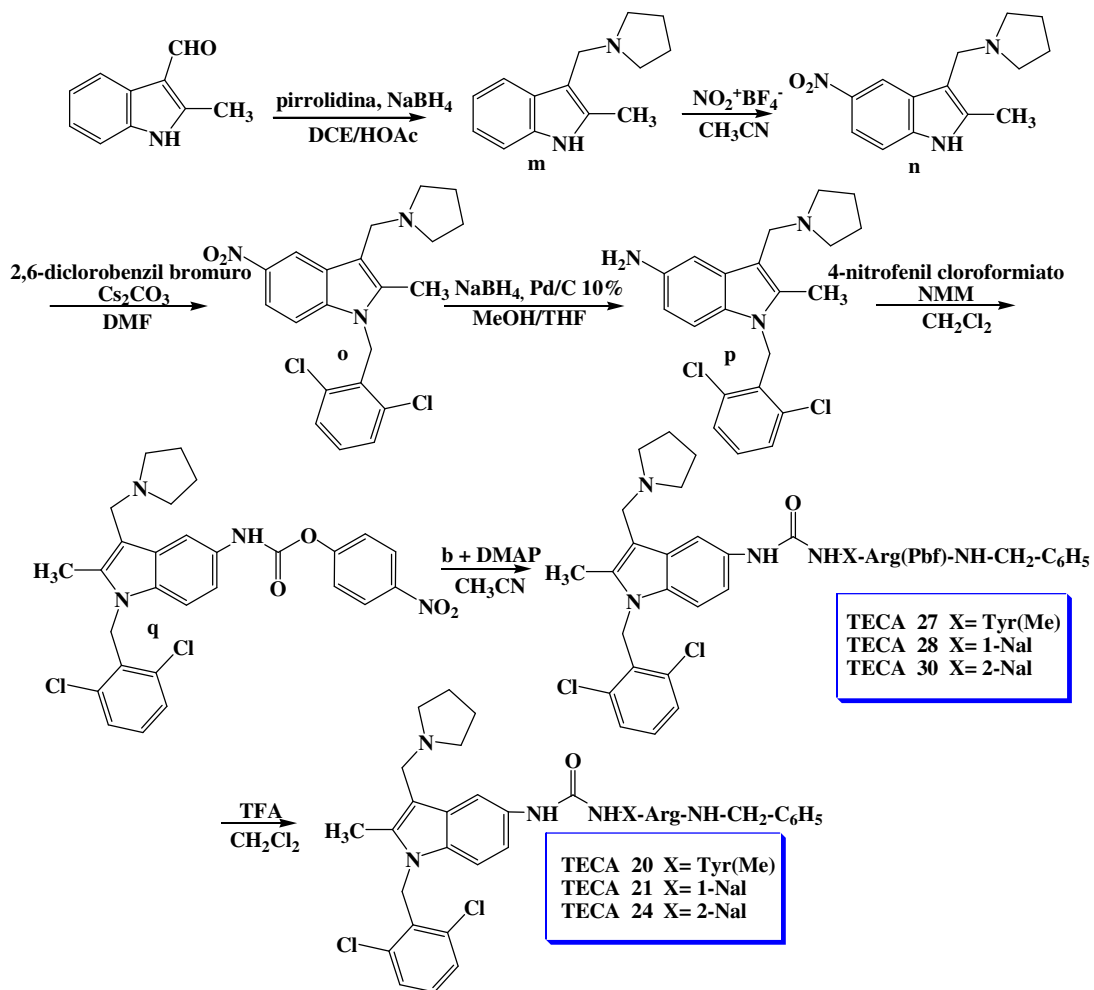
I prodotti della serie **TECA 5-19** sono stati ottenuti con una procedura analoga, ma condensando l'intermedio **f**, derivato 6-aminoindolico, con il peptide **c**, e senza effettuare la deprotezione finale del gruppo protettore dell'Arg (Schema 5).



Schema 5

3.3 DERIVATO 5-AMINO INDOLICO

I derivati 5-aminoindolici sono stati sintetizzati come riportato nello Schema 6. La 2-metil indolo-3-carbossialdeide, sciolta in dicloroetano e acido acetico glaciale, è stata trattata con pirrolidina e NaBH_4 . Sull'intermedio **m**, così ottenuto è stata effettuata una nitratura selettiva in posizione 5 dell'anello indolico in presenza di nitronio tetrafluoroborato, in acetonitrile. L'intermedio indolico **n** è stato successivamente sottoposto alle medesime reazioni di condensazione previste per i composti della serie 6-amino indolica (Schema 6).

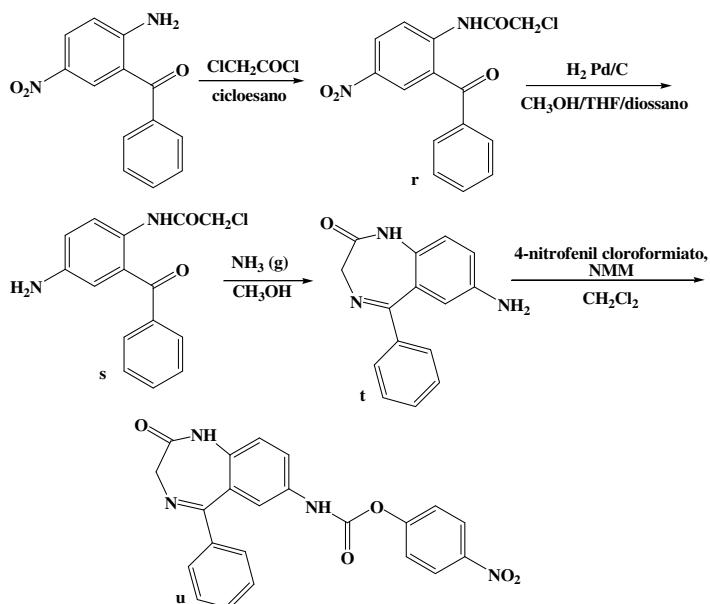


Schema 6

3.4 DERIVATO BENZODIAZEPINICO

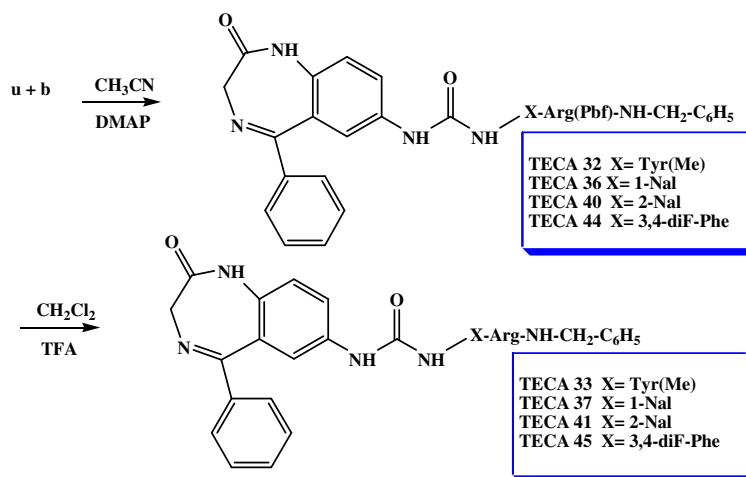
Per la sintesi dell'intermedio a nucleo benzodiazepinico sono state adottate diverse strategie al fine di ottimizzarne le rese.

In primo luogo il (2-amino-5-nitro-fenil)-fenil-metanone è stato condensato con ClCH_2COCl in presenza di NaOH 3N ed EtOAc . In seguito l'impiego di CHCl_3 come solvente ha dato rese più soddisfacenti. Senz'altro i migliori risultati per la sintesi dell'intermedio **r** sono stati ottenuti con ClCH_2COCl in cicloesano (rese 98%). L'intermedio **r**, così ottenuto, è stato sottoposto ad idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}/\text{diossano}$. Successivamente l'amino-derivato **s** è stato ciclizzato in presenza di esametilentetramina ed EtOH assoluto. La migliore strategia sintetica, però, per la sintesi dell'intermedio **t** prevede l'impiego di NH_3 gassosa in CH_3OH a 0°C per 1 ora e poi a riflusso per 3 ore. Quest'ultimo è stato fatto poi reagire con 4-nitrofenil cloroformiato, in presenza di N-metilmorfolina (NMM), a -20°C , in diclorometano (Schema 7).



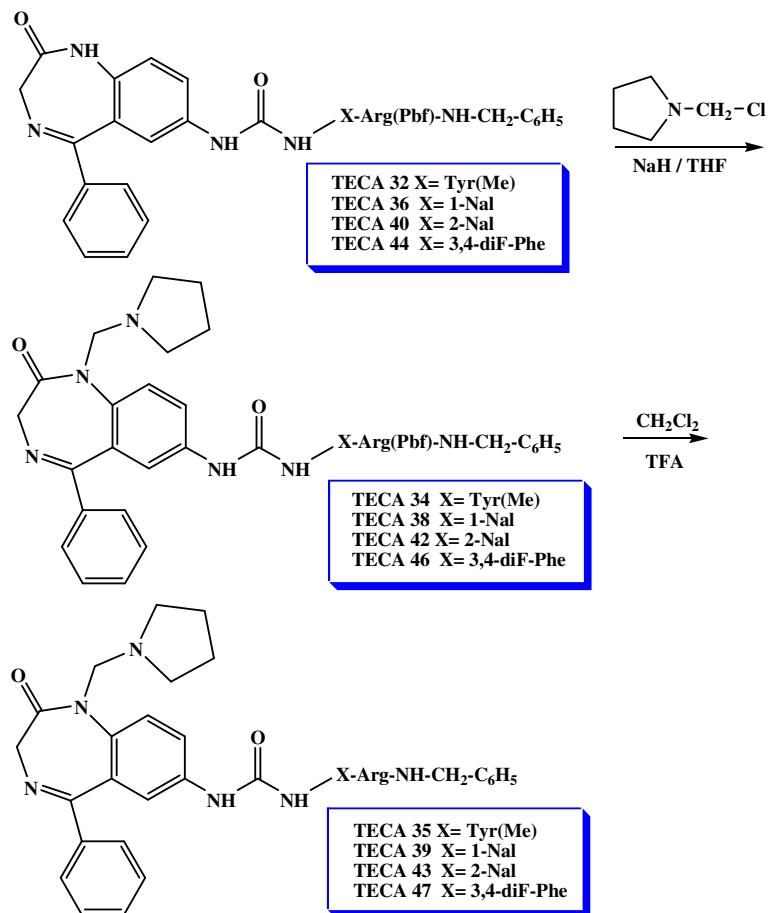
Schema 7

Condensando l'intermedio **u** così ottenuto, senza ulteriori purificazioni, con il peptide **b**, ottenuto come precedentemente descritto, in presenza di CH₃CN e DMAP, si ottengono i prodotti finali a nucleo benzodiazepinico che presentano il gruppo guanidinico dell'Arg protetto con Pbf (TECA 32, 36, 40, 44). Trattando questi ultimi con TFA in CH₂Cl₂, in modo da rimuovere il gruppo Pbf dalla catena laterale dell'Arg, si ottengono i prodotti finali che presentano il gruppo guanidinico libero (TECA 33, 37, 41, 45), riportati nello Schema 8.



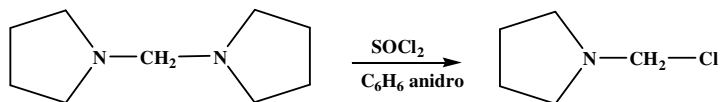
Schema 8

I composti a nucleo benzodiazepinico che presentano il gruppo metileno-pirrolidinico sull'atomo di azoto lattamico sono stati preparati, come riportato nello Schema 9, condensando il corrispondente prodotto, ancora protetto con Pbf, con una clorometil-pirrolidina (TECA 34, 38, 42, 46). La successiva deprotezione, con TFA in CH₂Cl₂, del gruppo protettore Pbf ha dato i prodotti finali corrispondenti (TECA 35, 39, 43, 47; Schema 9).



Schema 9

La cloro metil-pirrolidina non è commercialmente disponibile, ma è stata a sua volta preparata a partire dalla bis-metilen pirrolidina in benzene anidro, in presenza di SOCl_2 (Schema 10).



Schema 10

3.5 N-ALCHIL GLICINE

La sintesi parallela dei derivati aminoacidici modificati è stata condotta mediante alchilazione riduttiva della glicina metil estere cloridrato in presenza di 10 diverse aldeidi aromatiche, commercialmente disponibili (Figura 13), e NaBH_3CN come agente riducente; le aldeidi selezionate forniscono derivati aminoacidici che possono mimare aminoacidi aromatici naturali e non naturali aventi caratteristiche lipofile e steriche diverse.

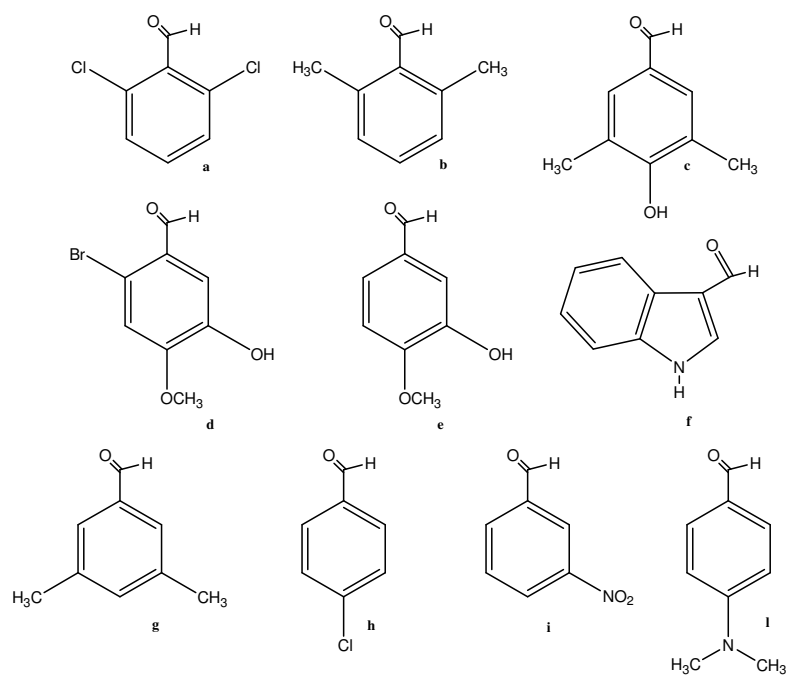
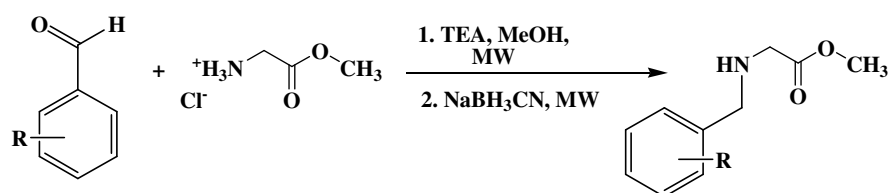


Figura 13

I composti sintetizzati, analoghi del PAR-1AP hanno la struttura generale riportata in Figura 9, in cui la Phe della sequenza $\text{H-S-F-L-L-R-N-NH}_2$ è stata opportunamente sostituita con derivati della glicina N-alchilati.

Ogni reazione è stata condotta in una provetta sigillata specifica per la sintesi a microonde in un carosello “*multiPREP*” a 36 posizioni

(Milestone®); le altre provette sono state riempite con lo stesso solvente di reazione (alcol metilico). La procedura sintetica, riassunta nello Schema 11, è stata condotta usando un forno a microonde (ETHOS 1600, Milestone®) specificamente progettato per la sintesi organica, eseguendo un programma di microonde composto da opportuni “steps” di innalzamento della temperatura seguiti da “steps” di riscaldamento a temperatura costante.



Schema 11

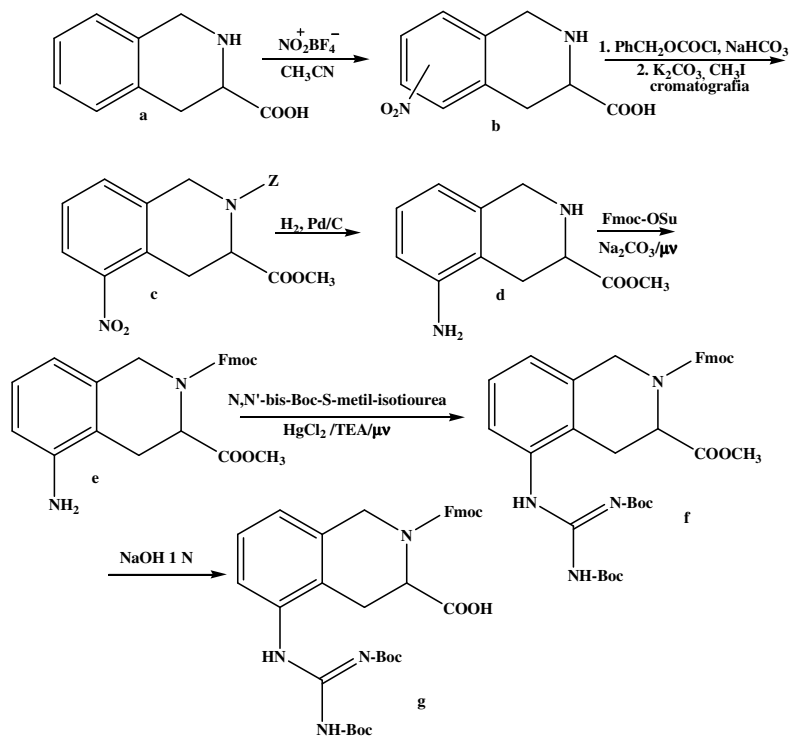
La temperatura della miscela di reazione tenuta sotto agitazione elettromagnetica, è stata monitorata mediante una sonda IR, mentre la rotazione del carosello, il tempo di irraggiamento e la potenza sono stati monitorati con il programma "easyWAVE". L'alchilazione riduttiva ha fornito i composti finali ed è stata condotta in 2 stadi di irradiazione con 300W di potenza, alla temperatura di 45°C in alcol metilico per un tempo totale di 15 minuti.

3.6 TIC E SUOI ANALOGHI BASICI

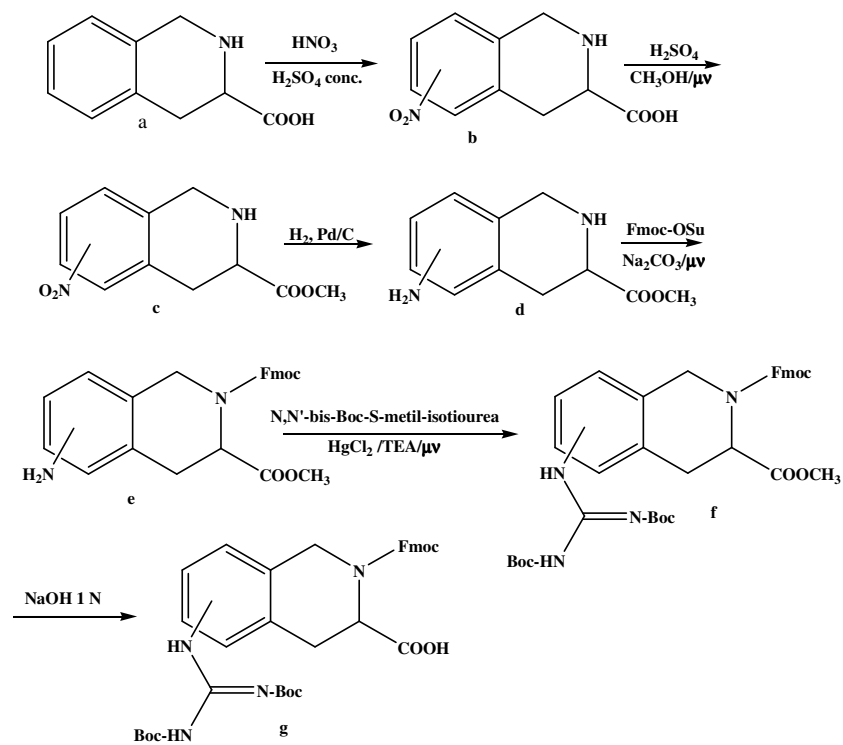
L'aminoacido Tic (acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico) è disponibile commercialmente, mentre i residui 5,6,7 ed 8-GTic sono stati da noi sintetizzati in accordo agli schemi 12, 13 e 14. Numerosi intermedi sono stati sintetizzati mediante irraggiamento a microonde.

Come si evince dagli schemi di sintesi, nonostante si sia cercato di

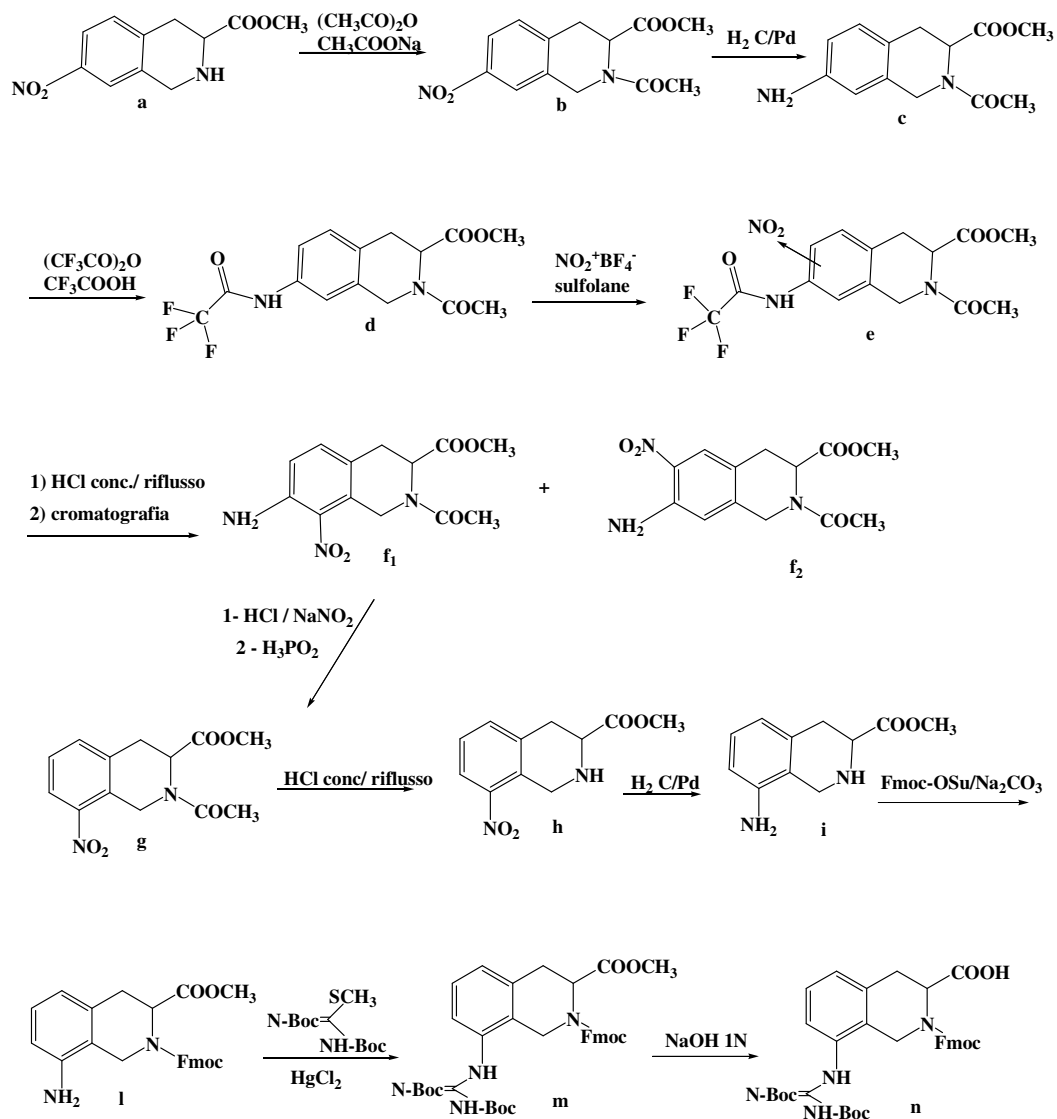
trovare condizioni di nitratura quanto più possibile selettive, si ottengono sempre miscele di prodotti da purificare mediante cromatografia.



Schema 12



Schema 13



Schema 14

3.7 LEGAME METILENAMMINICO

La procedura di sintesi è stata condotta utilizzando un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) specificamente progettato per la sintesi organica. Tutte le reazioni sono state eseguite in vetreria *Pyrex* standard e sottoposte a cicli di irraggiamento a microonde costituiti da appropriati “*steps*” per il raggiungimento ed il mantenimento delle temperature impostate. La temperatura della miscela di reazione è stata monitorata attraverso l’uso di una sonda fluorotica, virtualmente trasparente alle microonde, inserita direttamente nella soluzione.

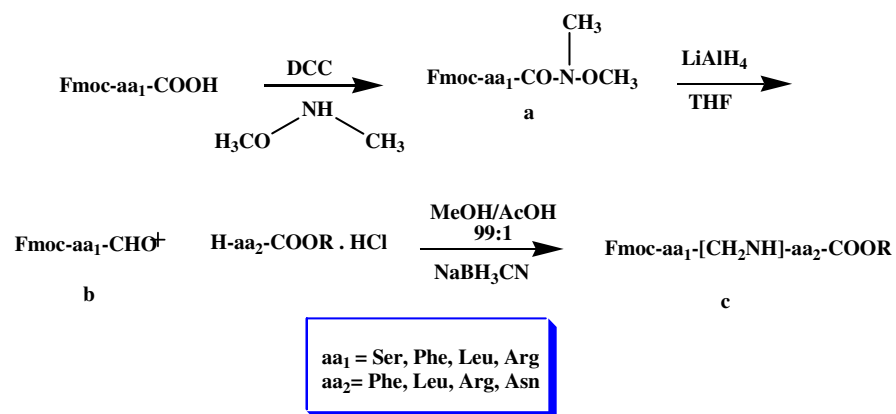
La procedura di sintesi prevede quanto segue: i Fmoc-aminoacidi sono stati fatti reagire con l’N,O-dimetilidrossilamina cloridrata in una soluzione di DMF contenente DCC e DIEA.

Gli N,O-dimetilidrossammati sono stati isolati come prodotti puri attraverso lavaggi con acido citrico e bicarbonato di sodio e successiva purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice. Le aldeidi corrispondenti sono state sintetizzate attraverso la riduzione degli N,O-dimetilidrossammati protetti con LiAlH_4 a 0 °C in THF anidro e successivamente conservate a -20 °C o utilizzate immediatamente, a causa della loro scarsa stabilità. I legami peptidici ridotti sono stati invece ottenuti mediante alchilazione riduttiva del gruppo N^α -amminico, precedentemente deprotetto, con l’appropriata aldeide in presenza di NaBH_3CN in metanolo contenente l’1% di acido acetico.

I dipeptidi modificati sono stati tutti caratterizzati mediante spettrometria di massa ed i risultati ottenuti sono stati consistenti con i valori attesi. Non si è evidenziata inoltre racemizzazione durante il riscaldamento a microonde. I tempi di reazione sono stati notevolmente ridotti tramite l’irraggiamento mediante microonde, mentre le rese sono risultate sempre più alte rispetto alle procedure di riscaldamento convenzionale. In modo particolare i tempi vengono ridotti da 16 ore a 15

minuti nella sintesi degli N,O-dimetilidrossammati e da 1 ora a 9 minuti per l'ottenimento dei composti finali.

Per la sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico non è stato possibile sviluppare una strategia di sintesi senza solvente: abbiamo notato, infatti, che i reagenti venivano decomposti durante il riscaldamento a microonde dopo appena 4 minuti; come supporti solidi sono stati verificati l'allumina basica e la *montmorillonite* K-10.



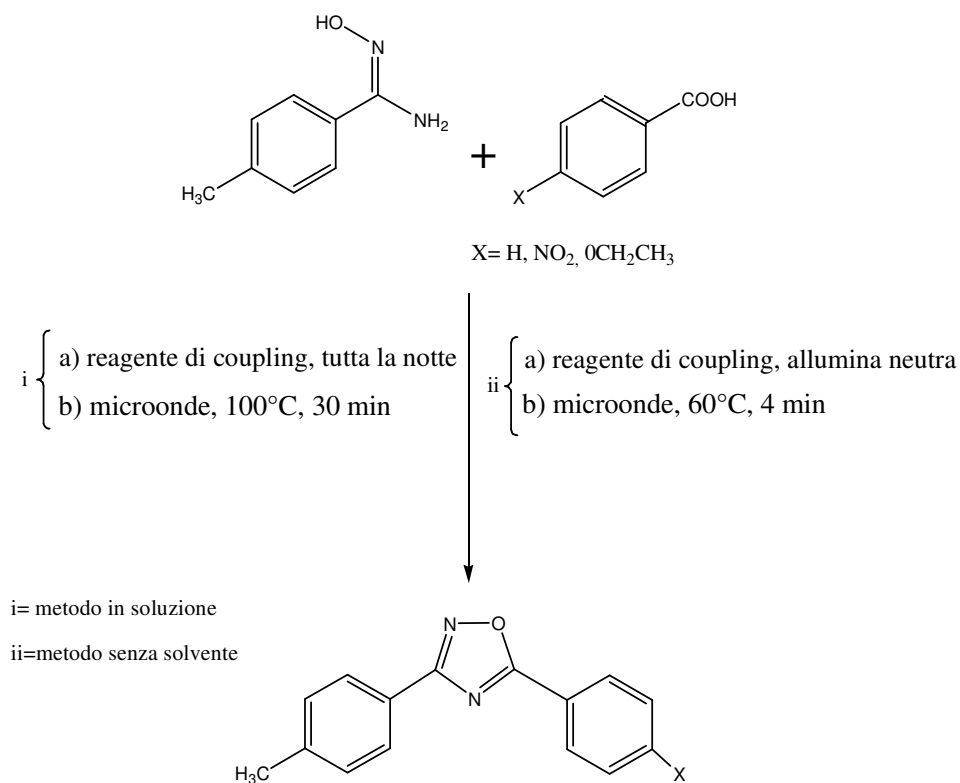
Schema 1

3.8 NUCLEO 1,2,4-OSSADIAZOLICO

Vista l'importanza del nucleo 1,2,4-ossadiazolico, il nostro obiettivo è stato il miglioramento della sua sintesi attraverso l'impiego del riscaldamento mediante microonde. La sintesi di tali derivati è stata condotta secondo lo Schema 16 usando un forno a microonde (ETHOS 1600 Milestone) specificamente progettato per la sintesi organica. Le reazioni sono state effettuate a pressione atmosferica in vetreria *Pyrex* standard con un condensatore a riflusso inserito in un foro presente nella parte superiore del reattore a microonde. La temperatura della miscela di reazione viene monitorata direttamente attraverso una sonda fluorottica virtualmente trasparente alle microonde inserita all'interno della soluzione.

Le condizioni sperimentali usate per il nostro lavoro sono analoghe a quelle usate con il riscaldamento tradizionale.

La sintesi mediante irradiazione a microonde ha dato i prodotti desiderati con rese più alte rispetto a quelle ottenute mediante riscaldamento tradizionale. I tempi necessari per le sintesi sono stati considerevolmente ridotti.



Schema 16 – Procedura generale di sintesi mediante microonde dei derivati 1,2,4-ossadiazolici.

La nostra attenzione è stata rivolta in prima istanza all'analisi della reazione di O-acilazione di una amidossima con alcuni acidi carbossilici presi come modello. Tale reazione è stata condotta in presenza di solvente, e mediata da alcuni tra i più comuni reagenti di "coupling". Successivamente è stata condotta ed ottimizzata la reazione di ciclizzazione.

Per la reazione di acilazione è stata utilizzata una temperatura iniziale di 50 °C quando EDC è stato scelto come reagente di *coupling*, in modo da consentire la sua solubilizzazione in diglyme (2-metossi- etiltere) o in DMF.

L'applicazione delle microonde consente una riduzione notevole dei tempi, facendo ridurre il tempo di reazione da 3 ore a 30 minuti. Anche se l'applicazione delle microonde veniva prolungata per oltre 30 minuti i reagenti non risultavano convertiti completamente nei corrispondenti derivati 1,2,4-ossadiazolici.

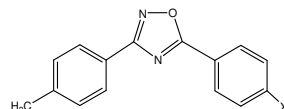
Le stesse reazioni sono state successivamente eseguite anche in assenza di solvente, utilizzando l'allumina neutra come supporto solido in grado di far avvenire la reazione; i tempi di reazione sono risultati notevolmente ridotti (4 minuti), mentre le rese sono state più basse rispetto al metodo a microonde in presenza di solvente, ad eccezione del composto **2** (Tabella 9); inoltre risultano simili o addirittura più elevate rispetto al metodo di riscaldamento convenzionale.

Viceversa, quando la reazione veniva eseguita senza aggiungere il supporto solido non si ottenevano i prodotti finali, pur prolungando il riscaldamento per oltre 30 minuti.

Dall'analisi dei risultati presenti in Tabella 9 si può valutare anche il contributo fornito dal reagente di *coupling*: nei composti **4-9**, utilizzando metodi di attivazione via TBTU/HOBt e DCC/HOBt, le rese ottenute sono state più elevate (68-94%). Al contrario DCC, EDC e CDI forniscono rese più basse.

I risultati ottenuti consentono, inoltre, anche di valutare l'effetto elettronico dei sostituenti, utilizzando derivati dell'acido benzoico variamente sostituito: i composti **8** e **9**, con sostituenti elettron-donatori (OEt) hanno fornito rese più basse (75-68%) rispetto ai derivati non sostituiti (**4,5**, 93-88%) o a derivati caratterizzati da sostituenti elettron-attrattori (NO₂, 94-91%). Tali effetti elettronici vengono confermati anche durante la procedura di sintesi senza solvente.

Tabella 9. Rese e condizioni di sintesi dei derivati 1,2,4-ossadiazolici sia mediante riscaldamento convenzionale che con irradiazioni a microonde.



Comp.	X	Reagente di coupling	Solvente ^c	Riscaldamento convenzionale ^b			Irradiazione a microonde ^d			Irradiazione a microonde senza solvente ^d			
				Temp. (°C)	Resa ^a (%)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Resa ^a (%)	Tempo (min.)	Supporto solido	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa ^a (%)
1	H	DCC	Diglyme	110	28	3	110	50	30	Allumina neutra	4	60	37
2	H	EDC	Diglyme	110	12	3	110	27	30	Allumina neutra	4	60	27
3	H	CDI	Diglyme	100	15	2	100	46	30	Allumina neutra	4	60	32
4	H	TBTU/HOBT	Diglyme	100	75	2	100	93	30	Allumina neutra	4	60	21
5	H	DCC/HOBT	Diglyme	100	68	2	100	88	30	Allumina neutra	4	60	55
6	NO ₂	TBTU/HOBT	Diglyme	100	91	2	100	94	30	Allumina neutra	4	60	31
7	NO ₂	DCC/HOBT	Diglyme	100	78	2	100	91	30	Allumina neutra	4	60	58
8	OEt	TBTU/HOBT	Diglyme	100	63	2	100	75	30	Allumina neutra	4	60	22
9	OEt	DCC/HOBT	Diglyme	100	52	2	100	68	30	Allumina neutra	4	60	46

^a Tutte le reazioni sono state eseguite 3 volte ed i tempi e le rese forniti corrispondono ai valori medi; ^b Bagno ad olio; ^c Tutte le reazioni sono state eseguite anche in DMF e le rese ottenute sono sovrapponibili; ^d La potenza utilizzata con il solvente è di 300 W, mentre è di 600 W negli esperimenti senza solvente.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Sintesi di H-Arg(Pbf)-NH-CH₂-C₆H₅ (intermedio a; schema 1)

La Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1 mmol), sciolta in DMF anidra (20 mL), è stata posta in un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola al CaCl₂ e posto in un bagno di ghiaccio; sono stati, quindi, aggiunti la DCC (1.1 mmol) e l'HOBt (1.1 mmol). Dopo 30 minuti è stata aggiunta la benzilammia (1 mmol). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte; poi la DCU è stata filtrata, il filtrato è stato concentrato sotto vuoto ed il residuo è stato disciolto in etile acetato. La fase organica è stata trattata con sodio bicarbonato al 5%, con acido citrico al 10%, con soluzione salina e poi anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata sotto vuoto per ottenere un residuo oleoso che è stato cristallizzato con etanolo/etere dietilico ottenendo l'intermedio desiderato come solido bianco (resa 74%). Il gruppo protettore Fmoc, del derivato protetto, è stato rimosso con DIEA in tetraidrofurano al 33% (THF, 10 ml) per 45 minuti a temperatura ambiente; la miscela di reazione è stata evaporata a pressione ridotta e il residuo è stato cristallizzato con etere etilico fornendo l'intermedio **a** (resa 84%).

4.2 Sintesi di H-X-Arg(Pbf)-NH-CH₂-C₆H₅ (intermedio b; schema 1)

In un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola al CaCl₂, sono stati posti la Fmoc-X-OH (1 mmol) sciolta in DMF anidro (30 mL), l'intermedio H-Arg(Pbf)-NH-CH₂-C₆H₅ (1 mmol), l'HBTU (1 mmol), l'HOBt (1 mmol) e la DIPEA (1.1 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente, poi il solvente è stato rimosso sotto vuoto ed il residuo è stato disciolto in acetato di etile, lavato con sodio bicarbonato al 5%, acido citrico al 10%, soluzione salina e poi anidrificato con Na₂SO₄ ed evaporato. L'intermedio desiderato è stato ottenuto mediante cristallizzazione con etere etilico. La rimozione del gruppo Fmoc con DIEA al 33% in THF (10 ml) per 45 minuti a

temperatura ambiente e successiva precipitazione con etere dietilico/*n*-esano, ha dato lo pseudopeptide **b** come solido bianco.

4.3 Sintesi di H-Arg(NO₂)-Leu-NH₂ (intermedio c; schema 2)

In un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola a CaCl₂, sono stati posti la Boc-Arg(NO₂)-OH (1 mmol), l'H-Leu-NH₂ (1 mmol), l'HOBt (1 mmol), il TBTU (1 mmol) e la DIPEA (1.1 mmol) in DMF (30 mL). La miscela di reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente, poi il solvente è stato rimosso sotto vuoto ed il residuo è stato disciolto in acetato di etile, lavato con sodio bicarbonato al 5%, acido citrico al 10%, soluzione salina e poi anidrificato con Na₂SO₄ ed evaporato. L'intermedio desiderato è stato ottenuto mediante cristallizzazione con etere etilico (resa 70%). La rimozione del gruppo Boc con TFA al 25% in DCM (10 ml) per 45 minuti a temperatura ambiente e successiva precipitazione da etere dietilico ha dato lo pseudopeptide **c** come solido bianco (resa 93%).

4.4 Sintesi di Z-Benzil-2-Y-6-nitro-indolo (intermedio d; schema 3)

In un pallone a due colli da 100 mL, collegato ad un refrigerante a ricadere, è stato posto il 2-Y-6-nitroindolo (1 mmol) disciolto in DMF (15 mL); è stato aggiunto, quindi, il carbonato di cesio (1 mmol) e l'opportuno benzilbromuro sostituito (1 mmol). La soluzione è stata tenuta sotto agitazione e.m. a 60°C ; dopo 1 ora la miscela di reazione è stata raffreddata, il solido è stato filtrato ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. La precipitazione con *n*-esano ha fornito l'intermedio desiderato come solido giallo (rese comprese tra 86% e 90%).

4.5 Sintesi del 4-nitro-fenilestere dell'acido Z-Benzil-6-indolil-carbammico (intermedio f; schema 3)

L'intermedio **d** (1 mmol) è stato ridotto mediante idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C in etanolo (20 mL). Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata filtrata e il solvente è stato rimosso sotto vuoto. La precipitazione con *n*-esano ha fornito l'intermedio **e**. Il derivato amminoindolico **3** (1 mmol), così ottenuto, sciolto in DCM anidro (20 mL), è stato posto in un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola al CaCl₂; la soluzione è stata immersa in un bagno refrigerato a -20 °C e vi si sono aggiunti il *p*-nitrofenilcloroformiato (1 mmol) e la NMM (1 mmol). Dopo 30 minuti la miscela di reazione è stata lavata con acqua e la fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata, ottenendo l'intermedio **f**.

4.6 Sintesi del 2-metil-3-pirrolidinil metil indolo (intermedio m, schema 6)

Ad una soluzione di 2-metil-indolo-3-carbossialdeide (1 mmol) e pirrolidina (1.1 mmol) in dicloroetano (200 mL), è stata aggiunta una miscela di NaBH₄ (6 mmol) ed acido acetico glaciale (9 mL). La soluzione è stata tenuta sotto agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente sotto corrente di azoto. Successivamente la miscela di reazione è stata estratta con NaOH 1N, la fase organica è stata distillata ed il residuo solido è stato purificato su colonna di gel di silice, usando una miscela eluente costituita da dietil etere/ etanolo/ ammoniaca (80/20/2,5). La successiva cristallizzazione da etere/esano ha dato il prodotto finale **m** puro (resa 59%).

4.7 Sintesi del 2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo (intermedio n, schema 6)

Ad una soluzione di 2-metil-3-pirrolidinil metil indolo (**m**; 1 mmol) in CH₃CN (200 ml), è stato aggiunto lentamente il nitronio tetrafluoroborato (1.1 mmol) a 0°C. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione e.m. a 0°C per 1 ora. In seguito è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di NH₄OH per alcalinizzare la soluzione fino a pH 8. La soluzione acquosa risultante è stata estratta con CHCl₃, la fase organica è stata anidrificata e portata a secco. La cristallizzazione da etere etilico ha fornito il prodotto **n** puro (resa 53%).

4.8 Sintesi di 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo (intermedio o; schema 6)

Ad una soluzione di 2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo (**n**, 1 mmol) in DMF (150 mL) è stato aggiunto il carbonato di cesio (1 mmol) ed il 2,6-diclorobenzilbromuro (1 mmol). La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione e. m. a 60°C per 1 ora; in seguito è stata raffreddata ed il precipitato solido è stato filtrato. Il filtrato è stato distillato sotto vuoto. La cristallizzazione da etere etilico ha fornito il prodotto desiderato **o** (resa 62%).

4.9 Sintesi di 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-3-pirrolidinil metil-1H-indol-5-il amina (intermedio p; schema 6)

Ad una sospensione di NaBH₄ (2mmol) e Pd/C (100 mg) in MeOH (100 mL), è stata aggiunta una soluzione di 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo (**o**; 1 mmol), in THF (300 mL).

Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata filtrata, il solvente è stato evaporato sotto vuoto ed il residuo è stato sciolto in CHCl₃ e lavato con

acqua dist. La fase organica è stata anidrificata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo è stato purificato su colonna di gel di silice, usando una miscela di etil acetato/esano (60/40) e cristallizzato da etere etilico (resa 68%).

4.10 Sintesi del 4-nitro-fenil estere dell'acido [1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-3-pirrolidinil metil-1H-indol-5-il]-carbammico (intermedio q; schema 6)

L'intermedio **p**, 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-3-pirrolidinil metil-1H-indol-5-il amina, (1 mmol) è stato sciolto in CH₂Cl₂ (200 mL). La miscela è stata raffreddata a -20°C e sono state aggiunte la N-metil morfolina (1,1 mmol) ed il 4-nitrofenilcloroformiato (1.1 mmol). Dopo 30 minuti la miscela di reazione è stata estratta con acqua, la fase organica è stata evaporata sotto vuoto ed è stato ottenuto il composto desiderato **q**, come solido giallo (resa 71%).

4.11 Sintesi dei derivati indolici ureidici (schemi 4, 5 e 6)

In un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola al CaCl₂, è stato posto l'intermedio 4-NO₂-fenil estere, sciolto in acetonitrile (15 mL); sono stati aggiunti l'intermedio peptidico (1 mmol, sintetizzato mediante una delle procedure precedentemente descritte) e la DMAP (1 mmol). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore.

Il derivato ureidico solido è stato precipitato, filtrato e lasciato ad asciugare all'aria.

4.12 Sintesi dei prodotti finali a nucleo indolico

Il derivato indolico-ureidico (1 mmol) è stato posto in un pallone a due colli da 100 mL, munito di refrigerante a ricadere ed è stato trattato

con una soluzione di pirrolidina (2.5 mmol) e formaldeide (2.5 mmol) in acido acetico glaciale (5 mL). La miscela di reazione è stata agitata per 24 ore a 60 °C.

La soluzione è stata, quindi, raffreddata e portata a pH 12 usando KOH 2N; il precipitato solido, così ottenuto, è stato filtrato ed asciugato sotto vuoto, sono stati così ottenuti i prodotti finali protetti. La rimozione del gruppo Pbf con TFA (2 mL) per 4 ore a temperatura ambiente, seguita dalla precipitazione con etere etilico, ha dato i prodotti finali deprotetti.

4.13 Sintesi di N-(2-Benzoil-4-nitro-fenil)-2-cloro-acetamide (intermedio r; schema 7)

In un pallone a due colli, munito di trappola a CaCl₂, è stato posto il (2-amino-5-nitro-fenil)-fenil-metanone (1 mmol) disciolto in cicloesano (30 mL). La soluzione è stata raffreddata a -10 °C. Successivamente alla miscela di reazione è stato aggiunto il cloroacetilcloruro (1.1 mmol). La soluzione così ottenuta è stata tenuta sotto agitazione per 3 ore e successivamente portata a temperatura ambiente. Il solvente è stato allontanato sotto vuoto; il residuo solido è stato poi cristallizzato da esano/diclorometano (resa 98%).

4.14 Sintesi di N-(4-Amino-2-benzoil-fenil)-2-cloro-acetamide (intermedio s; schema 7)

Il derivato N-(2-benzoil-4-nitro-fenil)-2-cloro-acetamide (1 mmol) è stato ridotto mediante idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C in metanolo/THF/diossano (100/25/15 mL). Dopo 2 ore la miscela di reazione è stata filtrata ed il solvente è stato rimosso sotto vuoto. La cristallizzazione da etere etilico/metanolo ha fornito l'intermedio s (resa 61%).

4.15 Sintesi di 7-amino-5-fenil-1,3-diidro-benzo-[e][1,4]-diazepin-2-one (intermedio t; schema 7)

Il derivato N-(4-amino-2-benzoil-fenil)-2-cloro-acetamide (1 mmol), sciolto in metanolo (100 mL), è stato ciclizzato facendo gorgogliare NH_3 gassosa nella soluzione per 1 ora a 0°C e poi per 3 ore a riflusso. Il solvente è stato successivamente rimosso ed il residuo, sciolto in acetato di etile, è stato lavato con acqua. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e poi evaporata sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, usando come eluente la miscela etile acetato/etere di petrolio (8/2) (resa 48%).

4.16 Sintesi del 4-nitrofenilestere dell'acido 2-oxo-5-fenil-2,3-diidro-1H-benzo[e][1,4]-diazepin-7-il-carbammico (intermedio u; schema 7)

In un pallone a due colli munito di trappola al CaCl_2 , è stato posto il 7-amino-5-fenil-1,3-diidro-benzo-[e][1,4]-diazepin-2-one (1 mmol), sciolto in diclorometano (100 mL) e la soluzione è stata raffreddata a -20°C . Sono stati quindi aggiunti prima il 4-nitrofenilcloroformiato (1 mmol) e successivamente anche la NMM (1 mmol). Dopo 30 minuti la miscela di reazione è stata lavata con H_2O ; la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e poi evaporata. L'intermedio **u** puro è stato ottenuto mediante cristallizzazione da etile acetato/etere di petrolio (8/2) (resa 48%).

4.17 Sintesi di clorometilen-pirrolidina (schema 10)

In un pallone a due colli da 100 mL, munito di trappola al CaCl_2 , è stata posta la bis-metilen pirrolidina (1mmol) in C_6H_6 anidro (50 mL) a 0°C . Successivamente è stato aggiunto il cloruro di tionile e la reazione è

stata tenuta sotto agitazione per 2 ore. Trascorse le due ore di reazione, il solvente è stato evaporato ed il prodotto è stato impiegato per la reazione successiva senza ulteriori purificazioni (resa 68%).

4.18 Sintesi dei prodotti finali TECA 32-47 a nucleo benzodiazepinico (schema 8 e 9).

In un pallone a due colli munito di trappola al CaCl_2 , è stato posto il 4-nitrofenilestere dell'acido 2-oxo-5-fenil-2,3-diidro-1H-benzo[e][1,4]-diazepin-7-il-carbammico (**u**; 1 mmol), sciolto in acetonitrile (15 mL); sono stati aggiunti l'intermedio **b** (1 mmol) e la DMAP (1 mmol). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore. Il prodotto finale solido è stato precipitato, filtrato e lasciato asciugare all'aria. Un'aliquota di questo pseudopeptide è stata purificata mediante RP-HPLC per ottenere i prodotti finali protetti puri.

I prodotti a nucleo benzodiazepinico che presentano il sostituito metilpirrolidinico sono stati ottenuti condensando i corrispondenti prodotti finali protetti (1 mmol), sciolti in THF (100 mL), con la clorometil pirrolidina (1 mmol) in presenza di una sospensione di NaH al 60 % in olio minerale (1.1 mmol). La reazione è stata tenuta sotto agitazione e.m. a ricadere per 24 ore. Il prodotto finale solido è stato cristallizzato da etere etilico e purificato mediante RP-HPLC.

I prodotti finali con il gruppo guanidinico libero sono stati ottenuti trattando un'aliquota dei corrispondenti prodotti protetti con TFA (2 mL), in un pallone ad 1 collo munito di trappola al CaCl_2 . La miscela di reazione è stata tenuta per 4 ore a temperatura ambiente sotto agitazione. Successivamente i prodotti sono stati cristallizzati da etere etilico.

4.19 Sintesi parallela di una libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti

Utilizzando un carosello “multiPREP” (Milestone®) con 36 provette di reazione, la glicina metil estere cloridrato (2.39 mmol) e l'aldeide appropriata (2.39 mmol; Figura 13) sono state aggiunte ad ogni provetta di reazione e disciolte in alcol metilico. È stata aggiunta poi una quantità equimolare di trietilammina e le provette sono state sigillate. Le reazioni sono state riscaldate in un forno a microonde Milestone® alla temperatura di 45 °C usando 300W di potenza per 5 minuti. Dopo 1 minuto di ventilazione, le provette sono state aperte, ed è stato aggiunto un eccesso di NaBH₃CN (4.78 mmol) ad ogni miscela di reazione; a questo punto è stato eseguito un nuovo *step* di riscaldamento a microonde alla temperatura di 45 °C usando 300W di potenza per 10 minuti. Per ogni reazione il solvente è stato allontanato mediante distillazione a pressione ridotta e la miscela grezza è stata ripresa con etile acetato.

Ogni fase organica è stata trasferita in un imbuto separatore e sottoposta ad un'estrazione con una soluzione acquosa al 10% di acido citrico. La fase acquosa è stata alcalinizzata completamente con NaOH 1N per le N-alchil glicine dei composti **TECA 48 e TECA 49** e **TECA 53- 57** e contro-estratta con diclorometano. Per le aldeidi caratterizzate da un sostituito fenolico (aldeidi dei composti **TECA 50-52**) le estrazioni sono state evitate. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco. Le miscele di reazione sono state purificate mediante cromatografia su colonna di gel di silice, per ottenere i composti puri.

4.20 Sintesi non parallela di una libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti

La glicina metil estere cloridrato (23.9 mmol) e le 10 aldeidi (2.39 mmol ognuno) sono state disciolte con alcol metilico in un pallone a due colli. È stata aggiunta una quantità equimolare di trietilammina (23.9 mmol) e la reazione è stata poi trasferita nel reattore di un forno a microonde Milestone®. La reazione è stata riscaldata sotto agitazione elettromagnetica per 5 minuti alla temperatura di 45°C usando 300W di potenza. Dopo 1 minuto di ventilazione, è stato aggiunto un eccesso di NaBH₃CN (47.8 mmol) e la miscela è stata riscaldata ulteriormente per 20 minuti, nelle stesse condizioni. Dopo il riscaldamento, il solvente è stato allontanato mediante distillazione a pressione ridotta e la miscela è stata estratta successivamente con una soluzione satura di NaCl, in modo da rimuovere l'eccesso di NaBH₃CN. La miscela grezza è stata anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed il solvente è stato allontanato mediante un rotavapor Buchi R-114 a pressione ridotta. La purificazione mediante RP-HPLC preparativo ci ha consentito di ottenere i composti puri.

4.21 Sintesi di H-5-GTIC-OH (schema 12)

La procedura sintetica prevede l'utilizzo dell'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic, **a**), disponibile in commercio, che viene trattato con nitronio tetrafluoroborato in acetonitrile per ottenere la miscela dei due regioisomeri 5 e 7-nitroTic-OH (**b**). La posizione del gruppo nitro è stata stabilita usando metodiche NMR. La miscela dei due regioisomeri è stata fatta reagire con cloroformiato di benzile in presenza di NaHCO₃ e la miscela così ottenuta, protetta sulla funzione amminica, è stata esterificata per trattamento con CH₃I e

K_2CO_3 . Il derivato Z-5-nitro-Tic-OMe (**c**) è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice.

L'idrogenazione catalitica consente di rimuovere il gruppo Z e, contemporaneamente, riduce il gruppo nitro ad ammina (**d**). La successiva Fmoc-protezione del gruppo α -amminico di 5-amminoTic-OMe (**d**), è ottenuta mediante trattamento con Fmoc-OSu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed irraggiamento a microonde. Il gruppo amminico viene convertito nella corrispondente struttura guanidinica (**f**) mediante reazione con la N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, $HgCl_2$ e TEA in DMF a 40 °C per 20 minuti mediante irraggiamento a microonde. La successiva idrolisi con NaOH 1N fornisce il derivato Fmoc-5-GTIC-OH (**g**).

4.22 Sintesi di H-6 e 7-GTIC-OH (schema 13)

La procedura sintetica prevede l'utilizzo dell'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic, **a**), disponibile in commercio, che viene trattato con HNO_3 fumante e H_2SO_4 concentrato a -10 °C per ottenere la miscela dei due regioisomeri 6 e 7-nitro-Tic-OH. La nitratura diretta, molto regioselettiva, dà l'isomero 7-nitro-Tic con una resa di circa il 90%.

La posizione del gruppo nitro è stata stabilita usando metodiche NMR. La miscela, così ottenuta, è stata esterificata per trattamento con CH_3OH e H_2SO_4 concentrato fornendo i due derivati metilesteri (**c**) che sono stati separati mediante cromatografia su colonna di gel di silice.

La riduzione dei nitrocomposti ad ammine (**d**) è semplice (resa 98%), sebbene il prodotto finale debba essere protetto dall'aria per evitare l'ossidazione. La successiva Fmoc-protezione del gruppo α -amminico di 6 e 7-amminoTic-OMe (**e**), è ottenuta mediante trattamento con Fmoc-OSu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed

irraggiamento mediante microonde. In queste condizioni, il gruppo amminico sull'anello non reagisce. La resa di questa procedura è, però, modesta (60% circa), presumibilmente per la competizione tra la reazione di protezione e lo sblocco del gruppo Fmoc causato dall'ammina secondaria seguito dall'intrappolamento dell'ammina ad opera del dibenzofulvene. Il gruppo amminico viene convertito nella corrispondente struttura guanidinica (**f**) mediante reazione con la N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, HgCl₂ e TEA in DMF a 40 °C per 20 minuti mediante irraggiamento a microonde. La successiva idrolisi con NaOH 1N fornisce i derivati Fmoc-6 e 7-GTIC-OH (**g**).

4.23 Sintesi di H-GTIC-OH (schema 14)

La procedura di sintesi parte dall'estere metilico dell'acido 7-nitro-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-3-carbossilico (**a**). Il suddetto acido è stato protetto sull'azoto isochinolinico mediante acetilazione eseguita con acetato di sodio e anidride acetica (**b**).

La riduzione del nitro gruppo ad ammina (**c**) è stata eseguita con H₂ e C/Pd (resa del 95%), seguita da protezione dell'N con anidride trifluoroacetica (TFAA) in acido trifluoroacetico mediante microonde per un minuto (resa dell'85%). Su questo intermedio (**d**) è stata applicata una nitratura non convenzionale con NO₂⁺BF₄⁻ in sulfolane (l'ambiente anidro è stato necessario per evitare l'idrolisi parziale dell'estere metilico).

L'idrolisi seguente della trifluoroacetamide fornisce la miscela dei composti 8- e 6-NO₂ (**f**₁ e **f**₂) che sono stati separati con colonna cromatografia su gel di silice (schema 3; resa del 25% per l'isomero 8 e del 32% per l'isomero 6). La deaminazione dei corrispondenti diazocomposti con l'acido ipofosforoso seguita dall'idrolisi

dell'acetamide fornisce il derivato estere metilico dell'acido 8-nitro-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (**h**) desiderato.

La riduzione dell'nitrocomposto ad amina (**i**) è stata portata avanti tramite idrogenazione catalitica con carbone palladiato al 10% (resa del 98%). Successivamente, la protezione con Fmoc del gruppo α -aminico dell'8-amino-Tic-OCH₃ (**l**), è stata introdotta tramite trattamento con Fmoc-Osu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed irraggiamento mediante microonde.

In queste condizioni, il gruppo aminico presente sull'anello non ha reagito. La resa di questa procedura è stata modesta, presumibilmente a causa della competizione tra la protezione della reazione e la rottura del gruppo Fmoc sull'amina secondaria seguita dalla cattura dell'amina ad opera di benzofulvene.

Il gruppo aminico è stato convertito nel corrispondente gruppo guanidinico (**m**) tramite la reazione con N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, HgCl₂ e TEA in DMF a 40 °C per 20 minuti mediante irraggiamento a microonde.

L'idrolisi dell'estere metilico con NaOH 1N produce il composto finale (**n**) che è stato purificato con cromatografia su gel di silice usando una miscela etere dietilico/esano come eluente (resa del 58%).

4.24 Sintesi degli N,O-dimetilidrossammati (intermedio **a; schema 15)**

Ad una soluzione in DMF di 1 equivalente di aminoacido N-protetto (Fmoc-aa₁-OH), vengono aggiunti 1,1 equiv. di DCC ed 1,5 equiv. di DIEA e di N,O-dimetilidrossilammina cloridrato. La reazione viene agitata a temperatura ambiente oppure riscaldata mediante riscaldamento convenzionale o irraggiamento a microonde, secondo quanto descritto in

Tabella 7. Il solvente viene evaporato e la miscela grezza ripresa in acetato di etile e successivamente lavata (tre volte) con soluzioni di acido citrico al 10%, bicarbonato di sodio al 5% ed una soluzione satura di NaCl. La purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice ha fornito gli N,O-dimetilidrossammati come solidi di colore bianco.

4.25 Sintesi delle N-Fmoc-amminoaldeidi (intermedio b; schema 15)

Una soluzione di LiAlH_4 (5 equiv.) in THF anidro viene agitata a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e l’N,O-dimetilidrossammato viene aggiunto goccia a goccia. La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 1 ora e successivamente una soluzione acquosa di KHSO_4 (6 equiv.) è stata aggiunta, seguita da 50 ml di etere di etilico. La fase organica è stata separata ed estratta con HCl 1 M, NaHCO_3 al 5% ed una soluzione acquosa satura di NaCl. Infine, si ottengono le amminoaldeidi protette, come olii da utilizzare senza sottoporre ad ulteriori metodiche di purificazione.

4.26 Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico (prodotto c; schema 15)

L’aldeide (1 equiv.) viene disciolta in una miscela di $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ in rapporto 99:1 e l’aminoacido protetto sulla funzione carbossilica viene aggiunto goccia a goccia ($\text{H-aa}_2\text{-OCH}_3$, 1 equiv.). La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 10 minuti e a questo punto viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaBH_3CN (4 equiv.). La reazione viene agitata a temperatura ambiente oppure riscaldata mediante riscaldamento convenzionale o irraggiamento a microonde. La reazione è stata poi raffreddata in un bagno di ghiaccio ed addizionata con 30 ml di una soluzione di NaHCO_3 al 5% e 40 ml di etere di etilico. La fase organica raccolta viene lavata con acido citrico al

10% per tre volte; la fase acquosa acida è stata alcalinizzata completamente con KOH 3 M e riestratta con acetato di etile.

Sono stati ottenuti così i composti finali, come olii di colore giallo, senza necessità di doverli sottoporre ad ulteriori metodiche di purificazione.

4.27 Sintesi dei derivati ossadiazolici in soluzione

1 mmole di p-toluen-amidossima ed 1 equivalente di acido carbossilico vengono disciolti in 10 ml di solvente (diglyme o DMF) in presenza del reagente di coupling (1 equiv.). Un'opportuna quantità di base (N-etil-diisopropilammina) è stata aggiunta quando si è scelta l'attivazione via TBTU/HOBt. La miscela di reazione viene tenuta a temperatura ambiente, sotto atmosfera di azoto, per tutta la notte. A questo punto la reazione viene trasferita nel reattore di un forno a microonde (ETHOS 1600 Millestone) e viene riscaldata a 100 °C tramite l'applicazione di irraggiamento a microonde per 30 minuti. Dopo l'irradiazione il solvente viene evaporato e la miscela viene purificata attraverso una colonna cromatografica su gel di silice per dare il composto finale come un solido di colore bianco.

4.28 Sintesi dei derivati ossadiazolici senza solvente

La p-toluen-amidossima (1 mmol), l'acido benzoico sostituito (1 equiv.) ed i reagenti di coupling (1 equiv.) vengono mescolati finemente in un mortaio con l'allumina neutra in un rapporto ponderale di 1:4. La miscela viene mescolata per 5 minuti; a questo punto, per avere un mescolamento completo delle polveri, viene aggiunto del diclorometano in quantità sufficiente per solubilizzare i reagenti e viene successivamente allontanato per evaporazione. La miscela di reazione viene sottoposta ad irraggiamento mediante microonde per 4 minuti. Il

solido viene estratto con diclorometano e la miscela di reazione viene sottoposta a purificazione mediante colonna cromatografica su gel di silice per dare i derivati finali come prodotti puri.

4.29 Sintesi dei derivati pseudopeptidici a 6 termini analoghi del PAR-1AP, caratterizzati dalla sostituzione dei residui aminoacidici con aminoacidi non convenzionali (TECA 48-67)

Il peptide PAR-1AP (H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-NH₂) ed i suoi analoghi pseudopeptidici sono stati sintetizzati mediante sintesi peptidica in fase solida a flusso continuo usando un sintetizzatore *Milligen 9050 Peptide Synthesizer*.

La prima operazione ha coinciso con la programmazione per mezzo di un opportuno *software* dell'intero processo sintetico, caratterizzato dall'alternanza di fasi di sblocco del gruppo Fmoc e fasi di accoppiamento tra la sequenza peptidica legata alla resina e i Fmoc-aminoacidi. E' stata impiegata una resina Rink Amide MBHA (grado di sostituzione 0.49 mmol/g). Tale resina richiede una fase preliminare di sblocco che viene condotta usando una soluzione al 20% di piperidina in DMF; in tal modo viene deprotetto il gruppo amminico che può, quindi, essere acilato dal primo aminoacido della sequenza.

L'ancoraggio del primo aminoacido alla resina è stato condotto impiegando come agenti attivanti TBTU/HOBt e usando una quantità catalitica di DMAP. Per tutti gli aminoacidi è stato impiegato un eccesso di quattro volte rispetto al grado di sostituzione della resina. Tutte le fasi della sintesi sono state seguite mediante due *detectors* UV posti all'ingresso e all'uscita della colonna e che sono regolati ad una λ di 365 nm, tale da registrare il passaggio di aminoacidi protetti nella funzione amminica dal gruppo Fmoc o del fluorene a seguito dello sblocco del

Fmoc con piperidina in DMF.

Nel corso della suddetta sintesi sono stati utilizzati i seguenti aminoacidi: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH e Fmoc-Asn(Mbh)-OH. Nel corso della sintesi è stato talvolta necessario effettuare reazioni di doppio “coupling” al fine di ottenere una acilazione quantitativa per tutti gli aminoacidi.

Concluso il ciclo di accoppiamento si è passati alla rimozione del peptide dalla resina con il contemporaneo allontanamento di tutti i gruppi protettori in catena laterale. Questa operazione è stata realizzata usando una miscela costituita dal 90% di TFA, dal 7% di trietilsilano e dal 3% di H₂O.

4.30 Procedura generale di rimozione dalla resina degli pseudopeptidi analoghi del PAR-1AP

La resina, posta in un pallone ad un collo da 100 mL, è stata trattata con una miscela di TFA/Trietilsilano/H₂O (90/7/3 v/v) (5 mL) e lasciata sotto agitazione meccanica per due ore a temperatura ambiente. La miscela è stata, quindi, filtrata sotto vuoto e la resina è stata lavata più volte con metanolo. Il filtrato è stato portato a secco e il residuo è stato precipitato con etere. Il prodotto finale è stato recuperato per filtrazione o per centrifugazione. Tutti i prodotti grezzi sono stati liofilizzati e, quindi, purificati mediante RP-HPLC preparativo impiegando il seguente gradiente di eluizione:

	0.1% TFA in CH ₃ CN	0.1% TFA in H ₂ O
0 min	0	100%
25 min	50%	50%
30 min	0	100%

4.31 Purificazione e caratterizzazione dei composti peptidomimetici antagonisti del recettore PAR-1

Tutte le reazioni sono state monitorate mediante TLC con lastre di gel di silice preconfezionate (F 254, Merck) usando i seguenti sistemi eluenti:

- a) etere/n-esano (8:2)
- b) diclorometano/metanolo (9:1)

Le macchie corrispondenti ai prodotti ed ai reagenti sono state identificate mediante UV e, se opportuno, spruzzando successivamente le lastre con una soluzione di ninidrina oppure con una soluzione all'1% di amido e 1% di KI (1:1).

I peptidi finali e alcuni intermedi di sintesi sono stati purificati mediante RP-HPLC utilizzando un sistema Waters DeltaPrep 4000 equipaggiato di valvola di iniezione del tipo Rheodyne e rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, Waters 484, posto a 220 nm o, quando possibile, a 254 nm ed impiegando una colonna Vydac C18, 218TP152050.

La purificazione è stata condotta con un flusso di 60 ml/min usando i seguenti sistemi eluenti: solvente A (0.1 % TFA in CH₃CN) e solvente B (0.1% TFA in H₂O). Gli eluenti sono stati filtrati mediante filtri tipo HVLP (Millipore 0,45 µm) e degasati con elio prima dell'uso.

Per tutti i prodotti è stato impiegato il seguente gradiente di eluizione:

	0.1% TFA in CH ₃ CN	0.1% TFA in H ₂ O
0 min	0	100%
25 min	70%	30%
30 min	0	100%

L'omogeneità ed i tempi di ritenzione dei composti purificati sono stati determinati mediante un sistema analitico a fase inversa RP-HPLC con una colonna Vydac C18, 218TP154. Dopo purificazione in HPLC, la purezza del peptide è risultata sempre maggiore del 98%.

Sia gli intermedi sia i prodotti finali sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa impiegando un apparecchio LCQ Ion-Trap MS e poi completata mediante analisi NMR protonica.

5. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA

I composti peptidomimetici, antagonisti del recettore PAR-1, sono stati sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

In prima analisi sono stati effettuati saggi *in vitro* al fine di valutare la loro capacità di inibire la contrazione dell'anello aortico di ratto privato dell'endotelio, indotta dal PAR-1AP.

I prodotti peptidomimetici, analoghi vincolati del PAR-1AP, sono attualmente in fase di sperimentazione.

5.1 CONTRAZIONE DELL'ANELLO DI AORTA DI RATTO

Sono stati sacrificati ratti maschi Wistar (300-310 g) ed è stata loro rapidamente rimossa l'aorta toracica. Gli anelli dell'aorta toracica, di circa 3 mm di ampiezza e 2 mm di diametro, sono stati usati per fare dei saggi. L'endotelio degli anelli aortici è stato rimosso meccanicamente sfregando con della carta da filtro bagnata.

Gli anelli aortici sono stati poi immersi in un bagno organico contenente 2 ml di soluzione di Krebs della seguente composizione (millimolare): NaCl 120, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 0.6, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.8 e glucosio 11.5 in acqua distillata.

E' stata applicata all'anello una tensione a riposo di 0.5 g e le risposte di contrazione sono state isometricamente registrate attraverso trasduttori connessi ad un registratore (Graphtec, Japan).

I tessuti sono stati indotti alla contrazione aggiungendo una dose cumulativa di SFLLRN, un agonista PAR-1 (PAR-1AP), con un range da 10⁻⁷ a 10⁻⁴ M in presenza o in assenza dell'antagonista (10⁻⁷-10⁻⁴ M).

5.2 INIBIZIONE DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA

Un campione di plasma ricco di piastrine è stato filtrato su gel (Sepharose 2B) usando un tampone Tyrode (140 mM, NaCl/2.7 mM/KCl/12 mM NaHCO₃/0.76 mM Na₂HPO₄/5.5 mM destrosio/5.0 mM Hepes/2 mg/ml BSA, pH 7.4).

Le piastrine filtrate sono state eluite con il tampone Tyrode (143.000 piastrine per µl) e poste in una piastra con l'aggiunta di 2 mM di CaCl₂. L'aggregazione piastrinica è stata indotta con l'aggiunta dell'agonista per ottenere l'80% dell'aggregazione. La piastra utilizzata per il saggio è stata agitata leggermente e costantemente.

L'aggregazione è stata monitorata a 0 e 5 minuti, dopo l'aggiunta dell'agonista, con un lettore per micropiastre con densità ottica a 650 nm (DSOFT). L'aggregazione è stata calcolata come decremento della densità ottica tra le due misurazioni.

**6. RISULTATI
E
DISCUSSIONE**

Tutti i composti sintetizzati sono stati saggiati al fine di valutarne la capacità di inibire la contrazione degli anelli di aorta di ratto indotta dal PAR-1AP ed alcuni di essi hanno mostrato una notevole attività antagonista nei confronti del recettore PAR-1.

6.1 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 1-4

Per quanto riguarda la serie **TECA 1-4**, i composti **TECA 2** e **TECA 3** (Tabella 2) hanno dato i migliori risultati farmacologici, infatti inibiscono la contrazione dell'anello di aorta di ratto ad una concentrazione di 10^{-4} M e $2,6 \cdot 10^{-6}$ M, rispettivamente. Questi risultati preliminari hanno evidenziato che il gruppo benzilico 2,6-dicloro sostituito, presente nel composto **TECA 3**, contribuisce notevolmente alla sovrapposizione π - π con la controparte recettoriale.

6.2 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 5-19

I composti **TECA 13** e **TECA 17**, risultati i più attivi della serie **TECA 5-19** (Tabella 3), hanno mostrato il profilo farmacologico riportato in Figura 14:

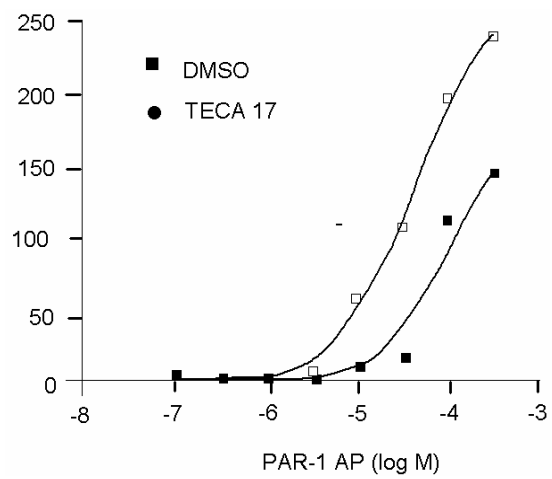
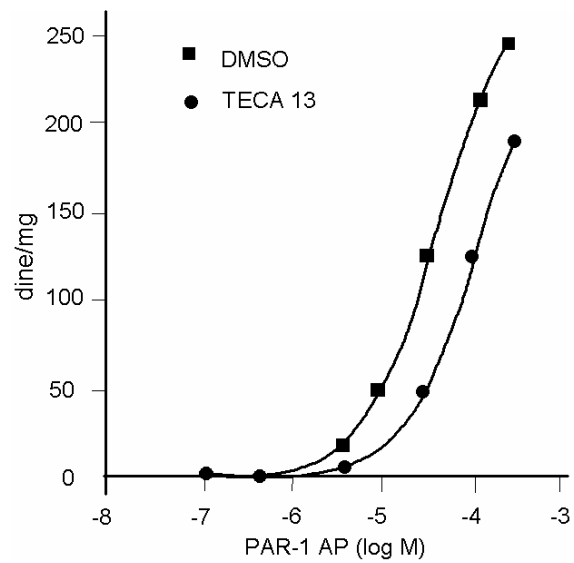


Figura 14 – Curve concentrazione-risposta relative ai composti più attivi della serie **TECA 5-19**.

A tale proposito è importante sottolineare che il composto **TECA 17** presenta un gruppo benzilico 2,6-dicloro sostituito, esattamente lo stesso gruppo presente anche nel composto **TECA 3**, il più attivo della serie **TECA 1-4**.

6.3 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 20-47

Ottimi risultati sono stati ottenuti con i composti a nucleo indolico della serie **TECA 20-31** (Tabella 4): l'antagonista **TECA 25** ha mostrato un pA_2 di 5.58 corrispondente a 2.6×10^{-6} M come calcolato usando un sistema statistico computerizzato (PCS). Nello stesso saggio il composto **TECA 23**, inibito il PAR-1AP, induce contrazioni solo alla dose di 10^{-4} M corrispondente ad un valore di pA_2 di 4.

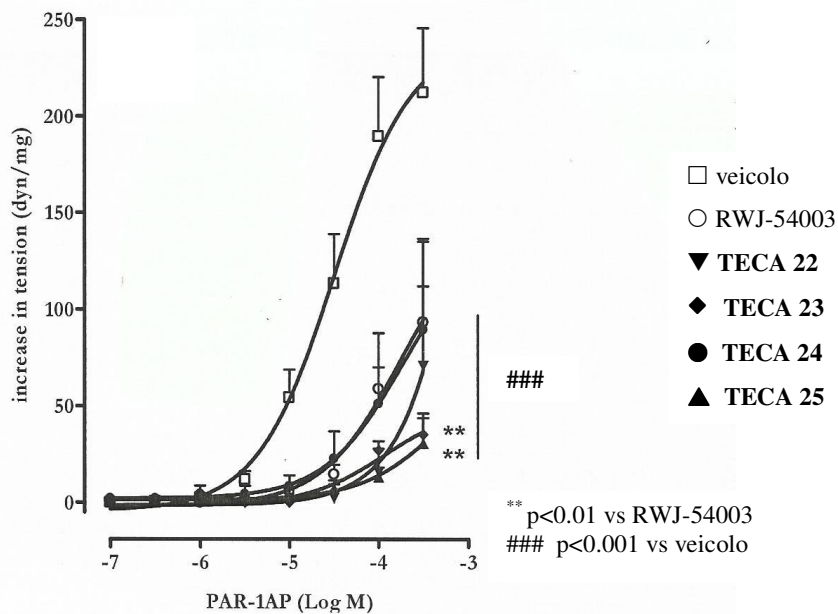


Figura 9 – Curve concentrazione-risposta relative ai composti più attivi della serie indolica **TECA 20-31**.

La Figura 10 riassume le percentuali di inibizione della contrazione dell'anello dell'aorta indotta dal PAR-1AP relative alla serie completa **TECA 20-47** e al composto di riferimento RWJ-54003.

Gran parte dei prodotti hanno mostrato attività antagonista nei confronti del recettore PAR-1.

E' importante sottolineare che i prodotti che non compaiono nel diagramma di Figura 10 hanno mostrato un'attività agonista piuttosto che antagonista, dimostrando che l'introduzione di piccole varianti nella struttura generale può essere determinante ai fini dell'attività.

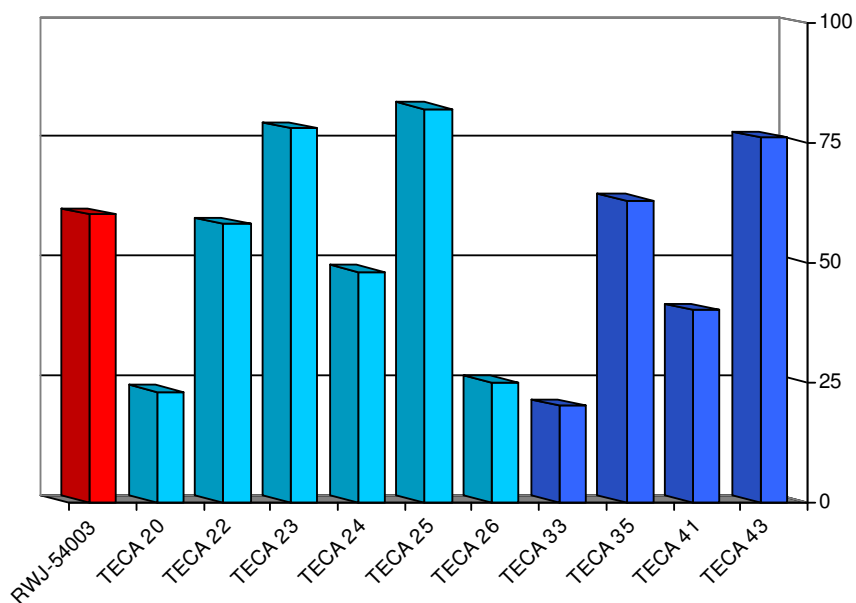


Figura 10 – Percentuali di inibizione della contrazione dell'anello di aorta relative alla serie **TECA 20-47**.

I risultati farmacologici relativi alla serie **TECA 20-47** mostrano che, a parità di concentrazione (100 μM) numerosi derivati della serie indolica mostrano interessanti valori di percentuale di inibizione. Dalle curve concentrazione-risposta, misurata ad una concentrazione di 100 μM , dopo 15 minuti, si evince che i composti **TECA 23** e **TECA 25** inibiscono la contrazione dell'anello di aorta rispettivamente dell'80% e 82%, quindi di gran lunga superiore all'inibizione mostrata dal composto di riferimento RWJ-54003.

Tali dati confermano i risultati degli studi SAR effettuati sulle serie precedenti poiché i composti **TECA 20-47** presentano le sostituzioni che in tali serie di composti avevano mostrato il migliore profilo farmacologico.

Dall'analisi del grafico si evince inoltre che della serie benzodiazepinica i composti **TECA 33** e **TECA 41** presentano un'attività antagonista inferiore al 50% ed anche notevolmente inferiore rispetto agli analoghi composti **TECA 35** e **TECA 43**.

Da questi risultati è possibile dedurre che la bassa percentuale di inibizione sia dovuta alla mancanza del nucleo metilen-pirrolidinico sullo scaffold benzodiazepinico, il quale, protonandosi a pH fisiologico, potrebbe instaurare un'interazione ionica addizionale con il recettore.

Le buone percentuali di inibizione mostrate, invece, dai composti **TECA 35** e **TECA 43** evidenziano che l'introduzione dello scaffold benzodiazepinico ha dato risultati paragonabili alla serie indolica.

Infine i dati relativi alla serie benzodiazepinica completa confermano quanto previsto dagli studi di relazione struttura-attività, relativamente all'importanza del residuo guanidinico basico libero. Infatti nessuno dei composti in cui l'Arg è protetta in catena laterale con il gruppo Pbf ha mostrato una significativa attività antagonista.

I composti **TECA 23** e **TECA 25** sono stati ulteriormente saggiati al fine di valutare la loro capacità di inibire l'aggregazione piastrinica.

Come è possibile evincere dalla Tabella 6, entrambi i composti sono risultati attivi; essi, infatti, inibiscono l'aggregazione delle piastrine umane indotta da SFLLRN-NH₂ (IC₅₀ = 0.27 μM e 0.30 μM, rispettivamente) e dalla trombina (IC₅₀ = 2.32 μM e 0.90 μM, rispettivamente) mentre risultano abbastanza selettivi relativamente al collagene ed al composto trombossano-mimetico U 46619 (Tabella 8).

Composto	Trombina	SFLLRN-NH₂	Collagene	U46619
TECA 25	2.43±0.11	0.17±0.01	IA	IA
TECA 23	1.02±0.34	0.20±0.09	56.3±18.6	IA

Tabella 8 - Inibizione dell'aggregazione piastrinica IC₅₀, μM.

6.3.1 INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE STELLATE EPATICHE

Il composto **TECA 25**, che tra quelli sintetizzati ha mostrato le migliori caratteristiche farmacologiche, è stato ulteriormente saggiato al fine di valutarne le possibili applicazioni terapeutiche. E' stata valutata, in particolare, la sua capacità di inibire la proliferazione delle cellule stellate epatiche (HSC). Le cellule stellate del fegato danno il maggiore contributo alla fibrosi epatica attraverso la loro trasformazione da cellule quiescenti ricche in vitamina A a miofibroblasti proliferativi e fibrogenici.

Il composto **TECA 25** è in grado di inibire la proliferazione delle cellule stellate epatiche sia indotta dalla trombina che dal PAR-1AP

(Figura 11); esso, inoltre, risulta selettivo nei confronti del PAR-1 poiché non è in grado di inibire la proliferazione delle HSC indotta dal PAR-2 (Figura 12). Il composto **TECA 25** inibisce tale proliferazione in maniera dose-dipendente (Figura 13).

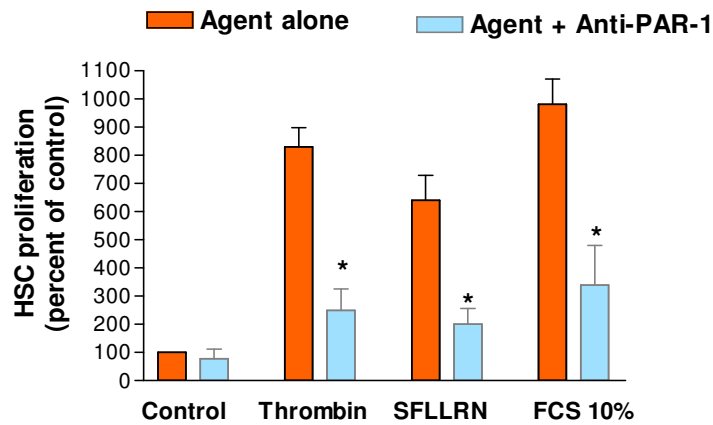


Figura 11 - Il composto **TECA 25** inibisce la proliferazione delle cellule stellate epatiche.

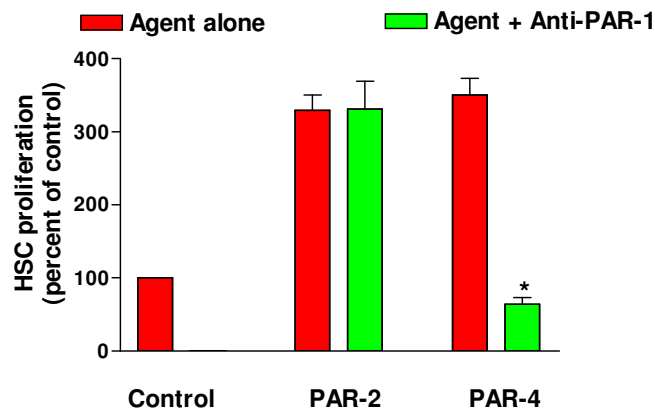


Figura 12 – Il composto **TECA 25** inibisce la proliferazione delle cellule stellate epatiche in maniera selettiva.

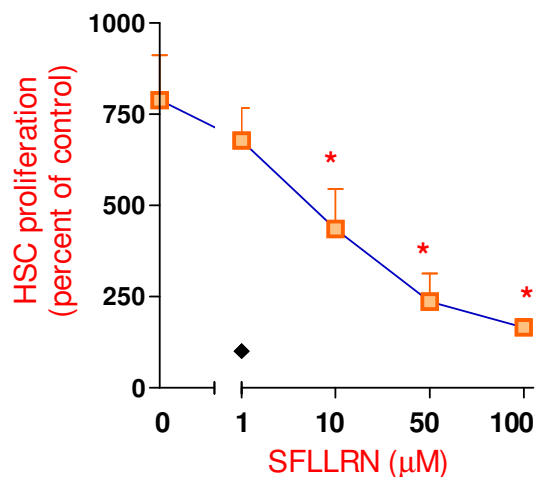


Figura 13 – Il composto **TECA 25** inibisce la proliferazione delle cellule stellate epatiche in maniera dose-dipendente.

I risultati ottenuti con questi prodotti sono, dunque, estremamente confortanti e aprono la strada alla possibilità di sintetizzare nuovi derivati ad attività PAR-1 antagonista che siano in grado di interferire con le azioni cellulari della trombina senza modificare il suo ruolo nella coagulazione e nell'emostasi.

6.3.2 INIBIZIONE DEL RILASCIO DELL'MCP-1

Era già noto da tempo che la trombina, oltre a svolgere un ruolo cruciale nell'aggregazione piastrinica, fosse coinvolta anche in altri importanti processi fisiologici quali la proliferazione cellulare, le reazioni infiammatorie (es. l'asma bronchiale) e la neurodegenerazione. Negli ultimi due anni è stato, poi, dimostrato che il recettore PAR-1 media molte delle funzioni fisiologiche della trombina. Ulteriori studi condotti

sul composto **TECA 25**, hanno come scopo proprio quello di dimostrare il coinvolgimento del recettore PAR-1 nei processi infiammatori. E' stato, infatti, verificato che il composto **TECA 25** inibisce il rilascio dell'MCP-1 (Figura 14), un fattore chemiotattico monocitario rilasciato durante i processi infiammatori.

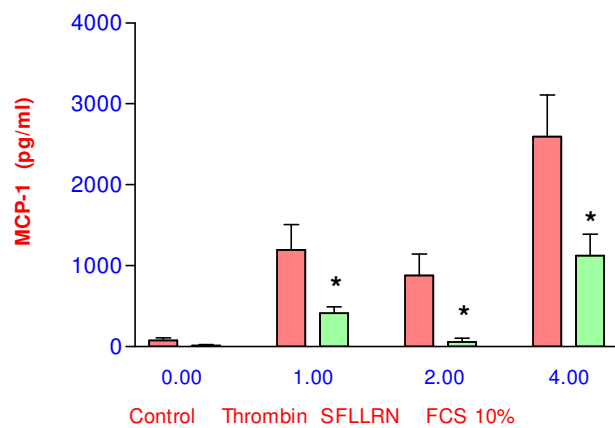


Figura 14 – Inibizione del rilascio dell'MCP-1

Anche in questo caso l'inibizione è perfettamente dose-dipendente (Figura 15).

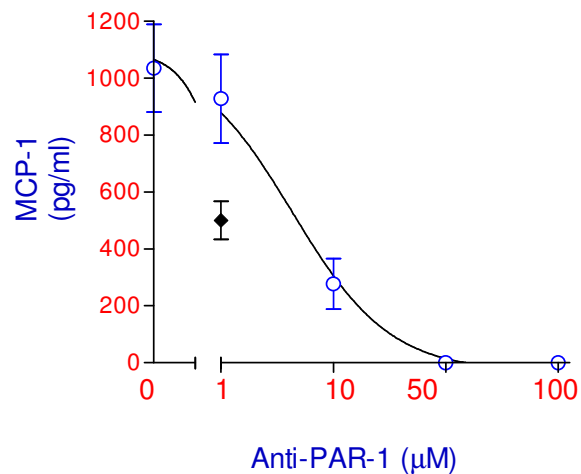


Figura 15 - Il composto **TECA 25** inibisce il rilascio di MCP-1 in maniera dose-dipendente

6.3.3 INIBIZIONE DELLA SINTESI DEL COLLAGENE IN CELLULE HSC

L'esposizione di linee cellulari HSC-T6 alla trombina e alla SF-NH₂ induceva un significativo aumento della sintesi del collagene, come evidenziato dal rilascio di idrossiprolina e dall'accumulo di mRNA codificante per il collagene I, nelle cellule del surnatante. Questi effetti venivano invece attenuati dall'esposizione delle cellule all'antagonista PAR-1 (TECA 25) (Figura 16).

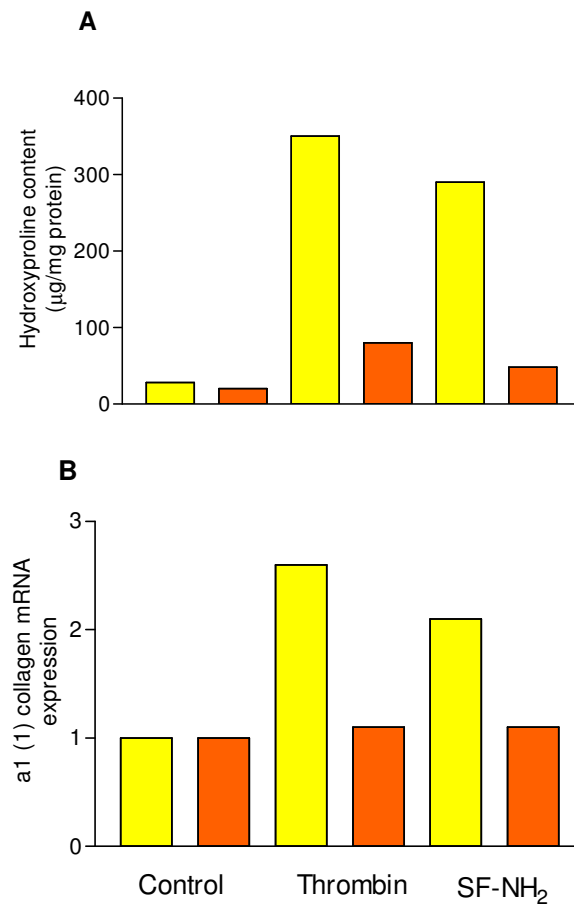


Figura 16 – Inibizione della sintesi del collagene.

7. CONCLUSIONI

I ligandi **TECA 1-67** discussi in questa tesi rappresentano lo sviluppo di una serie di indagini già da tempo avviate presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica [24,25].

Tali composti conservano, rispetto alla sequenza del PAR-1AP, il residuo di Arg e la struttura aromatica analoga alla Phe che risultano indispensabili per l'affinità recettoriale.

La sequenza Leu-Leu, invece, funge da semplice "spacer" in modo tale che nella struttura tridimensionale i due residui (Arg e Phe) vengano a trovarsi in posizione adiacente.

I risultati farmacologici davvero incoraggianti ottenuti con il composto **TECA 3** della serie **TECA 1-4**, evidenziano che l'introduzione di due atomi di cloro in posizione 2 e 6 fornisce i migliori risultati sia in termini di affinità sia di attività. Tali risultati hanno indotto a pensare che il gruppo benzilico 2,6-dicloro sostituito può dare ottimi risultati anche nella serie dei composti **TECA 5-19**, stabilizzando la sovrapposizione π - π con l'anello nitroguanidinico e quindi la conformazione bioattiva dello pseudopeptide.

I risultati ottenuti hanno confermato pienamente queste previsioni ed hanno aggiunto maggior peso alla nostra ipotesi che l'interazione arile-nitroguanidina potesse stabilizzare la conformazione bioattiva dello pseudopeptide.

Per quanto riguarda la serie dei composti denominati **TECA 5-19**, dagli studi effettuati i composti **TECA 13** e **TECA 17** sono risultati i più attivi. In particolare il composto **TECA 17** ha mostrato una percentuale di inibizione della contrazione dell'anello di aorta del 40%.

I risultati farmacologici relativi alla serie **TECA 20-47** mostrano che, a parità di concentrazione, il composto **TECA 22** ha un'attività paragonabile a quella dell'antagonista di riferimento (RWJ-54003), mentre i composti **TECA 23** e **TECA 25** presentano una percentuale di

inibizione della contrazione dell'anello di aorta rispettivamente dell'80% e dell'82%. E' importante sottolineare che i composti **TECA 23** e **TECA 25** hanno un'attività antagonista superiore a quella del composto di riferimento (RWJ-54003) rispettivamente del 23% e 25%. Tali dati confermano i risultati degli studi SAR effettuati sulle serie precedenti poiché i composti **TECA 20-47** presentano le sostituzioni che in tali serie di composti avevano mostrato il migliore profilo farmacologico.

I risultati relativi alla serie **TECA 32-47** a nucleo benzodiazepinico hanno permesso di evidenziare che:

- è possibile effettuare la sostituzione dello scaffold eterociclico, ottenendo risultati paragonabili alla serie indolica;
- il residuo guanidinico libero è fondamentale per l'attività;
- l'atomo di azoto della pirrolidina, protonato a pH fisiologico, dà una interazione ionica fondamentale per il riconoscimento del recettore.

I saggi farmacologici condotti sul composto **TECA 25** hanno portato alla conclusione che il recettore PAR-1 è il maggiore responsabile della mediazione degli effetti proinfiammatori e profibrotici della trombina.

La cirrosi è una patologia in cui sono coinvolti entrambi gli effetti e in più induce fibrogenesi e lacerazioni. In squilibri cronici epatici le HSC acquisiscono un fenotipo "attivato", che induce proliferazione, contrattilità, rilascio di collagene e citossine.

L'esposizione delle HSC alla trombina innesca numerosi eventi: proliferazione, contrazione e sintesi del collagene. La rilevanza funzionale del PAR-1 nella modulazione dell'attività delle HSC e dell'aumento dei depositi di collagene è tutt'oggi sconosciuta.

I saggi sulle cellule stellate epatiche hanno consentito di verificare il coinvolgimento del recettore PAR-1 nella fibrosi epatica e

aprono la possibilità di impiegare antagonisti PAR-1 nel trattamento di tale patologia che è, tutt'oggi, incurabile [26,27].

Tutti i prodotti sintetizzati, sono attualmente sottoposti ad una ulteriore sperimentazione farmacologica, che permetterà di approfondire gli studi SAR su tali molecole.

I risultati farmacologici relativi ai composti pseudopeptidici, stericamente vincolati, analoghi del PAR-1AP, ci permetteranno di effettuare ulteriori studi di relazione struttura-attività e di approfondire la conoscenza della conformazione bioattiva tridimensionale del ligando del recettore PAR-1.

In conclusione i dati farmacologici ottenuti fino a questo momento hanno consentito di chiarire parte del meccanismo molecolare di interazione recettoriale e rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di nuovi e potenti composti peptidomimetici ad attività PAR-1 agonista ed antagonista.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1- Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**; 91: 9208-9212.
- 2- Lerner D.J., Chen M., Tram T., Coughlin S.R.. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271: 13943-13947.
- 3- D'Andrea M.R., Derian C.K., Leturcq D., Baker S.M., Brunmark A., Ling P., Darrow A.L., Santulli R.J., Brass L.F., Andrade-Gordon P.. *J. Hist. Cytochem.* **1998**; 46: 157-164.
- 4- Dery O., Corvera C., Steinhoff M., Bunnet N.W.. *Am. J. Physiol.* 274 (Cell. Physiol. 43), **1998**, C1429-C1452.
- 5- Brass L. F., Pizarro S., Ahuja M., Belmonte E., Blanchard N., Stadel J. M., Hoxie J. A.. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2943-2952.
- 6- Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., Ishihara H., Coughlin S. R.. *J. Clin. Invest.*, **1999**, 103, 879-887.
- 7- Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahan M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R.. *Nature*, **1997**, 278, 502-506.
- 8- Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R. V., Tam C., Coughlin S. R.. *Nature*, **1998**, 394, 690-694.
- 9- Xu W. F., Andersen H., Whittmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Foster D. C.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**; 95, 6642-6646.
- 10- Nanevycz T., Ishii M., wang L., Chen M., Turck C. W., Cohen F. E., Coughlin S. R.. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 21619-21625.
- 11- Bohm S. K., Khithin L. M., Grady E. F., Aponte G., Payan D. G., Bunnet N. W.. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 22003-22016.
- 12- Bohm S. K., Kong W., Bromme D., Smeekens S. P., Anderson D. C., Connolly A., Kahn M., Nelken N. A., Coughlin S. R., Payan D. G., Bunnet N. W.. *Biochem. J.* **1996**, 314, 1009-1016.

- 13- Kong W., McConalogue K., Hollenberg M. D., Payan D. G., Bohm S. K., Bunnet N. W.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94.
- 14- Hollenberg M. D., Saifeddine M., Al-Ani B., Kawabata A.. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **1997**, 75, 832-841.
- 15- Andersen H., Greenberg D. L., Fujikama K., Chung D. W., Davie E. W.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**; 96: 11189-11193.
- 16- Cirino G., Cicala C., Bucci M., Sorrentino L., Maraganore J. M., Stone S. R.. *J. Exp. Med.*, **1996**, 183, 821-827.
- 17- Cicala C., Spina D., Severino B., Page C.P. and Cirino G.. *Br. J. Pharmacol.* **2001**; 132, 1229-1234.
- 18- Nystedt S., Ramakrishnan V., Sundelin J.. *J. Biol. Chem.*, **1996**; 271, 14910-14915.
- 19- Zhang H. C., Derian C. K., Andrade-Gordon P., Hoekstra W., McComsey D. F., White K. B., Poulter B. L., Addo M. F., Cheung W. M., Damiano B. P., Oksenberg D., Reynolds E. E., Pandey A., Scarborough R. M., and Maryanoff B. E.. *J. Med. Chem.* **2001**; 44 (7) 1021-1024
- 20- Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Fiorino F., Severino B., Cirillo D., Terracciano S. and Caliendo G.. *J. Comb. Chem.*, **2005**; 7 (4) 618-621
- 21- Severino B., Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Terracciano S., Fiorino F., Cirillo D., Salvatori S., Balboni G. and Caliendo G.. *Synthesis* **2004**; 18 3011-3016
- 22- Santagada V., Frecentese F., Fiorino F., Cirillo D., Perissutti E., Severino B., Terracciano S. and Caliendo G.. *QSAR & Comb. Sci.* **2004**; 23 (10) 899-901
- 23- Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Cirillo D., Terracciano S. and Caliendo G.. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2004**; 14(17) 4491-4493

- 24- Napoli C., Cicala C., Wallace J.L., de Nigris F., Santagada V., Caliendo G., Franconi F., Ignarro L.J., Cirino G.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**; 97: 3678.
- 25- Santagada, V.; Caliendo, G.; Severino, B.; Perissutti, E.; Fiorino, F.; Cicala, C.; De Filippis, V.; Cirino, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 7;12(1):21-4.
- 26- Matsoukas, J., Hollenberg, M.D., Mvromoustakos, T., Panagiotopoulos, D., Alexopoulos, K., Yamdagni, R., Wu, Q., Moore, G.J. *J. Protein Chem.* **1997**; 16, 113-131.
- 27- Bernatowicz M. S., Klimas C. E., Hartl K. S., Peluso M., Allegretto N. J., Seiler S. M.. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4879-4887.

INDICE

1. INTRODUZIONE	PAG 1
1.1 RECETTORI ATTIVATI DALLE PROTEASI (PARS)	PAG 3
1.2 MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DEI PARS	PAG 7
1.3 STRUTTURA E CARATTERISTICHE DEI RECETTORI PARS	PAG 11
1.4 PEPTIDI ATTIVATORI DEI PARS	PAG 14
2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA	PAG 15
2.1 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 1-4	PAG 20
2.2 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 5-19	PAG 21
2.3 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO INDOLICO DELLA SERIE TECA 20-31	PAG 27
2.4 PSEUDOPEPTIDI A NUCLEO BENZODIAZEPINICO DELLA SERIE TECA 32-47	PAG 30
2.5 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALL'INTRODUZIONE DI N-ALCHIL GLICINE NELLA SEQUENZA DEL PAR-1AP	PAG 32
2.6 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALL'INTRODUZIONE DEL TIC E DEI SUOI ANALOGHI 5-,6-, 7- E 8-GTIC NELLA SEQUENZA DEL PAR-1AP	PAG 35
2.7 PEPTIDOMIMETICI CARATTERIZZATI DALLA PRESENZA DI UN ISOSTERO DEL LEGAME PEPTIDICO: IL LEGAME METILENAMMINICO	PAG 37
2.8 IL NUCLEO 1,2,4-OSSADIAZOLICO	PAG 40
3. SINTESI	PAG 42
3.1 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI RELATIVI AI COMPOSTI TECA 1-47	PAG 43
3.2 DERIVATO 6-AMINO INDOLICO	PAG 45
3.3 DERIVATO 5-AMINO INDOLICO	PAG 49
3.4 DERIVATO BENZODIAZEPINICO	PAG 51

3.5 N-ALCHIL GLICINE.....	PAG 55
3.6 TIC E SUOI ANALOGHI.....	PAG 58
3.7 LEGAME METILENAMMINICO.....	PAG 62
3.8 NUCLEO 1,2,4-OSSADIAZOLICO.....	PAG 64

4. PARTE SPERIMENTALE.....	PAG 70
4.1 Sintesi di H-Arg(Pbf)-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	PAG 71
4.2 Sintesi di H-X-Arg(Pbf)-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	PAG 72
4.3 Sintesi di H-Arg(NO ₂)-Leu-NH ₂	PAG 72
4.4 Sintesi di Z-Benzil-2-Y-6-nitro-indolo.....	PAG 73
4.5 Sintesi del 4-nitro-fenilestere dell'acido Z-Benzil- 6-indolil- carbammico	PAG 74
4.6 Sintesi del 2-metil-3-pirrolidinil metil indolo.....	PAG 74
4.7 Sintesi del 2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo	PAG 75
4.8 Sintesi di 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-5-nitro-3-pirrolidinil metil-1H-indolo.....	PAG 76
4.9 Sintesi di 1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-3-pirrolidinil metil-1H-indol-5-il amina.....	PAG 76
4.10 Sintesi di [1-(2,6-dicloro-benzil)-2-metil-3-pirrolidinil metil-1H-indol-5-il]-carbamic acid 4-nitro-fenil estere	PAG 77
4.11 Sintesi dei derivati indolici ureidici	PAG 77
4.12 Sintesi dei prodotti finali a nucleo indolico	PAG 78
4.13 Sintesi di N-(2-Benzoil-4-nitro-fenil)-2-cloro-acetamide.....	PAG 79
4.14 Sintesi di N-(4-Amino-2-benzoil-fenil)-2-cloro-acetamide.....	PAG 79
4.15 Sintesi di 7-Amino- 5-fenil-1,3-diidro- benzo-[e][1,4]- diazepin-2- one...PAG 80	
4.16 Sintesi di 2-Oxo-5-fenil-2,3-diidro-1H-benzo[e][1,4]-diazepin-7-il-carbamic acid nitrofenil estere	PAG 80
4.17 Sintesi di clorometilen-pirrolidina.....	PAG 81
4.18 Sintesi dei prodotti finali TECA 32-47 a nucleo benzodiazepinico.....	PAG 81

4.19 Sintesi parallela della libreria di esteri metilici della glicina N-alchil	
sostituiti.....	PAG 83
4.20 Sintesi non parallela della libreria di esteri metilici della glicina N-alchil	
sostituiti.....	PAG 85
4.21 Sintesi di H-5-GTIC-OH.....	PAG 86
4.22 Sintesi di H-6- e 7-GTIC-OH.....	PAG 87
4.23 Sintesi di H-8-GTIC-OH.....	PAG 88
4.24 Sintesi degli N,O-dimetilidrossammati.....	PAG 90
4.25 Sintesi delle N-Fmoc-aminoaldeidi.....	PAG 91
4.26 Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico.....	PAG 91
4.27 Sintesi dei derivati ossadiazolici in soluzione.....	PAG
92	
4.28 Sintesi dei derivati ossadiazolici senza solvente.....	PAG
93	
4.29 Sintesi dei derivati pseudopeptidici a 6 termini analoghi del PAR-1AP, caratterizzati dalla sostituzione dei residui aminoacidici con aminoacidi non convenzionali (TECA 48-67).....	PAG 94
4.30 Procedura generale di rimozione dalla resina degli pseudopeptidi analoghi del PAR-1AP.....	PAG 96
4.31 Purificazione e caratterizzazione dei composti peptidomimetici antagonisti del recettore PAR-1.....	PAG 97
5. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA.....	PAG 99
5.1 CONTRAZIONE DELL'ANELLO DI AORTA DI RATTO.....	PAG 100
5.2 INIBIZIONE DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA.....	PAG 101
6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	PAG 103
6.1 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 1-4.....	PAG 104
6.2 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 5-19.....	PAG 104
6.3 DERIVATI PSEUDOPEPTIDICI DELLA SERIE TECA 20-47.....	PAG 106
6.3.1 INIBIZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE STELLATE EPATICHE.....	PAG 111

6.3.2	INIBIZIONE DEL RILASCIO DELL'MCP-1.....	PAG 114
6.3.3	INIBIZIONE DELLA SINTESI DEL COLLAGENE IN CELLULE HSC.....	PAG 116
7.	CONCLUSIONI	PAG 118
	BIBLIOGRAFIA.....	PAG 124