

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II

FACOLTÀ DI FARMACIA  
**Dipartimento di Chimica Farmaceutica e  
Tossicologica**

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN  
Scienze Farmaceutiche**

XVIII Ciclo

**PROGETTAZIONE SINTESI E  
CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DI  
COMPOSTI PEPTIDICI E PSEUDOPEPTIDICI ATTIVI  
SUL RECETTORE PAR-4**

Coordinatore  
Chiar.mo Prof. Enrico Abignente

Supervisore  
Chiar.mo Prof. Vincenzo Santagada

Candidata:  
Dott. Donatella Cirillo

## **INDICE**

• <b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 2</b>
➤ <b>RECETTORI ATTIVATI DALLE PROTEASI (PARS)</b>	<b>pag. 6</b>
➤ <b>STRUTTURA E CARATTERISTICHE DEI RECETTORI PARS</b>	<b>pag. 9</b>
➤ <b>MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DEI PARS</b>	<b>pag.14</b>
➤ <b>MECCANISMO DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE</b>	<b>pag. 17</b>
• <b>ANALISI RETROSPETTIVA DEI DATI</b>	<b>pag. 20</b>
• <b>IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA</b>	<b>pag. 25</b>
• <b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>pag. 44</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI PEPTIDICI I-XIII</b>	<b>pag. 45</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI XIV-XXIII</b>	<b>pag. 48</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI XIV-XXX</b>	<b>pag. 54</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OXADIAZOLICI</b>	<b>pag. 61</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI XXX-XXXIV</b>	<b>pag. 68</b>
➤ <b>SINTESI DEI DERIVATI PAR-4-(1-15)</b>	<b>pag. 78</b>
• <b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 83</b>
➤ <b>SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA</b>	
➤ <b>DEI DERIVATI I-XIII</b>	<b>pag. 84</b>
➤ <b>SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA</b>	
➤ <b>DEI DERIVATI XIV-XIX</b>	<b>pag. 91</b>
➤ <b>SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA</b>	
➤ <b>DEI DERIVATI PAR-4-(1-15)</b>	<b>pag. 99</b>
• <b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 102</b>

## **INTRODUZIONE**

In questi ultimi anni sono emerse sostanziali novità circa la presenza e l'azione di enzimi ad attività proteolitica chiamati comunemente proteasi. In particolare è stato messo in evidenza che determinate proteasi, tradizionalmente considerate come enzimi capaci di degradare proteine extracellulari, svolgono un'azione anche come molecole di segnale che regolano una molteplicità di funzioni cellulari attivando una particolare categoria di recettori presenti sulla membrana plasmatica<sup>1-3</sup> Gli enzimi in oggetto fanno parte della numerosa famiglia delle proteasi seriniche, così denominate perché l'azione catalitica è dovuta al gruppo –OH in catena laterale della serina, reso reattivo dall'instaurarsi di interazioni tra i residui istidina-serina-aspartato (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, divengono attivati. Per queste proprietà, questa classe di recettori è stata definita come recettori attivati da proteasi. 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.

Una terza famiglia di recettori attivati dalle proteasi comprende un gruppo di recettori accoppiati a proteine G (GPCR), denominati PARs, i quali per essere attivati devono sottostare all'azione proteolitica delle proteasi. Allo stato attuale i PARs del tipo GPCR possono essere ulteriormente suddivisi in quattro 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 (tabella1). In questa tabella è possibile osservare le differenze che esistono tra i 4 sottotipi recettoriali PAR.

I recettori di tipo 1 e 3 sono attivati preferenzialmente dalla trombina, il tipo 2 dalla tripsina pancreatica e da enzimi con attività tripsino-simile, il tipo 4 è attivato da trombina e tripsina. Possiamo, inoltre, notare che la nuova sequenza N-terminale che viene esposta in seguito a taglio proteolitico è diversa nei 4 recettori e diverso è anche il sito di clivaggio.

E' interessante notare che il gene che codifica per il recettore PAR-4 inaspettatamente è situato in una regione distinta del genoma umano, sul cromosoma 19 p 12, mentre i recettori PAR-1, PAR-2 e PAR-3 sono codificati dal cromosoma 5 q 13.

	<b>PAR-1</b>	<b>PAR-2</b>	<b>PAR-3</b>	<b>PAR-4</b>
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 <sup>41</sup> -Ser <sup>42</sup>	Arg <sup>34</sup> -Ser <sup>35</sup>	Lys <sup>38</sup> -Thr <sup>39</sup>	Arg <sup>47</sup> -Gly <sup>48</sup>
Nuova sequenza terminale	SFLLRN (u) N- TFRIID (x) SFLLRN (t,r)	SLIGRL (t,r) SLIGKV	TFRGAP (u) SFNGCP (t)	GYPGKF (t) GYPGQV (u)

**Tabella 1**

Questa evidenza ha portato ad ipotizzare che sul cromosoma 19 p 12 possa esistere un altro gruppo di geni codificanti per i recettori PAR, se tale ipotesi verrà confermata si potranno identificare nuovi recettori attivati da proteasi espressi su altre cellule.

La sequenza aminoacidi extracellulare dei recettori PAR è di importanza cruciale per il meccanismo e la selettività dell'attivazione di questo tipo di recettori. Nel caso del recettore PAR-3 il taglio proteolitico avviene tra la Lys<sup>38</sup> e la Thr<sup>39</sup> e la nuova sequenza aminoterminale che viene esposta è la seguente: TFRGAP. Nel caso del recettore PAR-4, il ligando endogeno responsabile del taglio proteolitico, è la trombina; tale taglio avviene tra l' Arg<sup>47</sup> e la Gly<sup>48</sup> e la nuova sequenza aminoterminale che viene esposta è GYPGKF.

### **RECETTORI ATTIVATI DALLE PROTEASI (PARS)**

I recettori attivati da proteasi (PARs, protease activated receptors) sono membri di una superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G,

che presentano 7 domini transmembranari, con una regione N-terminale extracellulare ed una C-terminale intracellulare.<sup>4</sup> Il primo recettore per le proteasi clonato è stato il PAR-1, il cui ligando naturale è la trombina. Questo enzima si genera in seguito a danno vascolare ed è uno dei componenti più importanti della cascata della coagulazione. La trombina è inoltre implicata in fenomeni biologici, quali infiammazione, aggregazione piastrinica, stimolazione della replicazione cellulare e modulazione della contrattilità vascolare.

Studi successivi alla scoperta dell'attività recettoriale della trombina hanno evidenziato l'attività recettoriale della tripsina pancreatica con il clonaggio del recettore PAR-2. La tripsina è una proteasi pancreatica 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 di topo è stato individuato nello *screening* di una libreria genomica utilizzando *primers* degenerati nell'ambito di uno studio sui recettori delle neurochine di tipo 2; successivamente è stato clonato nell'uomo e nel ratto.

Il recettore PAR-2 presenta un'omologia di struttura con il recettore PAR-1 pari al 30%. I primi due recettori sono stati ben analizzati; più di recente, mediante studi condotti su topi *knockout*, è stato identificato e caratterizzato il recettore PAR-3 ed è stato riscontrato che esso presenta notevoli analogie, sia strutturali sia funzionali, con il PAR-1. Nell'uomo

è stato riscontrato che anticorpi diretti contro il PAR-1 inibiscono l'attivazione piastrinica indotta da basse, ma non da alte concentrazioni di trombina, e che topi *knockout* per il PAR-1 rispondono alla trombina così come i topi *wild type*. Tali evidenze hanno portato all'identificazione di altri due recettori della trombina, PAR-3 e PAR-4.<sup>5,6</sup> Sulle piastrine umane sono presenti sia il PAR-1 che il PAR-4,<sup>7</sup> mentre sulle piastrine di topo sono espressi il PAR-3 e il PAR-4 ma non il PAR-1.<sup>8-10</sup> In topi *knockout* per il PAR-1, infatti, non vi è nessuna variazione dell'attivazione piastrinica indotta dalla trombina, a differenza di quanto accade in topi *knockout* per il PAR-3, in cui la risposta piastrinica alla trombina risulta notevolmente ridotta. Il PAR-1 e il PAR-3, quindi, sono recettori ad alta affinità per la trombina mentre il PAR-4 è a bassa affinità; tuttavia sia nell'uomo che nel topo, è richiesta l'attivazione di entrambi i recettori per indurre un'efficace aggregazione piastrinica.<sup>7</sup>

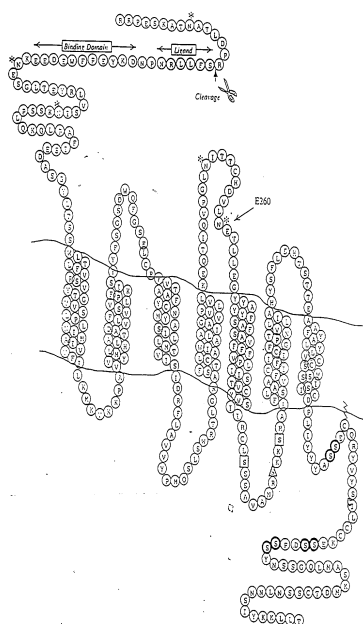
I recettori PAR-1 e PAR-4 sembrano anche essere coinvolti nel processo di angiogenesi agendo su alcune sostanze bioattive, quali l'endostatina ed il VEGF, contenute nelle piastrine. L'endostatina è un potente inibitore dell'angiogenesi, ed il suo rilascio può essere stimolato dall'attivazione del recettore PAR-4, ma non del PAR-1.

L'attivazione del recettore PAR-1 porta alla soppressione del rilascio di endostatina, ma nel contempo determina il rilascio di VEGF, una sostanza proangiogenica. Per contro l'attivazione del recettore PAR-4 stimola il rilascio di endostatina e sopprime il rilascio di VEGF. Da ciò si evince che i recettori PAR-1 e PAR-4 agiscono in maniera opposta nella modulazione del rilascio dei fattori di regolazione dell'angiogenesi.<sup>11</sup>



## STRUTTURA E CARATTERISTICHE DEI RECETTORI PARs

La sequenza aminoacidica della regione extracellulare dei PARs è di importanza critica per il meccanismo e la selettività dell'attivazione di questo tipo di recettori. Gli studi in nostro possesso riguardano in misura maggiore il PAR-1, ma numerose prove sperimentali hanno messo in evidenza la similarità dei vari PARs. Il dominio extracellulare N-



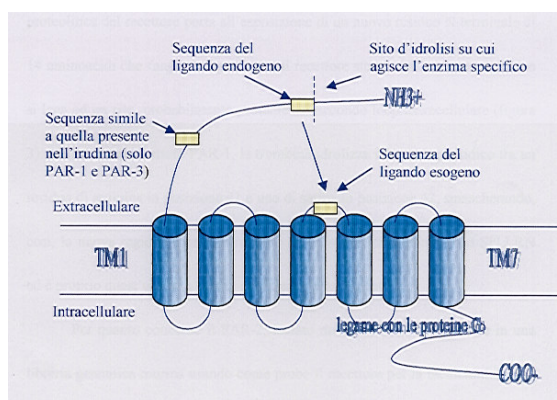
**Figura 1**

terminale del PAR-1 umano contiene un sito proteolitico selettivo per la trombina (LDPR<sup>41</sup>S<sup>42</sup>FLLRN) seguito da un dominio carico negativamente (D<sup>51</sup>KYEPF<sup>56</sup>), 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.<sup>12</sup> E' stato dimostrato che l' $\alpha$ -trombina taglia

la sequenza del PAR-1 tra Arg<sup>41</sup> e Ser<sup>42</sup>, mentre la  $\gamma$ -trombina, la quale è priva del sito di legame cationico, è 100 volte meno potente. La notevole importanza di questo sito è sottolineata dal fatto che la mutazione della Ser<sup>42</sup> con una Pro, inattiva la trombina ed il recettore non può essere attivato.<sup>13</sup> Studi di relazioni struttura-attività (SAR) riguardanti la sequenza aminoacidica SFLLRN (terminale aminico), attivatore del recettore PAR-1 dove i singoli residui sono sostituiti con altri aminoacidi,

insieme con studi di mutagenesi diretta dei siti del *tethered ligand*, dimostrano che i residui critici all'interno di questo dominio includono Phe<sup>2</sup>, Leu<sup>4</sup> e Arg<sup>5</sup>. 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 Glu<sup>260</sup> (Figura 1). Sostituzioni aminoacidiche in tale regione, infatti, possono portare all'attivazione spontanea del recettore, anche in assenza di trombina.<sup>14</sup>

Per quanto riguarda il PAR-2, la mutazione della Ser<sup>34</sup> con la Pro ne previene il catabolismo e l'attivazione da parte della tripsina. Ulteriori studi con peptidi sintetici, corrispondenti al potenziale sito catabolico della tripsina, confermano che la tripsina idrolizza il legame Arg<sup>34</sup>-Ser<sup>35</sup>.



**Figura 2**

Il meccanismo di attivazione del PAR-2 è analogo a quello del recettore PAR-1, ma il nuovo terminale aminico generato in seguito al taglio proteolitico della tripsina contiene la sequenza aminoacidica SLIGRL. Tale sequenza è in grado di attivare il recettore, anche in assenza di proteasi, ed è quindi definita PAR-2AP (peptide attivatore del

recettore PAR-2). E' da notare che gli esodomini N-terminali del PAR-1 e del PAR-3 rappresentano il sito di interazione della trombina (Figura 2).

Questi due recettori, inoltre, presentano una sequenza che ricorda molto quella presente all'estremità C-terminale dell'anticoagulante irudina, la quale rappresenta un altro sito di legame della trombina. La presenza di tali sequenze nella struttura del PAR-1 e del PAR-3 mette in evidenza che questi due recettori rappresentano i principali effettori delle azioni della trombina e che, difficilmente, sono attivati da altre proteasi. Sequenze simili all'irudina non sono state, invece, notate nel recettore PAR-4.

I PAR-4 sono recettori della trombina caratterizzati recentemente e ampiamente distribuiti all'interno del nostro organismo. Concentrazioni particolarmente elevate del suddetto recettore sono state riscontrate soprattutto in: fegato, pancreas, tiroide, testicoli ed intestino tenue, sebbene concentrazioni minori siano state riscontrate nella maggior parte dei tessuti testati.

E' importante sottolineare che sebbene i recettori PAR-1 e PAR-4 vengono attivati dallo stesso ligando endogeno ed agiscono sulle stesse vie metaboliche, il PAR-1 è attivato da basse concentrazioni di trombina, mentre l'attivazione del PAR-4 richiede concentrazioni di trombina più elevate. Studi recenti hanno dimostrato inoltre che il PAR-1 induce un rapido e transiente aumento dei livelli di calcio intracellulari, mentre il PAR-4 induce una risposta più lenta ma più duratura. Tale effetto dipende dall'affinità e dall'entità del taglio proteolitico operato dalla trombina piuttosto che dall'efficienza del *coupling* della proteina G;

infatti in condizioni di saturazione del recettore con il ligando, il PAR1 ed il PAR4 mostrano inizialmente percentuali massime di flusso di calcio simili. Questo effetto più lento e duraturo del recettore PAR-4 dipende dalla presenza continua della trombina ed è interrotto dall'aggiunta di irudina; il lento segnale mediato dal PAR-4 può essere considerato una diretta conseguenza del ridotto clivaggio operato dalla trombina. Nonostante la sua lenta cinetica di attivazione, il PAR-4 contribuisce in larga misura al segnale del  $\text{Ca}^{+2}$  indotto dalla trombina e, a differenza del PAR-1, determina un'aggregazione piastrinica irreversibile, anche in assenza di una risposta ADP-autocrina.<sup>15</sup>

Il PAR-4 umano è attivato quando la trombina taglia il suo endodominio aminotermine tra l'Arg<sup>47</sup> e la Gly<sup>48</sup> per smascherare il *tethered ligand* GYPGQV. Il peptide sintetico GYPGQV funziona come agonista del PAR-4, ma è necessaria una concentrazione di 200-500  $\mu\text{M}$  affinché sia attivo. Questa mancanza di potenza limita di molto l'utilità di questo peptide per testare la funzione del PAR-4 in sistemi in coltura e preclude la sua utilizzazione in vivo.

### **MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DEI PARS**

I recettori PAR presentano un particolare meccanismo di autoattivazione che coinvolge la porzione aminotermine extracellulare. Le proteasi, infatti, tagliano il recettore e determinano l'esposizione di un nuovo terminale aminico che agisce come un *tethered ligand*; quest'ultimo, ripiegandosi sulla molecola recettoriale tagliata, ne determina l'attivazione. La porzione minima di *tethered ligand* attivante

il recettore è costituita da 5 o 6 amminoacidi. 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). Le attuali conoscenze sul meccanismo che attenua la trasduzione del segnale dei PARs sono scarse. I processi che portano all'attenuazione del segnale nei GPCRs possono operare a livello degli agonisti, del recettore, delle proteine G e di numerose tappe che seguono l'attivazione del recettore. Gli agonisti solubili 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. Nello stesso modo, le proteasi sono rimosse sia mediante diffusione passiva sia mediante inattivazione prodotta da inibitori delle proteasi o da processi degradativi. Il *tethered ligand*, invece, una volta esposto, 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, determina il problema di come il segnale attivatore possa essere terminato. 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 di questi recettori 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. Un altro meccanismo che può limitare il segnale prodotto dai PARs riguarda l'attivazione di secondi messaggeri, quali cAMP e inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>). Dopo l'attivazione, i recettori PAR internalizzano, rapidamente, in endosomi precoci che contengono il recettore per la transferrina e, per la maggior parte, attraversano con facilità il reticolo endosomiale localizzandosi nei lisosomi. Tuttavia, parte dei PARs attivati, ed inizialmente internalizzati, può anche essere riciclata sulla membrana plasmatica e conservata in *pools* intracellulari.<sup>16</sup> Nei fibroblasti e nelle cellule endoteliali, per esempio, esiste un *pool* intracellulare preformato di PAR-1, in modo che sulla superficie cellulare ci sia sempre nuovo recettore; al contrario, nei megacariociti umani, tale recettore è continuamente sintetizzato e mai presente in *pool* di proteina preformata. I recettori riciclati sono, però, incapaci di rispondere alla tripsina nonostante possano essere attivati dai peptidi attivatori (APs) e proprio per questo motivo, la rilevanza fisiologica di questo meccanismo di riciclaggio è sconosciuta. L'endocitosi e la degradazione dei PARs potrebbero contribuire alla desensibilizzazione rimuovendo i recettori dalla superficie cellulare e favorendo la degradazione dei recettori attivati, nei lisosomi. Tuttavia questo non è, probabilmente, l'unico meccanismo implicato nella regolazione dell'attenuazione della risposta ai PARs. Il recupero delle risposte cellulari alle proteasi richiede la

possibilità di avere recettori intatti sulla superficie cellulare. Per il recupero dei recettori esistono sostanzialmente due meccanismi: la sintesi di nuovi recettori e la mobilizzazione di *pools* intracellulari di recettori, ma non tutte le cellule che esprimono i PARs utilizzano entrambi.<sup>17</sup>

#### **MECCANISMO DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE**

I PARs possono essere accoppiati a proteine G differenti. Il PAR-1, il primo di questa famiglia di recettori ad essere studiato, è accoppiato alla famiglia delle proteine  $G_q$  e  $G_i$ . Uno dei principali meccanismi di attivazione, che coinvolge la subunità  $G_q$ , determina l'attivazione della fosfolipasi C- $\beta$ , l'idrolisi dei fosfoinositidi e la formazione di IP<sub>3</sub> e diacilglicerolo (DAG) con la successiva mobilizzazione del calcio intracellulare e l'attivazione della fosfochinasi C (PKC) nonché della fosfolipasi A<sub>2</sub>. Tra i vari sottotipi di PARs, vi sono delle differenze soprattutto per quanto riguarda le subunità coinvolte in questi processi, e gli unici dati noti sono relativi al PAR-1. E' noto che gli agonisti del recettore PAR-2 stimolano la produzione di IP<sub>3</sub> e la mobilizzazione del calcio intracellulare in numerose linee cellulari, incluse cellule transfettate con il cDNA per il PAR-2, cellule epiteliali (cheratinociti ed enterociti), cellule della muscolatura liscia e numerose linee cellulari tumorali.<sup>18</sup> Agonisti del PAR-2 stimolano il rilascio di acido arachidonico e la successiva rapida generazione di prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  negli enterociti ed in cellule epiteliali di rene di ratto immortalizzate (KNRK *cells*), e transfettate con il cDNA del PAR-2 umano. Ciò suggerisce l'ipotesi che l'attivazione del PAR-2 porti alla stimolazione

della fosfolipasi A<sub>2</sub> e della cicloossigenasi 1 (COX-1).<sup>19</sup> L'attivazione del PAR-4 che è associato ad una Gq determina l'idrolisi del fosfoinositide e la mobilitazione del calcio intracellulare.

Sebbene<sup>20</sup> il ruolo funzionale svolto dal recettore PAR-4 nel processo di aggregazione piastrinica sia stato completamente chiarito, meno chiaro risulta ancora essere il coinvolgimento del suddetto recettore in altri processi dell'attivazione piastrinica, quali il rilascio di acido arachidonico e la produzione di trombossano. L'attivazione delle piastrine ad opera della trombina o di altri induttori, aumenta i livelli di Ca<sup>+2</sup> intracellulari e di conseguenza attiva la fosfolipasi A<sub>2</sub> con il successivo rilascio di acido arachidonico ed il suo metabolismo a trombossano A<sub>2</sub>.

Il rilascio di trombossano A<sub>2</sub> dalle piastrine attivate costituisce un importante fattore di amplificazione dello stimolo originario dovuto al richiamo di altre piastrine dal torrente circolatorio al sito di aggregazione.

Il recettore PAR-1 da solo non può essere completamente responsabile della produzione di trombossano indotta da trombina, poiché il PAR-1-AP non induce il rilascio di acido arachidonico e la formazione di trombossano in misura paragonabile a quella della trombina; inoltre, induce un'attivazione solo parziale della fosfolipasi A<sub>2</sub>.

Recentemente<sup>21</sup> è stato dimostrato che il PAR-4-AP, AYPGKF, può stimolare la produzione di trombossano dalle piastrine; ciò suggerisce un coinvolgimento del suddetto recettore nella produzione dei mediatori dell'attivazione piastrinica.



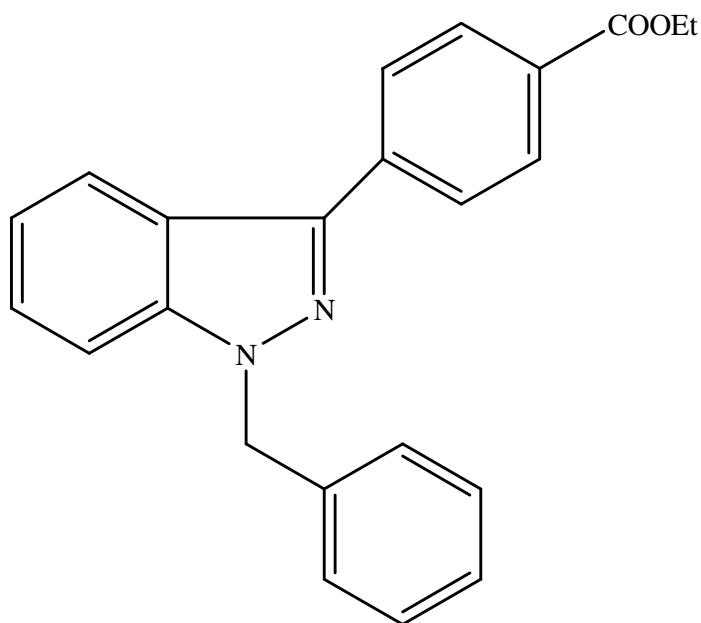
## **ANALISI RETROSPETTIVA DEI DATI**

Sulla base delle acquisizioni recentemente ottenute e dei dati già presenti in letteratura, per i recettori PAR-1<sup>22</sup> e PAR-2, si è pensato, di rivolgere l'attenzione anche ai recettori PAR-4 al fine di individuare i minimi requisiti strutturali necessari per l'interazione con il recettore e di ottenere, anche per essi, delle relazioni struttura-attività che consentissero di definire quelle caratteristiche strutturali necessarie ai fini di un'interazione selettiva.

Per quanto concerne il recettore PAR-4 sono stati già messi a punto alcuni peptidi attivatori di tale recettore (PAR-4 APs), ma questi hanno mostrato una potenza inferiore (100-500  $\mu$ M) rispetto ai PAR-APs che sono in grado di attivare selettivamente i recettori PAR-1 e PAR-2 (1-50  $\mu$ M). GYPGKF rappresenta il *tethered ligand* smascherato quando la trombina taglia il recettore PAR-4 di topo. Questo peptide è stato scelto come sequenza di partenza per studi successivi poiché è più potente della corrispondente sequenza umana GYPGQV sui recettori sia di topo sia di uomo.

Per identificare i requisiti necessari per l'attività e la specificità degli agonisti è stato testato un nuovo peptide agonista specifico per i recettori PAR-4, AYPGKF, che ha dimostrato essere 10 volte più potente di GYPGKF. Diversamente dal peptide GYPGKF, AYPGKF provoca una risposta mediata dal PAR-4 paragonabile in intensità a quella determinata dalla trombina.

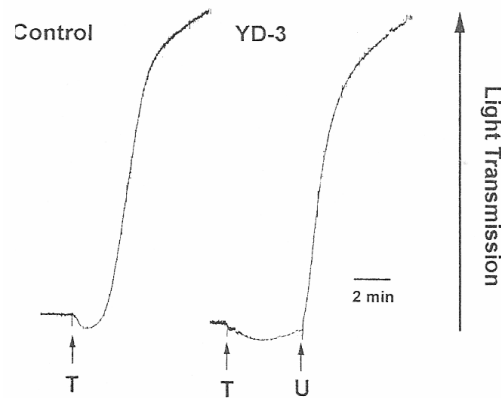
Recentemente, infatti è stato riportato in letteratura un composto chiamato YD-3 [1-benzil-3-(etossicarbonil-fenil)-indazolo, figura 3]<sup>22</sup> il quale è in grado di inibire, nell'uomo, l'aggregazione piastrinica indotta dal PAR-4-AP, ma ha uno scarsissimo effetto sull'attivazione di tale recettore indotta da trombina o dal PAR-1-AP.



**Figura 3**

Il composto YD-3 inibisce selettivamente l'aggregazione piastrinica nei conigli e la cascata del fosfatidilinositolo indotta da trombina, senza però interferire con l'attività proteolitica della trombina. Contrariamente a quanto avviene nei conigli, il composto YD-3 inibisce l'aggregazione nell'uomo quando il recettore PAR-1 è desensitizzato da elevate concentrazioni di PAR-1-AP (SFLLRN). Il suddetto composto esplica la sua azione, quindi, agendo su di un recettore distinto dal classico recettore per la trombina PAR-1: il recettore PAR-4.

Di recente è stato dimostrato che YD-3,<sup>23</sup> inibisce, nell'uomo, l'aggregazione piastrinica indotta dal PAR-4-AP, GYPGKF, con un valore di IC<sub>50</sub> di 0,13 ± 0,02 µM. Questo composto produce inoltre uno *shift* della curva dose-risposta del GYPGKF ad indicare un antagonismo di tipo competitivo (figura 4).



**Figura 4**

E' stato dimostrato, inoltre, che questo composto inibisce la mobilizzazione del Ca<sup>+2</sup> intracellulare indotta da GYPGKF, mobilizzazione che rappresenta lo step iniziale della cascata di trasduzione del segnale della proteina G accoppiata al recettore.

Tutti questi risultati hanno permesso di ipotizzare che YD-3 sia un antagonista potente e selettivo del recettore PAR-4. Questa ipotesi è ulteriormente confermata dall'evidenza che tale composto è in grado di inibire completamente il cambio di forma dei trombociti indotta da GYPGKF. Il cambiamento di forma delle piastrine è la prima risposta indotta da un agonista fisiologico, in generale tale fenomeno può essere completamente inibito da un antagonista che vada ad occupare il recettore impedendo il legame dell'agonista.

## **IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA**

Gli studi SAR e l'individuazione dei requisiti strutturali necessari ad un'interazione selettiva con il recettore, hanno rappresentato il punto di partenza per la progettazione di composti di natura peptidomimetica che presentavano proprietà farmacologiche più favorevoli in termini di specificità d'azione, resistenza alla degradazione e biodisponibilità.

Negli ultimi anni sono stati fatti molti sforzi nello sviluppo di composti peptidomimetici con caratteristiche più favorevoli rispetto ai peptidi nativi. Come per qualsiasi altro farmaco, un peptidomimetico deve possedere il seguente profilo:

- Stabilità metabolica;
- Migliore biodisponibilità;
- Alta affinità e selettività recettoriale;
- Minori effetti collaterali.

La progettazione di tali particolari molecole rappresenta un settore ancora di grande interesse per i chimici farmaceutici, specialmente al fine di ottenere un'interazione ottimale della struttura del ligando con la superficie complementare del recettore.

Attualmente le procedure di sintesi per lo sviluppo dei peptidomimetici comprendono:

- l'incorporazione di aminoacidi non naturali o conformazionalmente vincolati;
- lo sviluppo di omologhi oligopeptidici;
- la sostituzione del legame peptidico con i suoi isosteri;
- la ciclizzazione dei peptidi.

In particolare la mia attenzione è stata rivolta alla progettazione e sintesi di derivati pseudopeptidici presentanti al loro interno surrogati del legame peptidico<sup>24-26</sup> o aminoacidi non naturali conformazionalmente costretti.<sup>27</sup>

Il mio lavoro è stato inizialmente indirizzato all'individuazione di PAR-4-APs dotati di maggiore selettività e potenza d'azione e successivamente alla progettazione di composti che, mimando in varia misura la struttura di YD-3, potessero antagonizzare selettivamente il recettore PAR-4.

Il primo intento è stato quello di valutare l'importanza dei singoli residui aminoacidici nell'interazione con il suddetto recettore. A tal fine è stato eseguito un Alascan del peptide nativo. Tale tecnica ha consentito, quindi, di sintetizzare una serie di peptidi analoghi della sequenza GYPGKF in cui di volta in volta ciascun residuo aminoacidico è stato sostituito con un residuo di alanina che rappresenta il più piccolo aminoacido chirale.

I peptidi progettati e sintetizzati in questa prima fase sono di seguito riportati in tabella 2.

<b>Tabella 2.</b> Sequenze dei peptidi I-VI	
<b>I</b>	H- <b>Ala</b> -Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>II</b>	H-Gly- <b>Ala</b> -Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>III</b>	H-Gly-Tyr- <b>Ala</b> -Gly-Lys-Phe-OH
<b>IV</b>	H-Gly-Tyr-Pro- <b>Ala</b> -Lys-Phe-OH

<b>V</b>	H-Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>Ala</b> -Phe-OH
<b>VI</b>	H-Gly-Tyr-Pro-Gly-Lys- <b>Ala</b> -OH

E' stata inoltre progettata ed effettuata la sintesi di derivati peptidici (tabella 3) in cui i singoli residui aminoacidici sono stati sostituiti con analoghi naturali e non che presentavano caratteristiche di acidità, basicità ed ingombro sterico simili, al fine di migliorare sia i parametri farmacocinetici che quelli farmacodinamici.

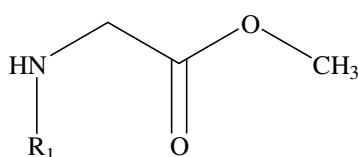
<b>Tabella 3. Sequenze dei peptidi VII-XIII</b>	
<b>VII</b>	H- <b>Ser</b> -Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>VIII</b>	H- <b>Thr</b> -Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>IX</b>	<b>Mpr</b> -Ser-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>X</b>	H-Gly- <b>Phe</b> -Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>XI</b>	H-Gly- <b>p-F-Phe</b> -Pro-Gly-Lys-Phe-OH
<b>XII</b>	H-Gly-Tyr-Pro- <b>Leu</b> -Lys-Phe-OH
<b>XIII</b>	H-Gly-Tyr-Pro- <b>Ile</b> -Lys-Phe-OH

L'Ala-Scan ha mostrato che, mentre la sostituzione della Gly in posizione 1 porta ad un aumento dell'attivazione del recettore PAR-4, la sostituzione della Tyr in 2 con un residuo di Ala determina una perdita dell'attività agonista. Da ciò si è evince che, come nel PAR-1-AP,



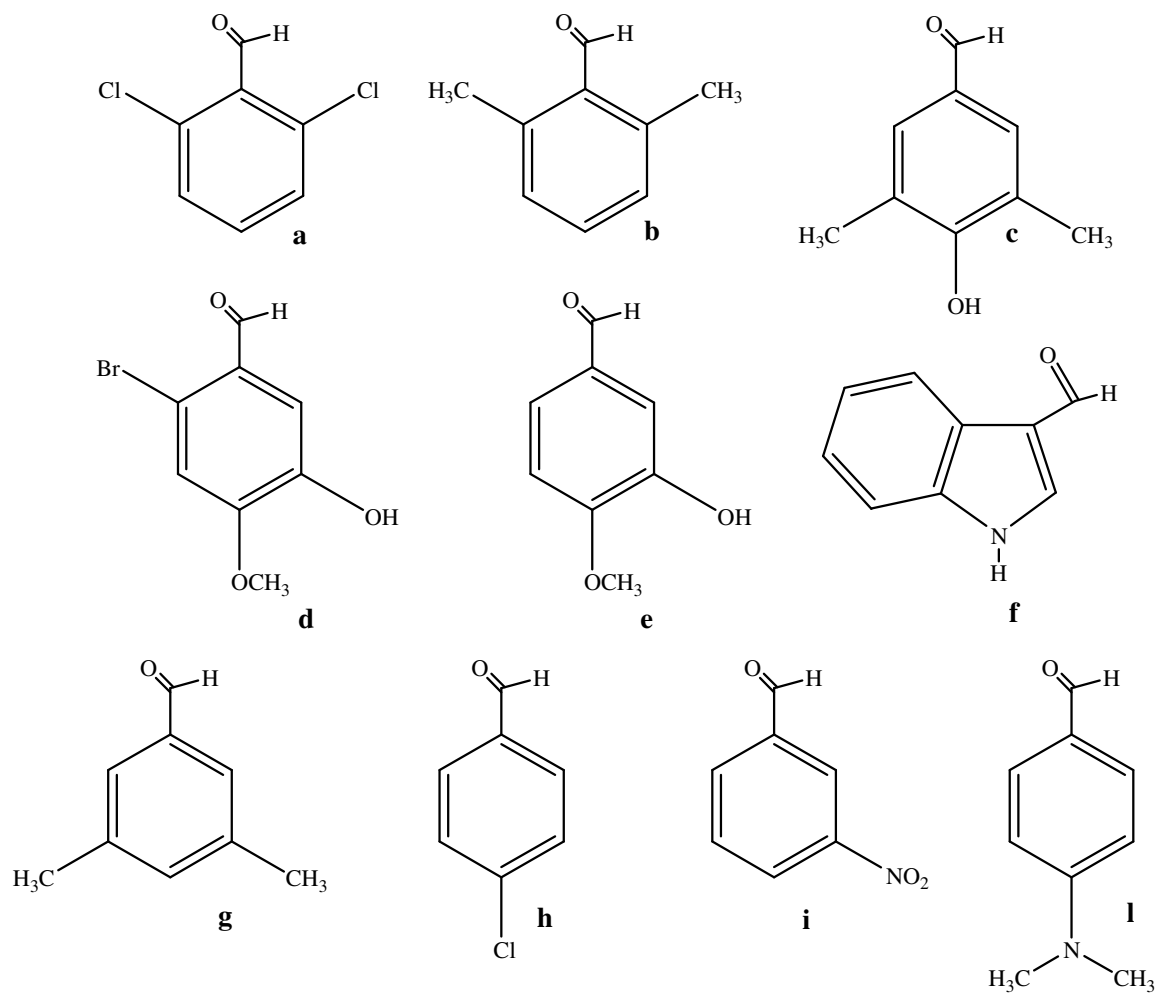
SFLLRN, il residuo aromatico in posizione 2 è fondamentale per l'interazione con il recettore.

Partendo da queste considerazioni, è stata sviluppata una libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti,<sup>24</sup> ottenuta mediante riscaldamento a microonde e con strategie di sintesi combinatoriale parallela. I prodotti ottenuti sono caratterizzati dalla struttura generale presente in Figura 5;

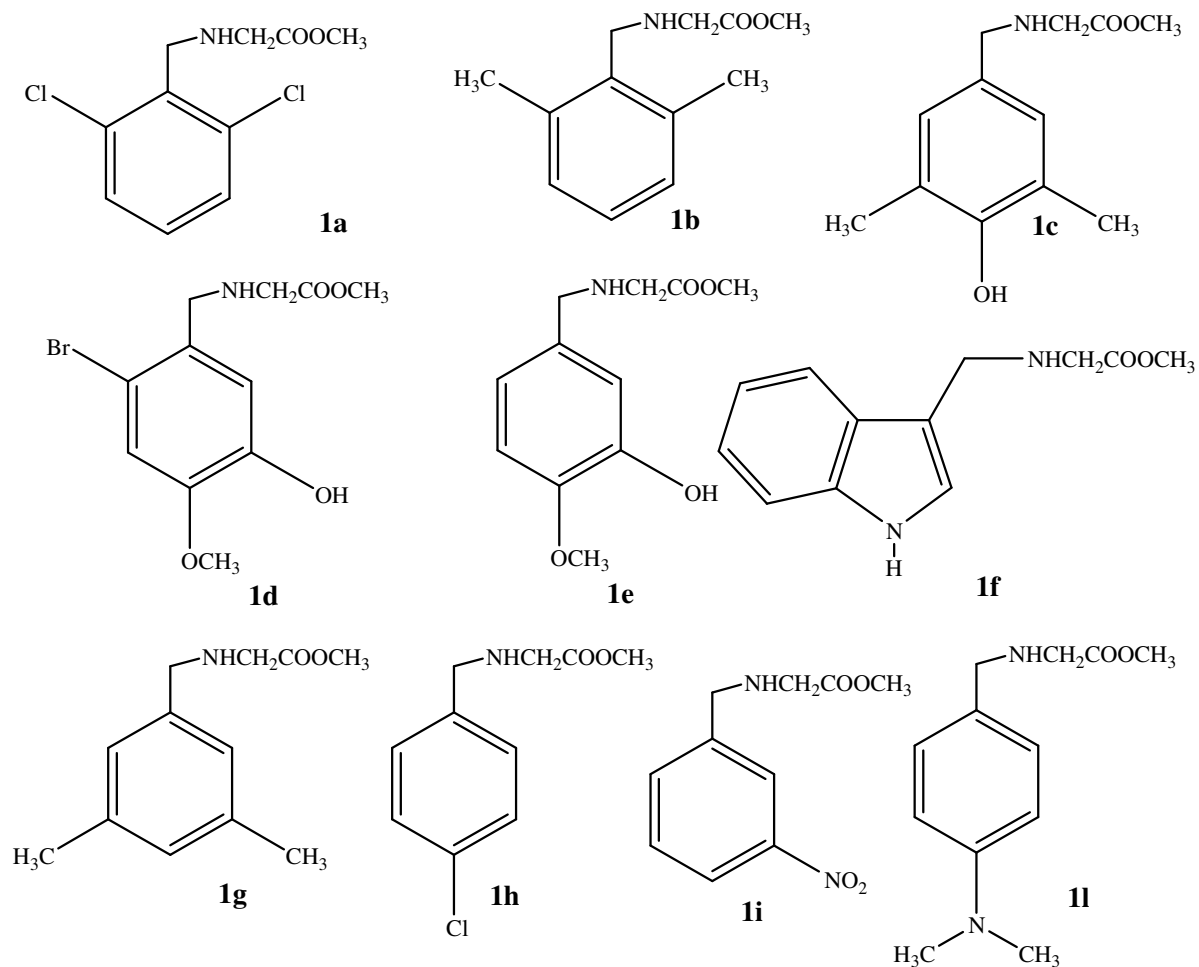


**Figura 5**

Lo spostamento della catena laterale dell'aminoacido dal carbonio- $\alpha$  all'atomo di azoto costituisce un approccio molto diffuso per sviluppare composti peptidomimetici. La sintesi parallela dei derivati aminoacidici modificati è stata condotta mediante alchilazione riduttiva della glicina metil estere cloridrato in presenza di dieci diverse aldeidi aromatiche, commercialmente disponibili (Figura 6), e  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ; le aldeidi selezionate forniscono derivati aminoacidici che possono mimare amminoacidi aromatici convenzionali e non naturali (figura 7).



**Figura 6**



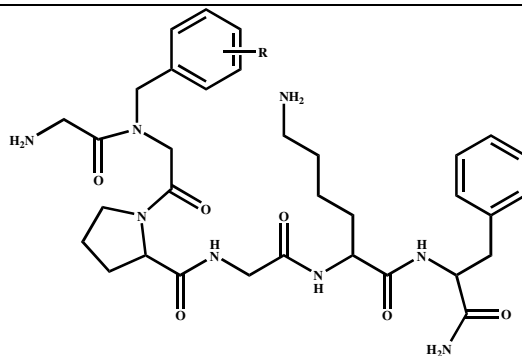
**Figura 7**

I residui non naturali così ottenuti sono stati successivamente introdotti nella sequenza del PAR-4-AP ottenendo così una serie di derivati la cui struttura generale è riportata in figura 8.

Il sostituente R presente sull'N- $\alpha$  della glicina è rappresentato dal gruppo aromatico caratterizzante ogni singola aldeide.

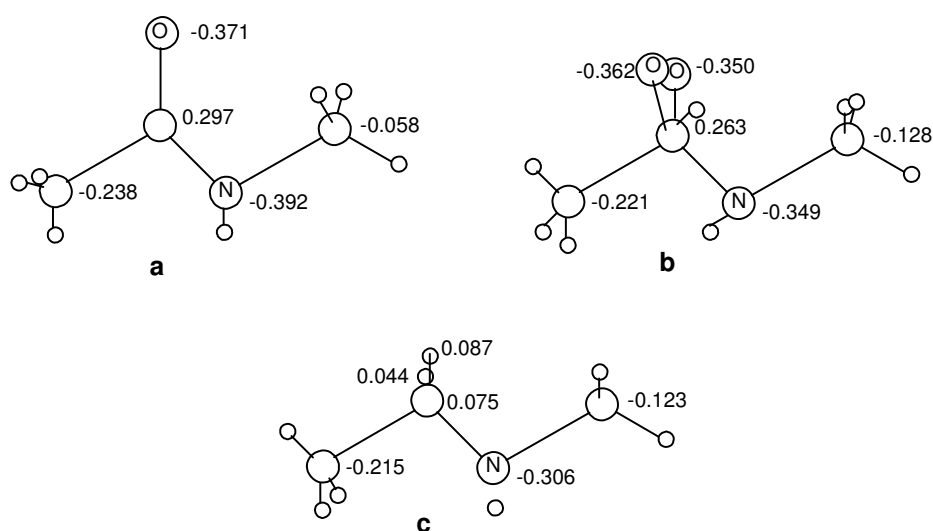
I prodotti finali **XIV-XXIII** sono schematizzati in tabella 4.

**Tabella 4. Prodotti XIV-XXIII**



Composto	R	Composto	R
XIV		XIX	
XV		XX	
XVI		XXI	
XVII		XXII	
XVIII		XXIII	

Al fine di migliorare sia i parametri farmacocinetici che farmacodinamici ed ottenere quindi dei composti dotati di maggiore potenza e selettività d'azione sono stati progettati e sintetizzati dei composti pseudopeptidici in cui il legame peptidico è stato sostituito da dei surrogati che possono rendere la molecola più stabile all'idrolisi enzimatica. Molte di queste modifiche sono accompagnate da variazioni della geometria e della struttura topochimica del peptide nonché dalla distribuzione elettronica e dalle proprietà lipofile e idrofile. Inoltre l'introduzione di isosteri del legame amidico 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 8).



**Figura 8** – (a) legame peptidico, (b) stato di transizione del legame peptidico, (c) legame metilenaminico  $\psi(\text{CH}_2\text{NH})$ .

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  $\text{Ca}^{++}$  e tale complessazione può portare a drastici cambi a livello della conformazione del peptide.

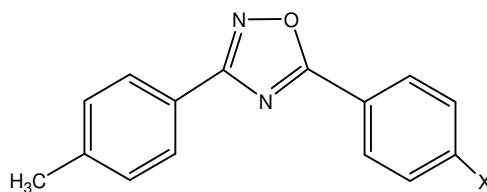
L'incorporazione di aminoacidi conformazionalmente costretti così come le modificazioni del legame peptidico ad un determinato livello della sequenza aminoacidica possono agire come sonda conformazionale variando la libertà rotazionale a livello dello scheletro peptidico.

La sostituzione del legame amidico è stata particolarmente utile nello sviluppo di inibitori enzimatici. Quindi le caratteristiche del legame amidico modificato rappresentano una grande attrattiva nello studio di peptidi bioattivi e nella progettazione di nuovi farmaci.

Il simbolo  $\psi$ , relativo ai legami amidici sostituiti, indica che il legame amidico tra due residui è sostituito dall'unità in parentesi che segue il  $\psi$ ; 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 mia attenzione è stata rivolta, in particolare, alla sintesi del legame metilen-amminico<sup>25</sup> e del nucleo 1,2,4-oxadiazolico<sup>26</sup> tramite l'utilizzo del riscaldamento mediante microonde. I composti sintetizzati presentano le strutture generali riportate qui di seguito in figura 9:

(a)



X = H, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

(b)

Boc-a.a<sub>1</sub>-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-a.a<sub>2</sub>-COOR

a.a<sub>1</sub> = Trp, D-Phe, Aib     a.a<sub>2</sub> = Gly, Val, Aib

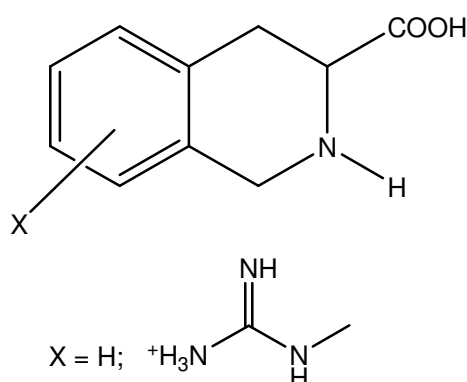
Figura 9

I residui non naturali così ottenuti sono stati successivamente inseriti nella sequenza del PAR-4-AP ed i prodotti finali sono riportati in tab. 5

Tabella 5. Derivati XXIV-XXX	
XXIV	Aib-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Aib-Pro-Gly-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXV	Gly-Tyr-Trp-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Gly-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXVI	Gly-Tyr-Trp-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Val-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXVII	Gly-Tyr-Trp-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Aib-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXVIII	Gly-D-Phe-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Aib-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXIX	Gly-D-Phe-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Gly-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>
XXX	Gly-D-Phe-ψ(CH <sub>2</sub> NH)-Val-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>

La sintesi del nucleo 1,2,4-oxadiazolico si cala all'interno di un progetto ben più ampio, che sino ad ora ha portato all'ottimizzazione delle condizioni di sintesi di tale nucleo. Lo step successivo prevederà l'introduzione di tale surrogato del legame peptidico all'interno della sequenza dei peptidi attivatori dei recettori PAR.

L'introduzione di aminoacidi conformazionalmente costretti può servire a valutare come variando la libertà rotazionale, possa variare l'interazione con la controparte recettoriale. A tale scopo sono stati progettati e sintetizzati dei pseudopeptidi in cui il residuo basico di Lys in posizione 5 è stato sostituito con il Tic (acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico), un analogo stericamente costretto della Phe, dotato di caratteristiche basiche, con un gruppo guanidinico in posizione 5, 6, 7 e 8.<sup>27</sup>



I peptidi ottenuti sono riportati di seguito in tabella 6.

<b>Tabella 6. Derivati XXXI-XXXV</b>	
<b>XXXI</b>	Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>GTic</b> -Phe-NH <sub>2</sub>
<b>XXXII</b>	Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>5-GTic</b> -Phe-NH <sub>2</sub>
<b>XXXIII</b>	Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>6-GTic</b> -Phe-NH <sub>2</sub>
<b>XXXIV</b>	Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>7-GTic</b> -Phe-NH <sub>2</sub>
<b>XXXV</b>	Gly-Tyr-Pro-Gly- <b>8-GTic</b> -Phe-NH <sub>2</sub>

Contestualmente partendo dalla struttura di YD-3, dai recenti dati riportati in letteratura, e sulla base di alcune molecole individuate in seguito allo *screening* di una libreria di composti, sono state progettate

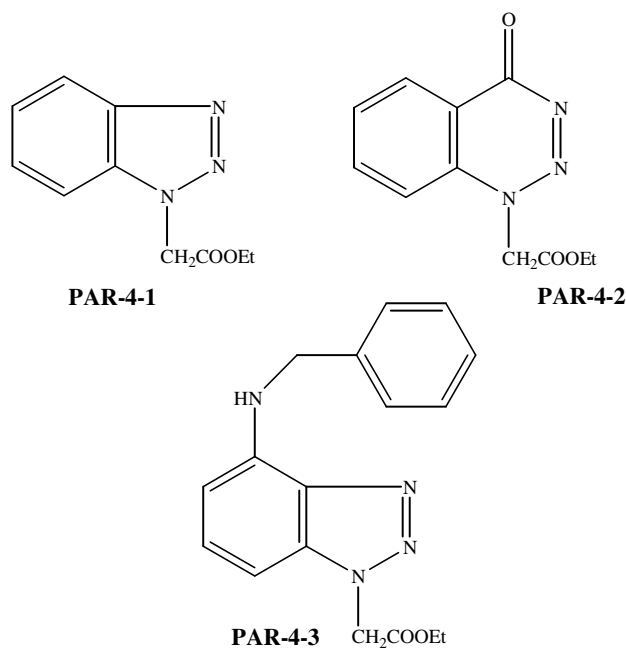


strutture analoghe in cui il nucleo indazolico è stato sostituito con strutture eterocicliche bioisostere.

E' stata, quindi, analizzata una libreria di 50 prodotti sintetizzati in precedenza dal gruppo di ricerca presso il quale ho lavorato e caratterizzati da molecole contenenti almeno un elemento strutturale comune con il composto di riferimento YD-3. Lo *screening* ha consentito di valutare la capacità di tali composti di inibire la mobilizzazione del  $Ca^{+2}$  intracellulare in maniera analoga a quanto era stato fatto per l'antagonista di riferimento. Il saggio biologico applicato ha previsto l'incubazione delle piastrine umane con DMSO (controllo; 0.5%) o con il composto in esame (20  $\mu$ M) a 37 °C per 3 minuti. Successivamente è stato aggiunto al mezzo l'induttore allo scopo di aumentare la concentrazione di calcio intracellulare.

Dall'analisi della suddetta libreria di composti è emerso che taluni derivati a nucleo benzotriazolico e benzotriazinonico<sup>24</sup> riuscivano in una certa misura a mimare l'effetto dell'antagonista YD-3.

Da tale *screening* i tre composti, riportati in figura 10, hanno evidenziato una certa significatività riguardo l'attività biologica valutata:



**Figura 10**

I tre composti presentano alcune analogie con il riferimento YD-3. Infatti, di volta in volta si ripropone almeno uno degli elementi strutturali caratterizzanti il composto YD-3.

Si può notare che nel prodotto **PAR-4-1** è infatti presente un nucleo eterociclico triazotato, di tipo benzotriazolico, mentre in YD-3 è presente un nucleo indazolico, sempre a 5 termini ma diazotato. Inoltre nel **PAR-4-1** è presente un gruppo etilestere, anche se collocato in posizione diversa rispetto all'antagonista di riferimento.

In maniera analoga si può osservare che nel composto **PAR-4-2** l'anello indazolico è stato sostituito nuovamente da un nucleo eterociclico triazotato, questa volta però di tipo benzotriazinonico. Anche in questo composto viene riproposto l'elemento strutturale di tipo etilestere presente in YD-3.

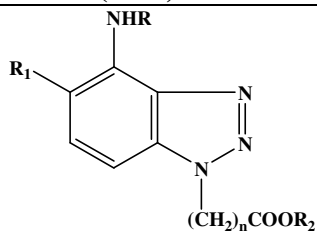
Nel composto **PAR-4-3** è presente l'anello eterociclico di tipo benzotriazolico, il gruppo etilestere e in aggiunta è presente anche un sostituente di tipo benzilico non legato però all'azoto dell'anello eterociclico, ma ad un gruppo aminico presente sull'anello benzenico.

In questa fase preliminare si è quindi cercato di comprendere meglio il ruolo svolto dal nucleo eterociclico nell'interazione con la controparte recettoriale e di capire quindi se tale struttura poteva essere sostituita con altre analoghe che potessero non solo ben adattarsi all'interno del recettore, ma dare anche un effetto farmacologico in qualche misura paragonabile a quello dell'antagonista di riferimento.

I derivati **PAR-4-1**, **PAR-4-2** e **PAR-4-3** hanno quindi rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di una nuova libreria di composti. In particolare la mia attenzione è stata rivolta all'approfondimento delle relazioni struttura-attività relative al composto **PAR-4-3** e allo sviluppo di analoghi del suddetto composto, di seguito riportati (tabella 7). Questi composti presentano il nucleo benzotriazolico e il sostituente benzilamminico variamente sostituito con gruppi elettron-donatori o elettron-attrattori.

Lo scopo di tali sostituzioni è stato quello di cercare di comprendere come l'interazione con la controparte recettoriale potesse venire influenzata dalla presenza di tali sostituenti.

**Tabella 7. composti PAR-4-(1-15)**

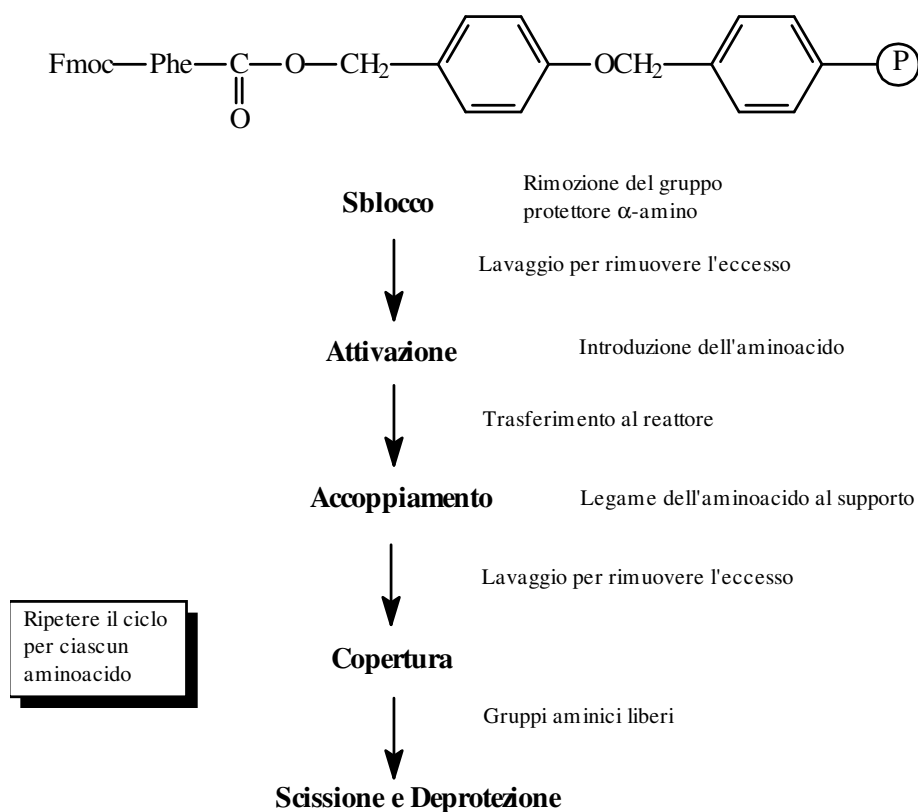


COMPOSTO	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	n
PAR-4-4	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-5		Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-6		OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-7		CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-8		OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-9		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-10		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-11		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-12		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1
PAR-4-13		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2
PAR-4-14		OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2
PAR-4-15		H	H	1

## **PARTE SPERIMENTALE**

## SINTESI DEI DERIVATI PEPTIDICI I-XIII

La sintesi dei peptidi è stata effettuata secondo una metodica in fase solida via Fmoc utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi Milligen 9050. E' stata impiegata una resina di tipo Rinkamide già derivatizzata con Fmoc-Phe-OH (grado di sostituzione 0.55 mmol/g).



schema 1

Lo schema precedente riassume sinteticamente quelli che sono i passaggi che caratterizzano la sintesi in fase solida.

Inizialmente si ha lo sblocco del gruppo Fmoc-, che protegge la funzione  $\alpha$ -aminica della Phe presente sulla resina, mediante una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Segue poi una fase di lavaggio per allontanare l'eccesso di piperidina usata. Subito dopo si ha la fase di

attivazione e accoppiamento dell'aminoacido successivo. Gli aminoacidi utilizzati sono stati tutti attivati mediante il metodo HOBt/TBTU.

Una volta completata la sintesi si lava la resina con diclorometano e si lascia seccare sotto vuoto per una notte. Completata questa operazione, si sblocca il peptide dalla resina mediante la seguente miscela: TFA:tioanisolo:triethylsilano:anisolo (90:5:3:2). La reazione di sblocco viene condotta a temperatura ambiente ed in atmosfera di argon per 2 ore. Si filtra la resina ed al filtrato viene aggiunto etere etilico anidro. Si ha così la precipitazione del peptide che viene recuperato mediante centrifugazione. Sui prodotti finali ottenuti si è proceduto alla purificazione ed alla caratterizzazione. Gli HPLC analitici sono stati realizzati attraverso un cromatografo liquido Waters 600 usando una colonna Vydac C<sub>18</sub> (250×4.5 mm; diametro delle particelle 5 µm). Il cromatografo in questione era munito di un detector UV, mentre la registrazione e la quantificazione dei dati cromatografici sono stati realizzati con un opportuno processore. Le determinazioni analitiche sono state fatte utilizzando un gradiente lineare di H<sub>2</sub>O + 0.1% di TFA e CH<sub>3</sub>CN + 0.1% di TFA come riportato in tabella 8.

<b>Tabella 8</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>
	<b>(H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA)</b>	<b>(CH<sub>3</sub>CN+0.1% TFA)</b>
Iniziale 1ml/min	100%	0%
25 minuti 1ml/min	50%	50%
30 minuti 1ml/min	100%	0%

La purificazione dei prodotti finali grezzi è stata condotta mediante HPLC preparativo a fase inversa (Water Delta Prep 4000, colonna Vydac C<sub>18</sub>, 300 Å, 50×250mm; particelle sferiche del diametro di 15-20 µm). Il gradiente usato è stato identico a quello visto per le determinazioni analitiche, con un flusso di 60 ml/min.

I prodotti così purificati sono stati quindi sottoposti a liofilizzazione. La caratterizzazione è stata realizzata mediante ESI-MS.

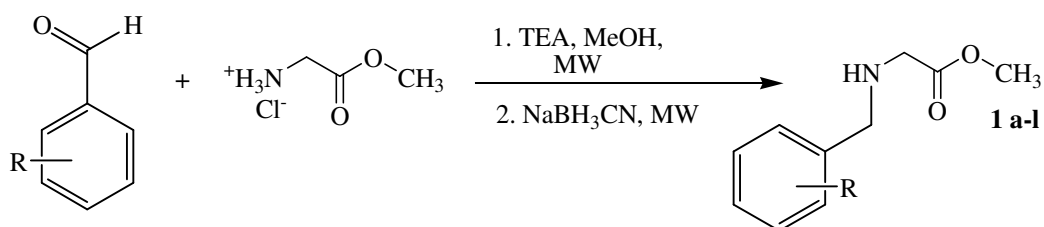
## **SINTESI DEI DERIVATI XIV-XXIII**

### *Sintesi derivati N-alcilglicine*

La sintesi parallela dei derivati aminoacidici modificati è stata condotta mediante alchilazione riduttiva della glicina metilestere cloridrato in presenza di dieci diverse aldeidi aromatiche commercialmente disponibili (figura 6).

Ogni reazione è stata condotta in un reattore specifico per la sintesi a microonde in un carosello “multiPREP” a 36 posizioni (Milestone®); gli altri reattori sono stati riempiti con lo stesso solvente di reazione (alcol metilico). La procedura sintetica, riassunta nello schema 2, 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 step di innalzamento della temperatura seguiti da step di riscaldamento a temperatura costante.





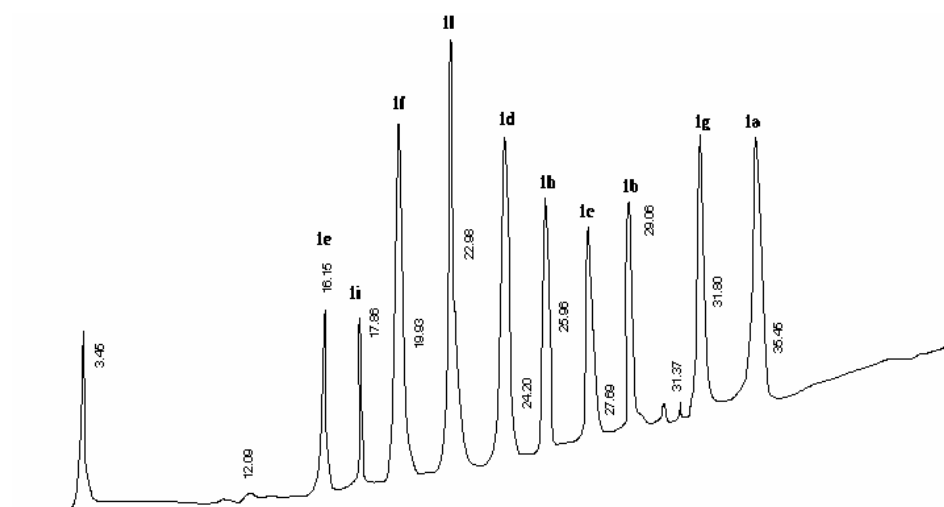
## Schema 2

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, che ha fornito i prodotti finali **1a-l** (figura 7) è stata condotta in 2 step di irradiazione con 300W di potenza, alla temperatura di 45°C in alcol metilico per un tempo totale di 15 minuti.

Questa condizione è considerata quella ottimale perché temperature, tempi o potenze più alte, non hanno fornito un ulteriore incremento delle rese o hanno dato luogo alla decomposizione dei reagenti. Dopo la sintesi, i composti finali sono stati caratterizzati mediante ESI-MS e <sup>1</sup>H-NMR ed i dati ottenuti hanno confermato le strutture ipotizzate.

Come punto di partenza per la procedura non-parallela, sono state miscelate quantità misurate dei singoli composti puri **1a-l** ottenuti precedentemente, e la miscela delle dieci aldeidi è stata analizzata mediante HPLC analitico, con lo scopo di trovare le migliori condizioni di eluizione che permettessero la separazione dei prodotti. La migliore condizione di eluizione per la determinazione analitica è stata ottenuta impiegando un gradiente lineare da 0 a 50% di acetonitrile +0,05% TFA in 50 minuti, impiegando un flusso di 1 mL/min.

Il cromatogramma ottenuto ha mostrato una separazione sufficiente fra i composti tanto da potere ipotizzare un'eventuale purificazione della miscela di prodotti mediante RP-HPLC preparativo (Figura 11).



**Figura 11**

***Procedura generale per la sintesi parallela della libreria di esteri metilici della glicina N-alchil sostituiti:***

Utilizzando un carosello “multiPREP” (Milestone®) con 36 reattori, la glicina metil estere cloridrato e l'aldeide appropriata sono state aggiunte ad ogni reattore e disciolte in alcol metilico. È stata quindi aggiunta una quantità equimolare di trietilamina. 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, i reattori sono stati aperti, ed è stato aggiunto un eccesso di NaBH<sub>3</sub>CN 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 i composti **1a-1b** ed **1f-1l** e contro-estratta con diclorometano. Per le aldeidi caratterizzate da un sostituente fenolico (**1c-1e**) 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 **1a-l**.

***Procedura generale per la sintesi non parallela della libreria di esteri metilici della Glicina N-alcil sostituiti:***

La glicina metilestere cloridrato e le 10 aldeidi sono state disciolte con alcol metilico in un pallone a due colli. È stata aggiunta una quantità equimolare di trietilamina 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 NaBH<sub>3</sub>CN 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 NaBH<sub>3</sub>CN. La miscela grezza è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata ed il solvente è stato allontanato a pressione

ridotta. La purificazione mediante RP-HPLC preparativo ci ha consentito di ottenere i composti puri **1a-l**.

I risultati ottenuti (tabella 9) mostrano che non c'è una differenza significativa tra le rese ottenute con la procedura sintetica parallela ed il metodo di sintesi non parallelo; sebbene una piccola riduzione delle rese sia evidenziabile nella sintesi non parallela; essa può essere associata alla maggior complessità della miscela grezza, nella quale la reattività delle aldeidi gioca un ruolo dominante.

<b>Tabella 9</b>		
	<i>Sintesi Parallela</i>	<i>Sintesi Non parallela</i>
<b>Comp.</b>	<i>Resa (%)</i>	<i>Resa (%)</i>
<b>1a</b>	32.3	29
<b>1b</b>	60.5	42.4
<b>1c</b>	27	21.3
<b>1d</b>	57.2	40.5
<b>1e</b>	28	18.8
<b>1f</b>	45.4	53.5
<b>1g</b>	70.4	57.5
<b>1h</b>	39.4	40.7
<b>1i</b>	63	50.4
<b>1l</b>	34.3	51.2

I residui aminoacidici non naturali così ottenuti sono stati inseriti nella sequenza del PAR4-AP.

#### *Sintesi dei derivati pseudopeptidici XIV-XXIII*

La sintesi dei peptidi è stata effettuata secondo il metodo in fase solida via Fmoc utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi Milligen 9050. E' stata impiegata una resina di tipo Rinkamide già derivatizzata con Fmoc-Phe-OH (grado di sostituzione 0.55 mmol/g). La sintesi, purificazione e caratterizzazione dei prodotti finali è stata condotta utilizzando la procedura e le condizioni impiegate per i derivati **I-XIII**.

## **SINTESI DEI DERIVATI XXIV-XXX**

### *Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico*

La sintesi è stata condotta utilizzando un forno a microonde (ETHOS 1600 Millestone) 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 step per il raggiungimento ed il mantenimento delle temperature impostate. La temperatura della miscela di reazione è stata monitorata attraverso l'utilizzo di una sonda fluorottica, virtualmente trasparente alle microonde, inserita direttamente nella soluzione.

La procedura di sintesi, così come descritta in tabella 10, prevede quanto segue: i Boc-aminoacidi sono stati fatti reagire con l'N,O-dimetildrossilamina cloridrata in una soluzione di DMF contenente DCC e DIEA.

Gli N,O-dimetildrossammati 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  $\text{LiAlH}_4$  a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  in THF anidro. Le aldeidi sono state conservate brevemente a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  o utilizzate immediatamente, a causa della loro scarsa stabilità. I legami peptidici ridotti sono stati invece ottenuti mediante alchilazione riduttiva del gruppo  $\text{N}^\alpha$ -aminico deprotetto con l'appropriata aldeide protetta, in presenza di  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  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.

L'incremento delle rese, come evidenziato in tabella 10, risulta attribuibile ad un aumento di temperatura (ad esempio 40,3% contro 47% passando da temperatura ambiente a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  mediante riscaldamento convenzionale per il composto  $\text{Boc-D-Phe-}\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{-Val-OCH}_3$  ma in ogni caso l'irraggiamento mediante microonde ha fornito rese nettamente più alte anche in condizioni di temperatura identiche (ad esempio 47% (riscaldamento convenzionale) contro 70% (riscaldamento mediante microonde) per lo stesso composto a  $45\text{ }^\circ\text{C}$ ).

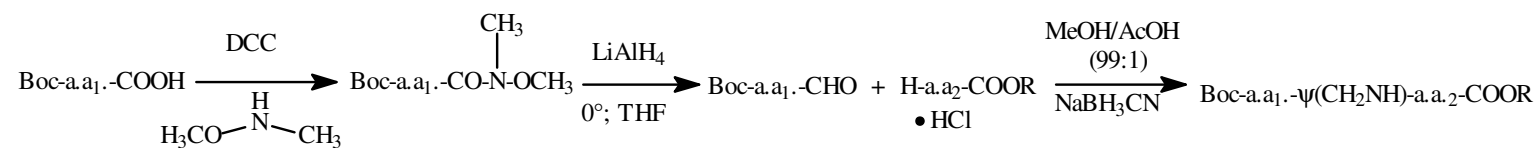
Per la sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico non è stato possibile sviluppare una strategia di sintesi senza solvente: è stato

notato, infatti, che i reagenti venivano decomposti durante il riscaldamento a microonde dopo appena 4 minuti; come supporti solidi sono stati testati l'allumina basica e la montmorillonite K-10.

Dai questi studi è inoltre emersa l'influenza dell'ingombro sterico della catena laterale degli amminoacidi nella sintesi degli idrossammati e nella reazione di alchilazione riduttiva. È stato infatti notato che, una catena laterale con sostituenti elettron-donatori nell'amminoacido C-terminale, come nel caso della valina o di aib, contribuisce ad ottenere rese più elevate rispetto al coupling con la glicina, nonostante l'ingombro sterico di tali catene laterali.

Al contrario quando aib è stato introdotto come amminoacido N-terminale nella sintesi degli N,O-dimetilidrossammati, la resa ottenuta è risultata più bassa rispetto al triptofano o alla D-fenilalanina. Pertanto, è possibile affermare che in tali condizioni l'ingombro sterico gioca un ruolo determinante.

**Tabella 10** – Rese e tempi di reazione per la sintesi mediante microonde di dipeptidi contenenti il legame metilenamminico.



a.a<sub>1</sub> = Trp, D-Phe, Aib      a.a<sub>2</sub> = Gly, Val, Aib

Composto	T.a.(23±2°C)		Riscaldamento convenzionale <sup>b</sup>			Irradiazione a microonde <sup>c</sup>		
	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (min.)	Temp. (°C)
<b>Boc-Trp-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	28.3	16	32	16	45	42	15	45
<b>Boc-Trp-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	24	1	36	1	45	60	9	45
<b>Boc-Trp-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	32	1	38	1	45	45	9	45
<b>Boc-D-Phe-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	39	16	41	16	45	46	15	45
<b>Boc-D-Phe-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	27.6	1	31	1	45	36	9	45
<b>Boc-D-Phe-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	40.3	1	47	1	45	70	9	45
<b>Boc-Aib-N(OCH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub></b>	18	16	20	16	45	26	15	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Gly-OCH<sub>3</sub></b>	18	1.5	26	1.5	45	34	9	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Val-OCH<sub>3</sub></b>	22	1.5	29	1.5	45	42	9	45
<b>Boc-Aib-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Aib-OCH<sub>3</sub></b>	24	1.5	32	1.5	45	40	<b>9</b>	45



***Procedura generale per la sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilenamminico)***

***Sintesi degli N,O-dimetilidrossammati***

Ad una soluzione in DMF di 1 equivalente di amminoacido N-protetto (Boc-aa<sub>1</sub>-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 10. 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.

***Sintesi delle N-Boc-amminoaldeidi***

Una soluzione di LiAlH<sub>4</sub> (5 equiv.) in THF anidro viene agitata a 0 °C e l'N,O-dimetilidrossammato viene aggiunto goccia a goccia. La reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 1 ora e successivamente viene aggiunta una soluzione acquosa di KHSO<sub>4</sub> (6

equiv.) seguita da 50 ml di etere di etilico. La fase organica viene separata ed estratta con HCl 1 M, NaHCO<sub>3</sub> al 5% ed una soluzione acquosa satura di NaCl. Si ottengono le amminoaldeidi protette come olii da utilizzare senza sottoporre ad ulteriori metodiche di purificazione.

#### ***Sintesi dei dipeptidi contenenti il legame metilnamminico***

L'aldeide (1 equiv.) viene disciolta in una miscela di CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH in rapporto 99:1 e l'amminoacido protetto sulla funzione carbossilica viene aggiunto goccia a goccia (H-aa<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, 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<sub>3</sub>CN (4 equiv.). La reazione viene agitata a temperatura ambiente oppure riscaldata mediante riscaldamento convenzionale o irraggiamento a microonde secondo quanto descritto in tabella 10. La reazione è stata poi raffreddata in un bagno di ghiaccio ed addizionata con 30 ml di una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> 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 controestratta 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.

#### ***Sintesi dei peptidi XXIV-XXX***

La sintesi dei peptidi è stata effettuata secondo il metodo in fase solida via Fmoc utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi Milligen 9050. La sintesi è stata effettuata dopo aver rimosso il gruppo Boc dal terminale aminico e aver protetto la suddetta funzione con il gruppo Fmoc. Anche per la sintesi di tali derivati è stata impiegata una resina di tipo Rinkamide già derivatizzata con Fmoc-Phe-OH (grado di sostituzione 0.55 mmol/g). La sintesi, purificazione e caratterizzazione dei prodotti finali è stata condotta utilizzando la procedura e le condizioni impiegate per i derivati **I-XIII**.

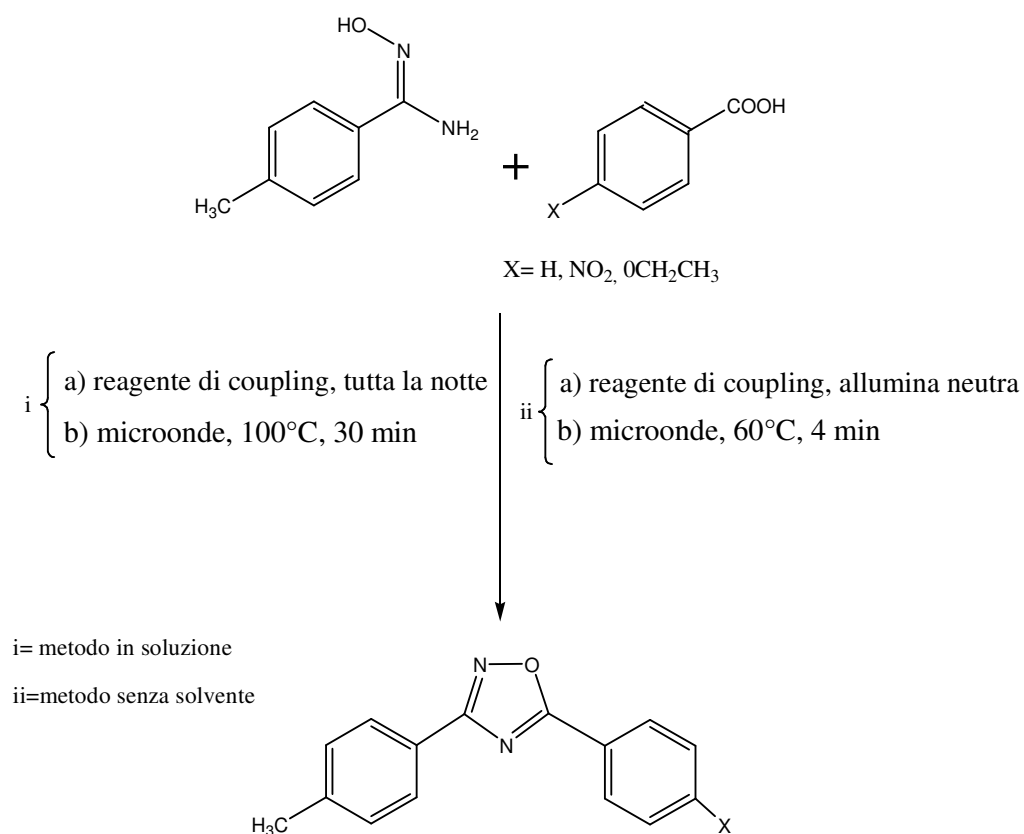
#### **SINTESI DEI DERIVATI 1,2,4-OXADIAZOLICI**

La sintesi di tali derivati è stata condotta secondo lo schema 3 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

ricadere 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 3.**

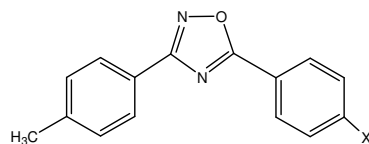
La mia attenzione è stata rivolta in prima istanza all'analisi dell'O-acilazione di una amidossima con alcuni acidi carbossilici in presenza di solvente, mediata da alcuni tra i più comuni reagenti di coupling, e della successiva reazione di ciclizzazione.

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

L'applicazione delle microonde consente una diminuzione notevole dei tempi 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-oxadiazolici.

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 11); inoltre risultano simili o addirittura più elevate rispetto ai metodo di riscaldamento convenzionale.

**Tabella 11. Rese e condizioni di sintesi dei derivati 1,2,4-oxadiazolici sia mediante riscaldamento convenzionale che con irradiazioni a microonde.**



Comp.	X	Reagente di coupling	Solvente <sup>c</sup>	Riscaldamento convenzionale <sup>b</sup>			Irradiazione a microonde <sup>d</sup>			Irradiazione a microonde senza solvente <sup>d</sup>			
				Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)	Tempo (min.)	Supporto solido	Tempo (min.)	Temp. (°C)	Resa <sup>a</sup> (%)
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	<b>CDI</b>	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 <sub>2</sub>	TBTU/HOBT	Diglyme	100	91	2	100	94	30	Allumina neutra	4	60	31
7	NO <sub>2</sub>	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

<sup>a</sup> Tutte le reazioni sono state eseguite 3 volte ed i tempi e le rese forniti corrispondono ai valori medi; <sup>b</sup> Bagno ad olio; <sup>c</sup> Tutte le reazioni sono state eseguite anche in

DMF e le rese ottenute sono sovrapponibili; <sup>d</sup> La potenza utilizzata con il solvente è di 300 W, mentre è di 600 W negli esperimenti senza solvente.

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

La purificazione dei prodotti è stata effettuata mediante cromatografia su colonna di gel di silice e successiva cristallizzazione. I parametri tempo, potenza e temperatura usati per l'irradiazione a microonde e le condizioni per il riscaldamento convenzionale sono riportati nella tabella 11. Tutti i composti sono stati caratterizzati mediante  $^1\text{H-NMR}$ . Dall'analisi dei risultati presenti in tabella 11 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 ( $\text{NO}_2$ , 94-91%). Tali effetti elettronici vengono confermati anche durante la procedura di sintesi senza solvente.



***Procedura generale per la sintesi dei derivati 1,2,4 oxadiazolici 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 Milestone) 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.

***Procedura generale per la sintesi dei derivati 1,2,4-oxadiazolici 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.

#### **SINTESI DEI DERIVATI XXX-XXXIV**

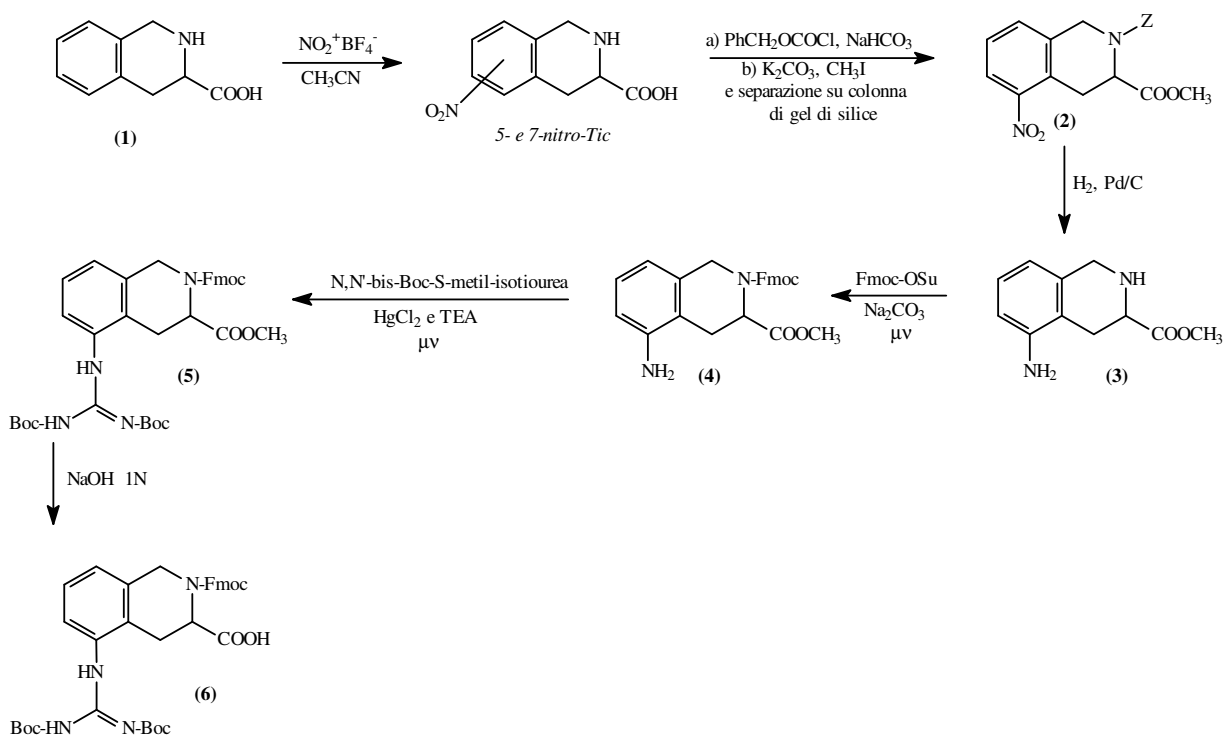
I peptidi sono stati sintetizzati seguendo le procedure classiche di sintesi peptidica in fase solida. L'aminoacido Tic (acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico) è disponibile commercialmente, mentre i residui 5,6,7 ed 8-GTic sono stati sintetizzati in accordo agli schemi 4, 5 e 6. Numerosi intermedi sono stati sintetizzati mediante irraggiamento a microonde.

### ***Procedura di sintesi di H-5-GTIC-OH***

La procedura sintetica, riassunta nello schema 4, inizia dall'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic **1**), disponibile in commercio, che viene trattato con nitronio tetrafluoroborato in acetonitrile per ottenere la miscela dei due regioisomeri 5 e 7-nitroTic-OH. 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 NaHCO<sub>3</sub> e la miscela così ottenuta, protetta sulla funzione amminica, è stata esterificata per trattamento con CH<sub>3</sub>I e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Il derivato Z-5-nitro-Tic-OMe (**2**) 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 (**3**). La successiva Fmoc-protezione del gruppo  $\alpha$ -aminico di 5-aminoTic-OMe (**3**), è ottenuta mediante trattamento con Fmoc-OSu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed irraggiamento a microonde. Il gruppo aminico viene convertito nella corrispondente struttura guanidinica (**5**) mediante reazione con la N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, HgCl<sub>2</sub> 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 (**6**).



**Schema 4**

### ***Procedura di sintesi di H-6 e 7-GTIC-OH***

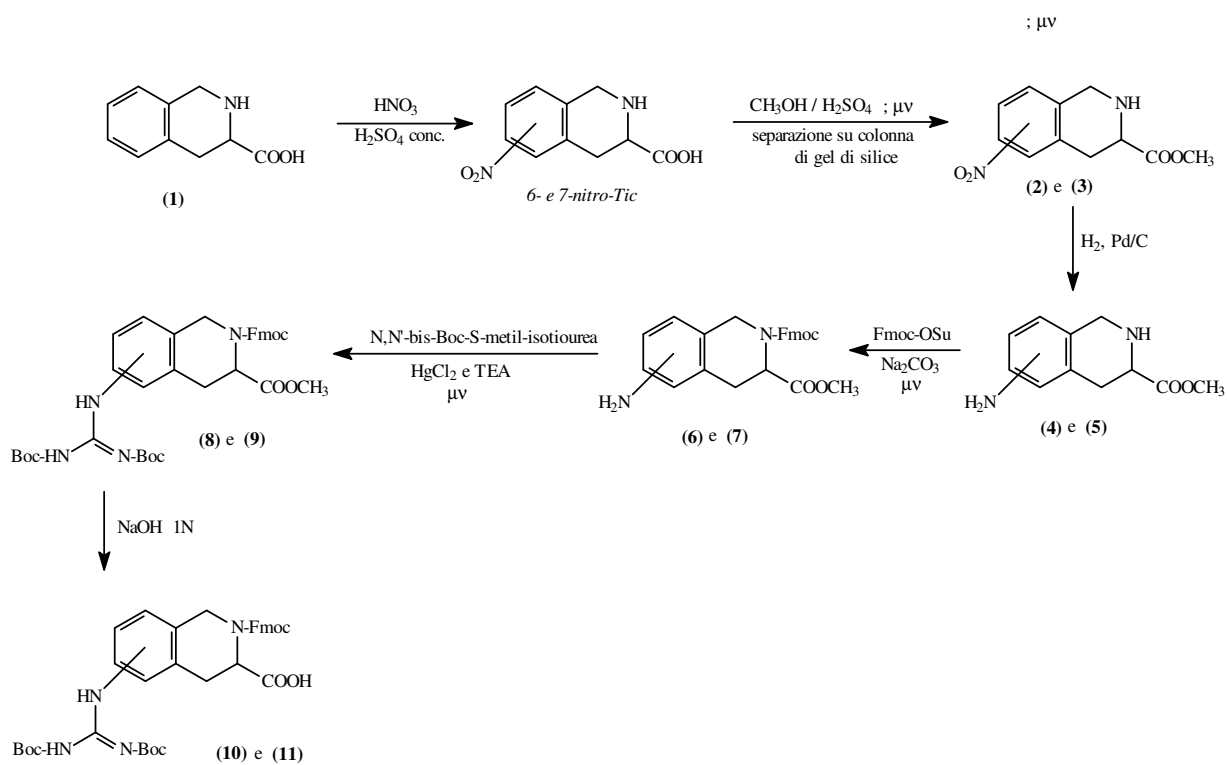
La procedura sintetica, riassunta nello schema 5, inizia dall'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (Tic **1**), disponibile in

commercio, che viene trattato con HNO<sub>3</sub> fumante e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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%.

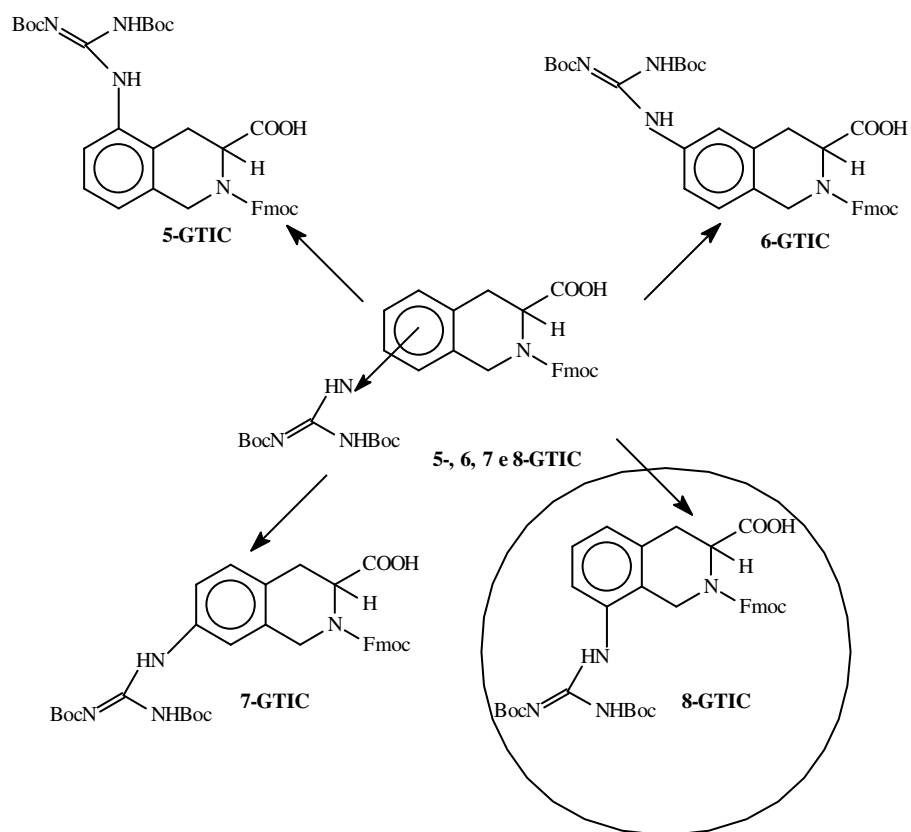
La posizione del gruppo nitro è stata stabilita usando metodiche NMR. La miscela, così ottenuta, è stata esterificata per trattamento con CH<sub>3</sub>OH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato fornendo i due derivati metilesteri (**2** e **3**) che sono stati separati mediante cromatografia su colonna di gel di silice.

La riduzione dei nitrocomposti ad ammine (**4** e **5**) è semplice (resa 98%), sebbene il prodotto finale debba essere protetto dall'aria per evitare l'ossidazione. La successiva Fmoc-protezione del gruppo α-aminico di 6 e 7-amminoTic-OMe (**4** e **5**), è ottenuta mediante trattamento con Fmoc-OSu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed irraggiamento mediante microonde. In queste condizioni, il gruppo aminico 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 aminico viene convertito nella

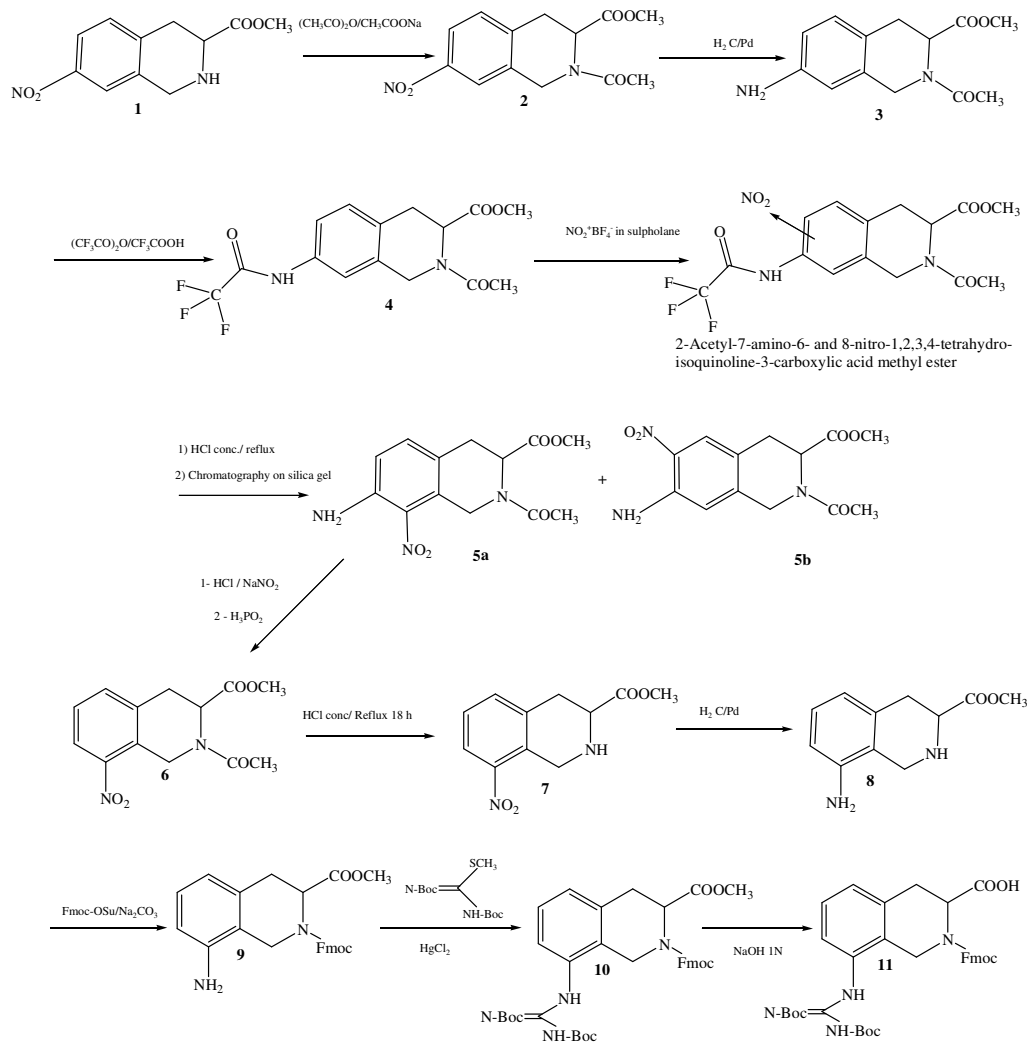
corrispondente struttura guanidinica (**8** e **9**) mediante reazione con la N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, HgCl<sub>2</sub> e TEA in DMF a 40 °C per 20 minuti mediante irraggiamento a microonde. La successiva idrolisi con NaOH 1N fornisce i derivati Fmoc-6 e 7-GTIC-OH (**10** e **11**).



**Schema 5**



**Figura 12**



**Schema 6**



La procedura di sintesi, riassunta nello schema 6 parte dall'estere metilico dell'acido 7-nitro-1,2,3,4-tetraidro-isochinolin-3-carbossilico (1). Il suddetto acido è stato protetto sull'azoto isochinolinico mediante acetilazione eseguita con acetato di sodio e anidride acetica (2).

La riduzione del nitro gruppo ad ammina (3) è stata eseguita con H<sub>2</sub> e C/Pd (resa del 95%), seguita da protezione dell'azoto con anidride trifluoroacetica (TFAA) in acido trifluoroacetico mediante microonde per un minuto (resa dell'85%) (3). Su questo intermedio (4) è stata applicata una nitrificazione non convenzionale con NO<sub>2</sub><sup>+</sup>BF<sub>4</sub><sup>-</sup> 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-NO<sub>2</sub> (5a e 5b) che sono stati separati con colonna cromatografia su gel di silice (schema 6; 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 dà il richiesto estere metilico dell'acido 8-nitro-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico (7).

La riduzione del nitrocomposto ad ammina (**8**) è stata portata avanti tramite idrogenazione catalitica con carbone palladiato al 10% (resa del 98%). Successivamente, la protezione con Fmoc del gruppo  $\alpha$ -aminico dell'8-amino-Tic-OCH<sub>3</sub> (**9**), è stata introdotta tramite trattamento con Fmoc-Osu in soluzione acquosa di carbonato di sodio ed irraggiamento mediante microonde.

Sotto queste condizioni, il gruppo aminico 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 (**10**) tramite la reazione con N,N'-bis-Boc-S-metil-isotiourea, HgCl<sub>2</sub> 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 (**11**) che è stato purificato con cromatografia su gel di silice usando una miscela etere dietilico/esano come eluente (resa del 58%).

Tutti i composti sono stati caratterizzati con <sup>1</sup>H-NMR e MS.

### *Sintesi dei peptidi XXX-XXXIV*

La sintesi dei peptidi è stata effettuata secondo il metodo in fase solida via Fmoc utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi Milligen 9050. E' stata impiegata una resina di tipo Rinkamide già derivatizzata con Fmoc-Phe-OH (grado di sostituzione 0.55 mmol/g). La sintesi, purificazione e caratterizzazione dei prodotti finali è stata condotta utilizzando la procedura e le condizioni impiegate per i derivati I-XIII.

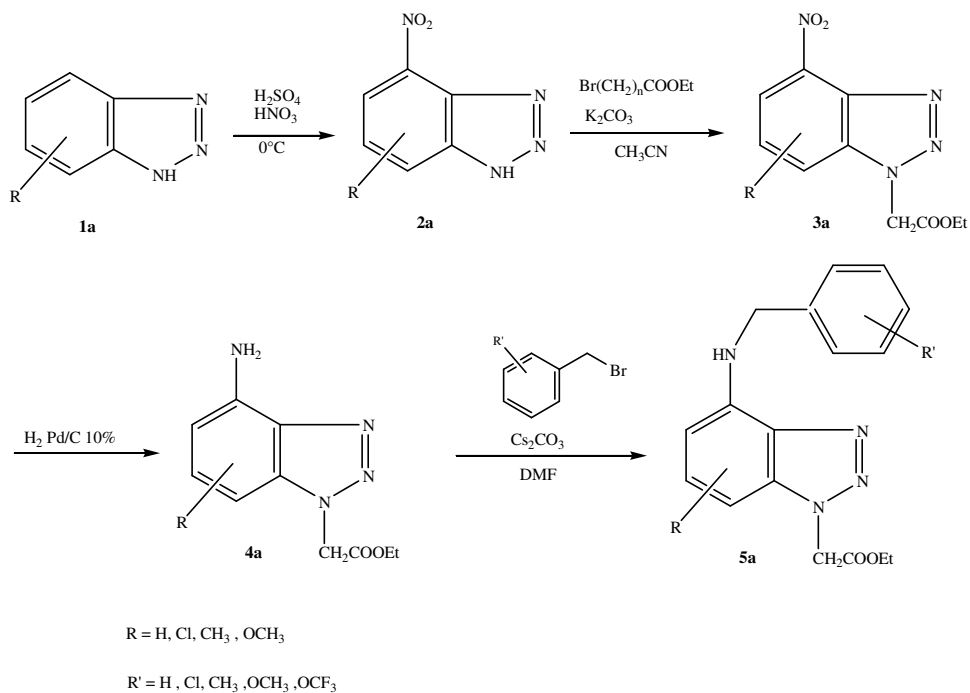
I peptidi finali deprotetti sono stati purificati mediante RP-HPLC preparativo usando una colonna Econosil C<sub>18</sub> (10μ, 22,5 x 250 mm) e due solventi: (A) acido trifluoroacetico TFA/H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrile ACN/H<sub>2</sub>O (1:900:100). La colonna è stata eluita con un flusso di 5 ml/min con un gradiente del 10 (o 30) – 50 (o 60)% di solvente B per 30 o 45 minuti. L'HPLC analitico è stato eseguito usando un sistema di HPLC binario con un detector SPD-10AV Shimadzu UV-VIS accoppiato ad una colonna Ultrasphere C<sub>18</sub> (5 μ, 4,6 x 150 mm) la quale è stata eluita con un sistema di solventi A<sub>1</sub> (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O 1:1000) e B<sub>1</sub> (ACN/H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 900:100:1) con una velocità di flusso di 1,7 ml/min e con un gradiente del 10-80% di B<sub>1</sub> per oltre 15 minuti. Il peso

molecolare e la purezza dei peptidi sintetizzati sono stati controllati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (TofSpec-E, Micromass) e mediante un analizzatore di aminoacidi Shimadzu LC-10 AVP.

### SINTESI DEI DERIVATI PAR-4-(1-15)

La sintesi dei prodotti è stata effettuata mediante una metodica in soluzione secondo lo schema di sintesi di seguito riportato.

#### *Sintesi dei derivati PAR-4-(3-15)*



schema 7

### ***Sintesi dell'intermedio 2a***

Il prodotto (**1a**) viene posto in un pallone a 2 colli in bagno di ghiaccio e ad esso si aggiunge l'acido solforico concentrato. L'acido nitrico viene successivamente aggiunto goccia a goccia. La reazione viene tenuta per circa 3 ore alla temperatura di -10 °C. La miscela grezza così ottenuta viene versata su acqua ghiacciata; si forma un precipitato che viene raccolto per filtrazione. Il prodotto viene successivamente purificato mediante cromatografia liquida su colonna utilizzando una miscela eluente 9:1 di etere/esano.

### ***Sintesi dell'intermedio 3a***

Il prodotto (**2a**) sciolto in acetonitrile viene posto in un pallone a 2 colli munito di refrigerante a ricadere. Si aggiunge carbonato di potassio e, mediante imbuto gocciolatore, il bromoacetato di etile. La miscela di reazione viene portata a ricadere e lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 3h. Il prodotto grezzo che si ottiene da tale procedura, viene purificato mediante cromatografia liquida su colonna utilizzando una miscela eluente 8:2 etere/esano.

### *Sintesi dell'intermedio 4a*

L'intermedio (**3a**) viene posto in un pallone a due colli munito di refrigerante a ricadere; lo si scioglie in DMF e si aggiunge il carbonato di cesio. Infine si aggiunge bromuro di benzile e si porta la miscela a 60 °C sotto agitazione elettromagnetica per circa 2 ore. Trascorso tale tempo la miscela di reazione viene evaporata sotto vuoto; il residuo grezzo sciolto in diclorometano e poi estratto con H<sub>2</sub>O distillata.

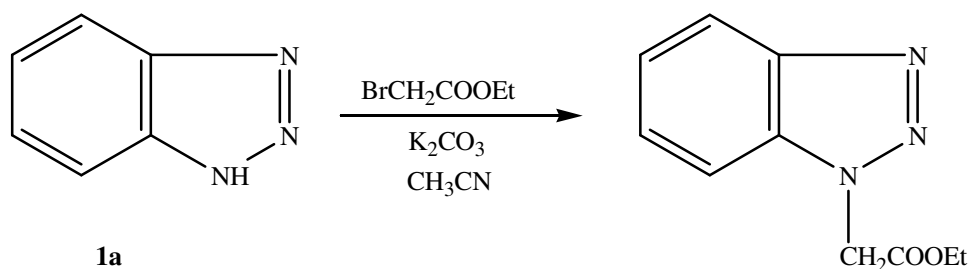
Il prodotto grezzo così ottenuto viene purificato mediante cromatografia liquida su colonna e poi cristallizzato da etere.

Il prodotto finale e tutti gli intermedi sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa (LCQ-MS-Thermoquest-Ion-Trap) e mediante spettroscopia <sup>13</sup>C-NMR.

I derivati **PAR-4-13**, **PAR-4-14** e **PAR-4-15** sono stati sintetizzati secondo una procedura analoga utilizzando al posto del reattivo bromoacetato di etile, rispettivamente il bromopropionato di etile, il bromobutirrato di etile e l'acido bromoacetico.

Di seguito è riportata anche la sintesi dei prodotti di riferimento **PAR-4-1** e **PAR-4-2**.

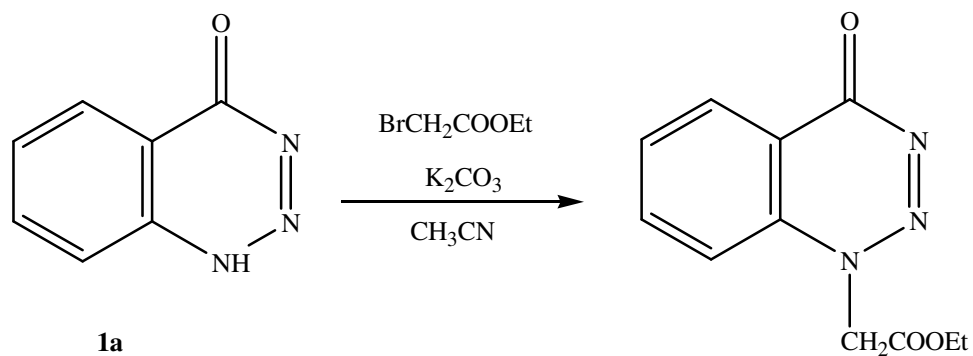
*Sintesi del derivato PAR-4-1*



**Schema 8**

Il prodotto (**1a**) sciolto in acetonitrile viene posto in un pallone a 2 colli munito di refrigerante a ricadere. Si aggiunge carbonato di potassio e, mediante imbuto gocciolatore, il bromoacetato di etile. La miscela di reazione viene portata a ricadere e lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 3h. Il prodotto grezzo che si ottiene da tale procedura, viene purificato mediante cromatografia liquida su colonna utilizzando una miscela eluente 8:2 etere/esano. Il derivato **PAR-4-1**, così ottenuto è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa (LCQ-MS-Thermoquest-Ion-Trap) e mediante spettroscopia NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

*Sintesi del derivato PAR-4-2*



**Schema 9**

Il prodotto (**1a**) sciolto in acetonitrile viene posto in un pallone a 2 colli munito di refrigerante a ricadere. Si aggiunge carbonato di potassio e, mediante imbuto gocciolatore, il bromoacetato di etile. La miscela di reazione viene portata a ricadere e lasciata sotto agitazione elettromagnetica per circa 3h. Il prodotto grezzo che si ottiene da tale procedura, viene purificato mediante cromatografia liquida su colonna utilizzando una miscela eluente 8:2 etere/esano. Il derivato **PAR-4-2**, così ottenuto è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa (LCQ-MS-Thermoquest-Ion-Trap) e mediante spettroscopia NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**RISULTATI**  
**E**  
**DISCUSSIONE**

### **SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI I-XIII**

La sperimentazione farmacologica è stata condotta presso il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale di questa Facoltà dal gruppo del Prof. Giuseppe Cirino, in collaborazione con il Dipartimento di Fisiologia dell'Università di Siena.

I saggi farmacologici sono stati condotti su fibroblasti di polmone di ratto deficienti di PAR-1, i quali sono stati stabilmente trasfettati con c-DNA codificante per il PAR-4 umano (KOLF-PAR4) o per il PAR-1 (KOLF-PAR1). Queste cellule sono state utilizzate per condurre saggi funzionali finalizzati a valutare l'attività agonista.

Cellule KOLF non trasfettate non hanno mostrato alcuna risposta né in seguito ad attivazione da parte della trombina né dei peptidi testati; quindi la responsività delle cellule KOLF-PAR1 e KOLF-PAR4 dipende rispettivamente dal PAR-1 e dal PAR-4.

In questi saggi si è andati a valutare il rilascio di inositolo trifosfato da linee cellulari KOLF stabili, che esprimono il PAR-4 umano o il PAR-1. L'attività agonista è stata valutata come indice dell'idrolisi del fosfoinositide indotta dall'agonista. Cellule KOLF non trasfettate non hanno mostrato alcuna risposta ai peptidi e all' $\alpha$ -trombina.

I risultati ottenuti sono stati espressi come risposte percentuali in seguito a somministrazioni di concentrazioni 30 $\mu$ M di  $\alpha$ -trombina determinate in ogni esperimento. Concentrazioni 30 $\mu$ M di  $\alpha$ -trombina hanno determinato un aumento da 7 a 16 volte dell'idrolisi del fosfoinositide in cellule che esprimono il PAR-1 ed un aumento da 10 a 36 volte in cellule che esprimono il PAR-4. I peptidi sono stati utilizzati a concentrazioni di 500 $\mu$ M. Esperimenti analoghi sono stati condotti anche utilizzando linee cellulari RAT-1 stabilmente trasfettate con PAR-4 umano. Questi studi hanno dato risultati molto simili a quelli ottenuti per le linee cellulari KOLF, come riportato in tabella 12.

**Tabella. 12 Risultati farmacologici dei peptidi I-XIII**

Sequenza peptidica	PAR-4 Peptide/ $\alpha$ -trombina (%)	PAR-1 Peptide/ $\alpha$ -trombina (%)
<b>GYPGKF</b>	55±4.9	0
<b>SFLLRN</b>	0	120±4.7
<b>AYPGKF</b>	92±4	0
<b>SYPGKF</b>	92±4.3	0
<b>TYPGKF</b>	21±0.5	0
<b>MprPGKF</b>	0	0
<b>GFPGKF</b>	53±4.5	35±2.5
<b>GpF-PhePGKF</b>	61±18	111±19.5
<b>GYAGKF</b>	4±0.3	4±4.0
<b>GYPAKF</b>	21±6.0	16±4.5
<b>GYPLKF</b>	4±0.5	106±9.0
<b>GYPIKF</b>	3±0.0	41±5.0

In linee cellulari esprimenti il PAR-4, concentrazioni 30 $\mu$ M di  $\alpha$ -trombina hanno determinato un aumento di circa 18 volte dell'idrolisi del fosfoinositide. Cellule non trasfettate non hanno mostrato alcuna risposta significativa.

Mediante questi saggi è stato confermato che il peptide AYPGKF è dotato di un maggiore potere agonista rispetto a GYPGKF. Infatti

concentrazioni di 30, 100 e 500  $\mu\text{M}$  di AYPGKF determinano rispettivamente un aumento dell'attività della trombina del 72, 101 e 116%. Allo stesso modo analoghe concentrazioni di GYPGKF determinano un aumento del 4, 30 e 92%.

Dai dati riportati in tabella si evince che i due peptidi SYPGKF e AYPGKF sono più potenti rispetto al peptide nativo GYPGKF nello stimolare l'idrolisi dei fosfoinositidi mediata dal PAR-4. Poiché le cellule sono state esposte all'agonista per 60 min nel saggio di idrolisi del fosfoinositide, è possibile l'aumento di attività del peptide sia dovuto ad una maggiore stabilità nelle colture cellulari. Al fine di approfondire la specificità di questi peptidi è stata valutata la capacità di aumentare le concentrazioni di calcio intracellulari nelle linee cellulari KOLF-PAR1 e KOLF-PAR4. Queste cellule sono state incubate con fura-2/AM e hanno mostrato un aumento dei livelli di calcio citoplasmatico in risposta a concentrazione di 30 nM di  $\alpha$ -trombina. I peptidi AYPGKF e SYPGKF sono stati utilizzati in concentrazione di 500  $\mu\text{M}$  e sono stati misurati fluorometricamente. Le sequenze AYPGKF e SYPGKF determinano un aumento dei livelli di calcio citoplasmatico nelle cellule KOLF-PAR4; i livelli di calcio citoplasmatico indotti da AYPGKF sono simili a quelli

indotti dalla trombina in queste cellule. AYPGKF e SYPGKF inducono ridotte risposte nelle cellule KOLF-PAR1. Per contro la sequenza SFLLRN induce la mobilizzazione del calcio nelle cellule KOLF-PAR1 e non nelle KOLF-PAR4 (figura 13).

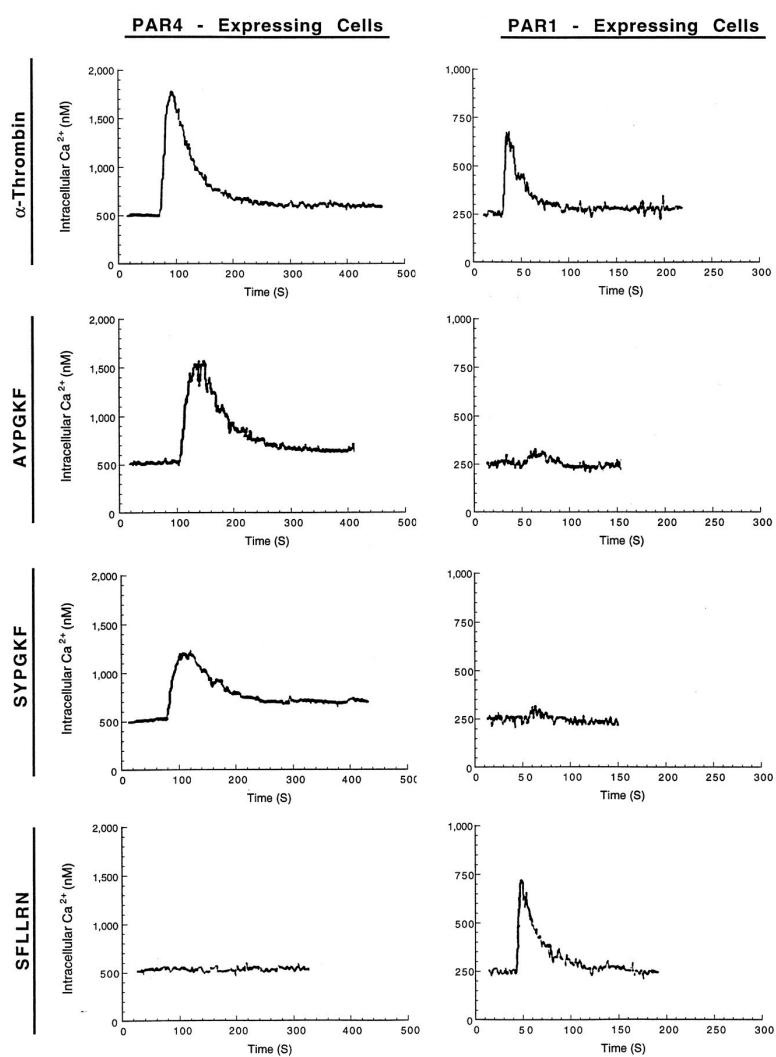


Figura 13

Quindi la sequenza GYPGKF ha mostrato un'attività di agonista parziale per il PAR-4, anche a concentrazioni 500  $\mu\text{M}$  la sequenza GYPGKF induce solo circa il 50% della risposta massima indotta dalla trombina. Contrariamente le sequenze AYPGKF e SYPGKF hanno mostrato un'attività di agonisti pieni con valori di  $\text{EC}_{50}$  rispettivamente di 20 e 50  $\mu\text{M}$ . Allo stesso modo il peptide AYPGKF induce la stimolazione del calcio nelle cellule KOLF-PAR4 con valori di  $\text{EC}_{50}$  approssimativamente di 25  $\mu\text{M}$ , mentre sono richieste concentrazioni superiori a 200  $\mu\text{M}$  del peptide GYPGKF per indurre una risposta simile.

Mediante questi saggi è stato evidenziato che la sostituzione della Gly in posizione 1 con un Ala o Ser determina un aumento della attività agonista per il PAR-4. La sostituzione con una Thr causa la diminuzione dell'attività di agonista per il PAR-4. Questi dati suggeriscono che nella posizione 1 sono preferiti aminoacidi che presentano in catena laterale piccoli gruppi alifatici. La sostituzione della Ser con l'acido mercaptopropionico nel peptide SFLLRN elimina quasi del tutto l'attività di agonista per il PAR-1. Allo stesso modo la sostituzione della Gly con l'acido mercaptopropionico nel peptide GYPGKF determina una diminuzione della funzione di agonista.

Il gruppo aminoterminale protonato del peptide SFLLRN è critico per la funzione di agonista per il PAR-1. Allo stesso modo il gruppo aminico protonato nel peptide GYPGKF è critico per l'attività di agonista per il PAR-4.

Così come per la sequenza SFLLRN del PAR-1, anche per la sequenza GYPGKF la presenza in posizione 2 di un aminoacido che presenta un gruppo aromatico in catena laterale è determinante per l'attività del peptide stesso. La sostituzione della Tyr in posizione 2 con la Phe o con la *p*-F-Phe non determina una diminuzione dell'attività di agonista PAR-4 ma causa un rimarchevole aumento dell'attività sul PAR-1. Ciò dimostra che la presenza della Tyr in posizione 2 nella sequenza GYPGKF determina la sua specificità per il PAR-4 rispetto al PAR-1

La sostituzione con l'Ala della Pro in posizione 3 o della Gly in posizione 4 del peptide GYPGKF determina una sostanziale perdita dell'attività di agonista per il PAR-4.

La Pro e la Gly sono spesso trovate in una conformazione  $\beta$ -turns; così la Pro in posizione 3 e la Gly in posizione 4 potrebbero essere importanti per la conformazione necessaria per l'attività di agonista.



Infine la sostituzione della Gly in posizione 4 con la Leu o Ile determina un aumento dell'attività di agonista per il PAR-1, ma causa anche una diminuzione dell'attività di agonista per il PAR-4.

#### **SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI XIV-XXIII**

I saggi biologici preliminari hanno permesso di valutare la capacità dei composti sintetizzati di interferire con la produzione di IFN- $\gamma$  (interferone- $\gamma$ ).

Gli interferoni sono delle potenti citochine che possiedono attività antivirale, immunomodulatrice ed antiproliferativa.

Queste proteine vengono sintetizzate dalle cellule in risposta a vari induttori e provocano variazioni biochimiche che portano all'instaurarsi di uno stato antivirale all'interno di una cellula della stessa specie.

Nello specifico l'IFN- $\gamma$  possiede una potente azione immunomodulatrice e la sua attività biologica viene di norma espressa come misura dell'effetto antivirale osservato in colture cellulari e generalmente, viene espressa come unità internazionali (*International Units*, IU) relative a standard di riferimento.

L'attività antagonista è stata misurata mediante valutazione del rilascio di IFN- $\gamma$  utilizzando uno specifico saggio ELISA commerciale.

### ***Saggi cellulari in vitro***

I saggi farmacologici sono stati condotti su cellule polimorfonucleate umane in colture isolate da sangue periferico. Tali cellule sono state stimulate con PHA (fitoemoagglutimina), una citochina in grado di stimolare la produzione di IFN- $\gamma$ , in presenza dell'agonista PAR-4-AP (Gly-Tyr-Pro-Gly-Gln-Val-CONH<sub>2</sub>) e degli antagonisti.

Il PHA è una sostanza mitogena in grado di stimolare la divisione cellulare. In presenza di questa sostanza i linfociti, contenuti nelle gocce di sangue intero aggiunto alle provette contenenti terreno di coltura, si dividono ed in media alla settantaduesima ora raggiungono il massimo indice mitotico.

I saggi sono stati effettuati anche incubando le cellule direttamente con gli antagonisti.

I saggi biologici sono stati condotti su cellule mononucleate di sangue umano periferico (PBMC). Tali cellule sono state isolate da sangue

venoso eparinizzato di volontari sani mediante un gradiente di linfolita /H (Cedarlane Labs, Ontario, Canada).<sup>28</sup>

I gradienti sono stati centrifugati a 400 giri e le PBMC sono poi state rimosse dall'interfaccia, lavate due volte e risospese in un mezzo privo di siero (RPMI-1640, EUROCLONE, DEVON, UK). Il preparato di PBMC contiene solo linfociti (circa 90%) e monociti (circa 10%), come determinato dal flusso di analisi citometrica. Le PBMC sono state incubate nel mezzo privo di siero ( $10^5$  cellule/100  $\mu$ L) in delle piastre a 96 pozzetti (COSTAR, MA) a 37°C in presenza delle concentrazioni indicate dei peptidi sintetici. Dopo un'ora, a 100  $\mu$ l del mezzo vengono addizionati 5 $\mu$ g/ml di FCS inattivate dal calore (Hyclone UT) e l'incubazione viene proseguita in presenza di 5  $\mu$ g/ml di fitoemoagglutinina (PHA; Biochrom KG, Berlin, D). I surnatanti sono stati ottenuti dopo 16-18 ore di incubazione ed aliquote di tali surnatanti sono state congelate a -20°C prima di essere utilizzati per il saggio ELISA.

Le concentrazioni di interferone- $\gamma$  sono state stimate nei surnatanti di cellule PBMC mediante un saggio ELISA utilizzando delle piastre a fondo piatto, degli anticorpi monoclonali commercialmente disponibili e

dei reagenti ELISA ad elevate prestazioni. Successivamente le piastre sono state analizzate a 450 nm mediante un rivelatore Titerek Multiskan. La minima quantità rilevabile era inferiore di 5pg/ml.

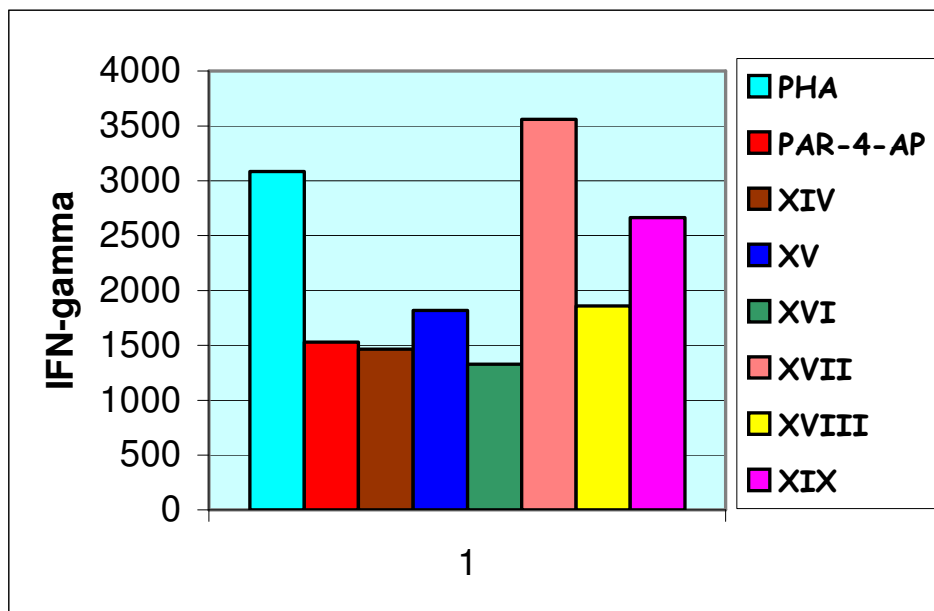
Per questi composti si è andati a valutare la capacità di ripristinare la produzione di IFN- $\gamma$ . La produzione di IFN- $\gamma$  viene espressa in pg/ml.

Dalla figura 11 si nota che quando le cellule vengono incubate solo con PHA si ha un aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , l'incubazione con l'agonista PAR-4-AP determina una diminuzione di tale produzione, infine l'incubazione delle cellule con gli antagonisti sintetici induce un ripristino, se non un incremento della concentrazione di IFN- $\gamma$ .

Tra i composti testati quello che inizialmente ha dato i risultati più promettenti è stato il composto **XVII**. Tale composto somministrato ad una dose di 55  $\mu$ M, non solo ripristinava la produzione di IFN- $\gamma$ , ma ne determinava addirittura un aumento. Contestualmente si è notato però che il risultato ottenuto per tale composto (3560 pg/ml) era caratterizzato da una SEM molto elevata che poteva quindi influenzare la fondatezza del risultato ottenuto. Risultati piuttosto interessanti si sono ottenuti anche dai composti **XV**, **XVIII**, **XIX** che hanno fornito dei valori di IFN- $\gamma$

rispettivamente di 1819 pg/ml, 1858 pg/ml, 2666 pg/ml come mostrato in tabella 13.

<b>Tabella 13. Risultati farmacologici dei composti XIV-XIX</b>			
<b>M</b>	<b>COMPOSTO</b>	<b>IFN <math>\gamma</math> (pg/ml)</b>	<b>SEM</b>
55 $\mu$ M	PHA	3086	2
55 $\mu$ M	PAR-4-AP+PHA 5 $\mu$ g/ml	1528	7
55 $\mu$ M	<b>XIV</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1466	38
55 $\mu$ M	<b>XV</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1819	31
55 $\mu$ M	<b>XVI</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1327	13
55 $\mu$ M	<b>XVII</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	3560	274
55 $\mu$ M	<b>XVIII</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1858	76
55 $\mu$ M	<b>XIX</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	2666	58



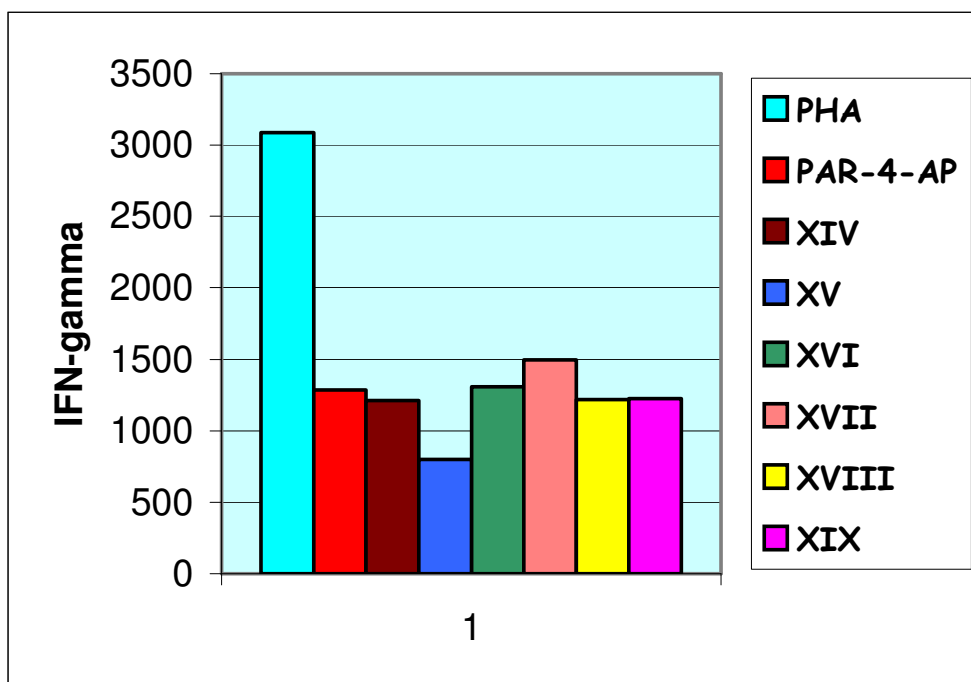
**Figura 14**

I saggi biologici sono stati effettuati anche incubando le cellule con una concentrazione maggiore di peptide sintetico per verificare l'ipotesi di un effetto dose dipendente.

Tutti i composti testati ad una concentrazione pari a 110  $\mu$ M, mostrano un andamento omogeneo, con dei risultati paragonabili fra di loro; si nota inoltre un decremento della produzione di IFN- $\gamma$  a conferma dell'ipotesi avanzata.

Ad una dose di 110  $\mu$ M (Figura 15) il composto risultato leggermente più attivo anche in questo caso è il **XVII**, con un valore di IFN- $\gamma$  pari a 1497 pg/ml. Tale dato è caratterizzato da una SEM molto più bassa

rispetto a quanto riscontrato nella prima analisi sebbene sempre maggiore rispetto a quella degli altri composti della stessa serie (tabella 14).



**Figura 15**

I risultati relativi ai prodotti **XX-XXIII** non sono ancora in nostro possesso.

<b>Tabella 14. Risultati farmacologici dei composti XIV-XIX</b>			
<b>M</b>	<b>COMPOSTO</b>	<b>IFN <math>\gamma</math> (pg/ml)</b>	<b>SEM</b>
110 $\mu$ M	PHA	3086	2
110 $\mu$ M	PAR-4-AP+PHA 5 $\mu$ g/ml	1286	14
110 $\mu$ M	<b>XIV</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1211	2
110 $\mu$ M	<b>XV</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	800	1
110 $\mu$ M	<b>XVI</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1309	9
110 $\mu$ M	<b>XVII</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1497	138
110 $\mu$ M	<b>XVIII</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1220	7
110 $\mu$ M	<b>XIX</b> +PHA 5 $\mu$ g/ml	1224	51

I prodotti **XXIV-XXXIV**, caratterizzati rispettivamente dalla presenza del legame metilenaminico e degli aminoacidi non naturali derivanti dall'acido L-1,2,3,4-tetraidroisochinolin-3-carbossilico sono ancora in corso di sperimentazione farmacologica.



### SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI PAR-4-(1-15)

Anche per i prodotti PAR-4-(1-15), i saggi biologici hanno permesso di valutare la capacità dei composti sintetizzati di ripristinare la produzione di IFN- $\gamma$ , ed i risultati ottenuti sono riportati in figura 16. Nelle cellule incubate solo con PHA si nota un aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , la somministrazione dell'agonista PAR-4-AP determina, invece, una diminuzione di tale produzione.

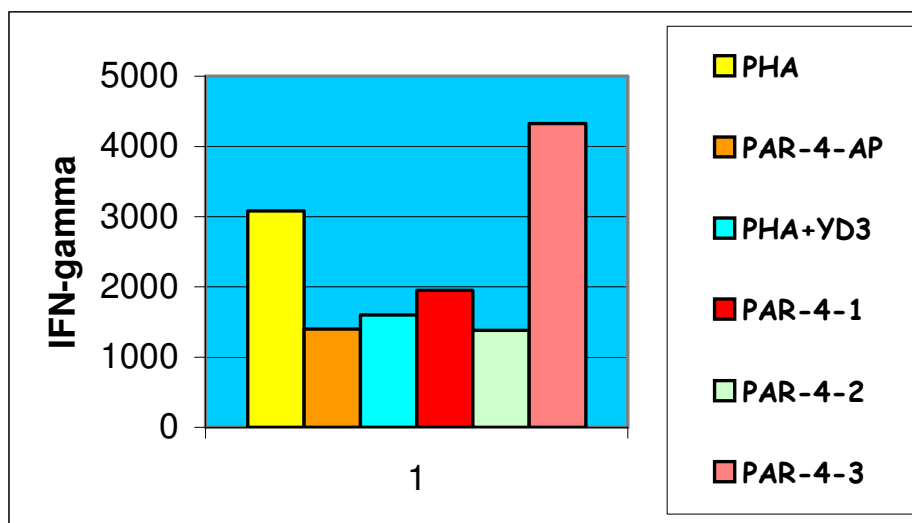
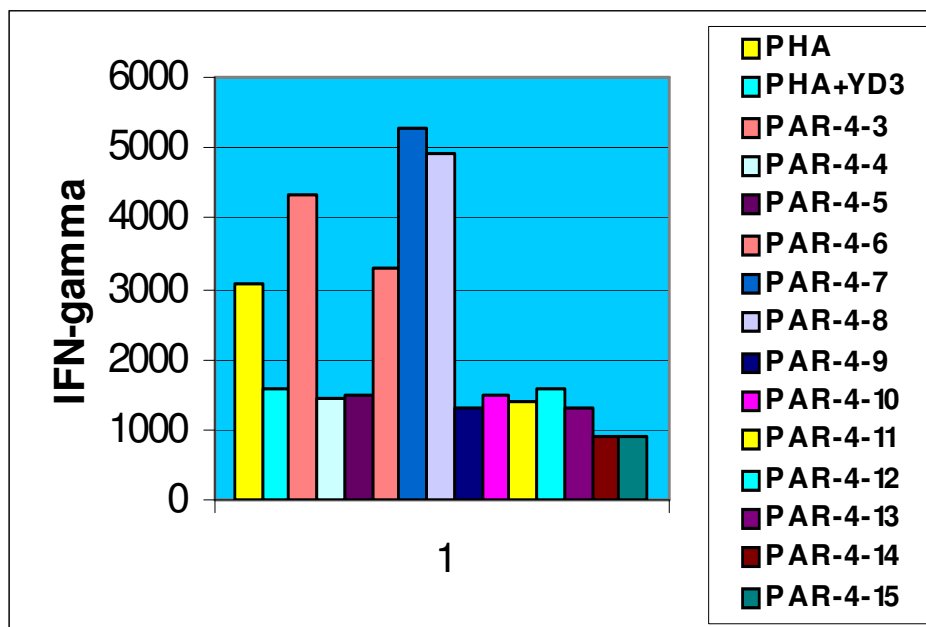


Figura 16

In maniera sorprendente si può notare che i composti sintetizzati non sono solo in grado di ripristinare la produzione di IFN- $\gamma$  ma addirittura ne determinano un aumento. Il composto risultato più attivo è il **PAR-4-3** che presenta il nucleo benzotriazolico derivatizzato con un sostituente benzilamminico.

I risultati farmacologici relativi ai composti **PAR-4-4** **PAR-4-15** sono riportati in figura 17.

Per quanto concerne questa seconda serie i composti risultati più attivi sono il **PAR-4-6**, il **PAR-4-7** e il **PAR-4-8** che presentano un gruppo funzionale a rilascio elettronico situato in posizione *orto* rispetto al sostituente benzilamminico.



**Figura 17**

La presenza di un gruppo elettron-donatore favorisce probabilmente, l'interazione di tipo  $\pi$  con la controparte recettoriale.

Il derivato **PAR-4-7** risulta addirittura più attivo del *lead compound* **PAR-4-3**. I derivati **PAR-4-9**, **PAR-4-10**, **PAR-4-11** e **PAR-4-12** che presentano il nucleo benzilamminico funzionalizzato hanno invece dato risultati nettamente inferiori. Ciò probabilmente è dovuto ad un effetto di ingombro sterico esercitato dal sostituente.

I **PAR-4-13**, **PAR-4-14** e **PAR-4-15** non hanno mostrato un'attività significativa.

## **CONCLUSIONI**

Questi studi preliminari hanno permesso di definire le caratteristiche strutturali necessarie ai fini di un'interazione selettiva con il recettore PAR-4.

Così come era stato notato per il PAR-1-AP, SFLLRN, anche nel caso del PAR-4-AP è di fondamentale importanza la presenza di un residuo aromatico in posizione 2; più specificamente la selettività per il suddetto recettore è data da un residuo di Tyr. Infatti la sostituzione di questo amminoacido con un residuo di Phe o *p*-F-Phe determina un brusco calo dell'attività sul PAR-4 ed un aumento dell'attività sul PAR-1.

L'importanza del nucleo aromatico si ripropone anche nei composti peptidomimetici ad attività antagonista. All'interno della serie dei composti **XIV-XXIII** infatti, il composto più attivo è risultato essere il **XVII** che in posizione 2 presenta un residuo di N-(3-OH, 4-OCH<sub>3</sub>)Phe, che, data la presenza del nucleo aromatico e del gruppo ossidrilico, richiama fortemente la struttura del residuo di Tyr.

Infine per quanto concerne gli antagonisti di natura eterociclica, più attivi sono risultati i composti che presentano un gruppo elettron-donatore in *orto* rispetto al sostituente aromatico. La presenza di tali sostituenti

sembrerebbe favorire un'interazione di tipo  $\pi$  con la controparte recettoriale.

In conclusione, sulla base dei risultati farmacologici ottenuti, gli sviluppi futuri saranno mirati all'approfondimento delle relazioni struttura-attività per la progettazione di nuovi composti in grado di antagonizzare selettivamente il recettore PAR-4.

#### **-+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- Hung D. T., Vu T. H. K., Wheaton V. I., Ishii K., Coughlin S. R.. *J. Clin. Invest.*, **1992**, 89, 1350-1353.
- 7- Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., Ishihara H., Coughlin S. R.. *J. Clin. Invest.*, **1999**, 103, 879-887.
- 8- 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.

- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- Ma L., Perini R., McKnight W., Dicay M., Klein A., Hollemberg MD., Wallace J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2005**; 102,(1) 216-220.
- 12- Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R. *Cell*, **1991**, 64, 1057-1068.
- 13- Vu T. K., Wheaton V. I., Hung D. T., Charo I., Coughlin S. R. *Nature*, **1991**, 353, 674-677.
- 14- Nanevicz T., Ishii M., wang L., Chen M., Turck C. W., Cohen F. E., Coughlin S. R.. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 21619-21625.
- 15- Jaques S.L., Kuliopulos A., *Biochem. J.* **2003**, 376; 733-740
- 16- Hoxie J. A., Ahuja M., Belmonte E., Pizarro S., Parton R., Brass L. F.. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13756-13763.
- 17- Bohm S. K., Khithin L. M., Grady E. F., Aponte G., Payan D. G., Bunnet N. W.. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 22003-22016.



- 18- 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.
- 19- Kong W., McConalogue K., Hollenberg M. D., Payan D. G., Bohm S. K., Bunnet N. W.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94.
- 20- Wu C.C., Hwang T.L., Liao C.H., Kuo S.C., Lee F.Y., *Thromb. Haemost.*; **2003**; (9); 299-308
- 21- Henrikse R.A., Hanks V.K.; *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.*; **2002**; (22); 861-66
- 22- Buresi M.C., N. Vergnolle, Keenan C.M., Andrade-Gordon P., Cirino G., Cirillo D., Hollemberg M.D., Mac Naughton W.K.; *Am. J. Of Physiol. GI section*; **2005**; 288 (2, Pt. 1), G337-G345
- 23- Chin-Chung Wu, et al; *Br.J.Pharm.*; **2000**; (130). 1289-1296 ;
- 24- Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Fiorino F., Severino B., Cirillo D., Terracciano S., Caliendo G; *J.Comb. Chem*, **2005**; 7; (4); 618-21
- 25- Santagada V., Frecentese F., Fiorino F., Cirillo D., Perissutti E., Severino B., Terracciano S., Caliendo G; *QSAR & Combinatorial Science*; **2004**; 23 (10); 899-901

- 26- Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Cirillo D., Fiorino F., Terracciano S., Caliendo G; *Biorg & Med. Chem. Lett.*; **2004**; 14;4491-4493
- 27- Severino B., Santagada V., Frecentese F., Perissutti E., Terracciano S., Fiorino F., Cirillo D., Salvadori S., Balboni G., Caliendo G.; *Synthesis*; **2004**; 18; 3011-3016
- 28- Caliendo G., Fiorino F., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Meli R., Mattace Raso G., Zanesco A., De Nucci G.; **1999**; *Eur.J. Med. Chem.*; 34 (12); 1043-1051
- 29- Naldini A.A., Aarden L., Pucci A., Bernini C., Carraio F., *British J. Pharmacol.*, **2003**, 140; 980-986