

Indice

Parte I: Ligandi al Recettore Benzodiazepinico Centrale (CBR)

I.1- Introduzione	pag. 1
I.1.1- Struttura e funzionalità recettoriali	pag. 2
I.1.2- Sottotipi recettoriali Bz/GABA_A	pag. 4
I.1.3- Metodologie utilizzate per la valutazione degli effetti farmacologici dei sottotipi recettoriali del GABA_A	pag. 8
I.1.4- Ligandi a recettore Bz/GABA_A	pag. 14
I.1.5- Modelli di interazione Ligande-Recettore	pag. 24
I.2- Progetto della Ricerca	pag. 28
I.3- Parte Chimica	pag. 30
I.4- Relazioni Struttura-Affinità/Attività	pag. 41
I.5- Parte Sperimentale	pag. 46
I.5.1- Parte Sperimentale Chimica	pag. 46
I.5.2- Parte Sperimentale Biologica	pag. 53

Parte II: Ligandi al Recettore Benzodiazepinico Periferico o Traslocator Protein (TSPO)

II.1- Introduzione	pag. 55
II.1.1- Struttura	pag. 57
II.1.2- Funzioni del TSPO nei processi fisiologici e patologici	pag. 60
II.1.3- Ligandi al TSPO	pag. 81
II.1.4- Modelli di interazione Ligande-Recettore	pag. 91
II.1.5- Positron Emission Tomography	pag. 94
II.2- Progetto della Ricerca	pag. 101
II.3- Parte Chimica	pag. 105
II.4- Relazioni Struttura-Affinità/Attività	pag. 126
II.5- Parte Sperimentale	pag. 135
II.5.1- Parte Sperimentale Chimica	pag. 135
II.5.2- Parte Sperimentale Biologica	pag. 157

Parte III: Sistemi triciclici e tetraciclici policondensati contenenti il nucleo pirazolico nella ricerca di agenti anti-Leishmania.

III.1- Introduzione	pag.159
----------------------------	---------

III.1.1- Etiologia	pag. 160
III.1.2- Infezione e patogenesi	pag. 162
III.1.3- Trattamenti terapeutici	pag. 164
III.1.4- Ricerca Farmaceutica	pag. 165
III.2- Progetto della Ricerca	pag. 167
III.3- Parte Chimica	pag. 169
III.4- Relazioni Struttura-Affinità/Attività	pag. 176
III.5- Parte Sperimentale	pag. 177
III.5.1- Parte Sperimentale Chimica	pag. 177
III.5.2- Parte Sperimentale Biologica	pag. 183
Bibliografia	pag. 184
Allegati	pag. 195

I.1- Introduzione

L'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il più abbondante neurotrasmettitore inibitorio del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e molti processi fisiologici sono modulati dal sistema recettoriale gabaergico. L'azione inibitoria del GABA si contrappone all'azione eccitatoria del glutammato ed in particolare la mutua azione dei due neurotrasmettitori è responsabile della corretta omeostasi del SNC e del mantenimento delle sue naturali funzioni. E' noto che quando a livello del SNC si crea uno squilibrio tra attività inibitorie ed eccitatorie possono verificarsi disordini psico-fisici di vario genere, come alterazioni della pressione, sedazione, ansia e disturbi del sonno. Proprio per questa ragione, il recettore GABA_A ha destato molto interesse come target terapeutico per il trattamento di disordini del SNC.

Questo recettore canale è il target di una ampia varietà di importanti farmaci come benzodiazepine, barbiturici, steroidi neuroattivi, anticonvulsivanti ed anestetici.

Le benzodiazepine avendo dimostrato di essere farmaci sicuri (è raro che diano narcosi o morte), ben tollerati, efficaci anche a basse dosi (ne è consentito l'uso anche per periodi prolungati), incapaci di indurre tossicodipendenza o grave tolleranza, incapaci di produrre depressione generalizzata del SNC, hanno sostituito i barbiturici fino ad allora usati come ansiolitici.

Attualmente ce ne sono in commercio molti tipi con diverse proprietà, per questo possono essere impiegate nel trattamento dell'insonnia^{1,2}, degli stati d'ansia^{3,4}, degli attacchi di panico^{5,6}. Più recenti sono gli usi come anticonvulsivanti, miorilassanti e anestetici (in particolare nella preanestesia).

Queste sostanze, nonostante le ottime proprietà farmacologiche da cui sono caratterizzate, presentano alcuni effetti collaterali (spesso sono un'esasperazione dell'effetto clinico ricercato) come sedazione^{7,8}, atassia, interazione con alcool, condizionamenti motori e amnesia anterograda.

Negli ultimi anni è stato scoperto che le subunità e la composizione del recettore del GABA, tramite cui hanno il loro effetto farmacologico, differiscono a seconda delle diverse aree del SNC in cui si trovano⁹. Gli studi degli ultimi anni si sono concentrati sulla ricerca di molecole altamente selettive per ottenere un'azione farmacologica mirata con riduzione degli effetti collaterali.

I.1.1- Struttura e funzionalità recettoriale

Intorno alla metà degli anni '60, viene evidenziato che il GABA determina un aumento della conduttanza agli ioni cloruro, che si traduce in una iperpolarizzazione della membrana postsinaptica ed in una conseguente minore eccitabilità.

I sistemi gabaergici che mediano l'effetto del GABA sono di tre tipi: GABA_A, GABA_B e GABA_C, classificati in base alla loro farmacologia, meccanismo d'azione e struttura molecolare. I recettori GABA_A e GABA_C appartengono alla famiglia dei recettori canale (LGIC: Ligand Gated Ion Channel), mentre il recettore GABA_B fa parte dei recettori accoppiati alle proteine G¹⁰.

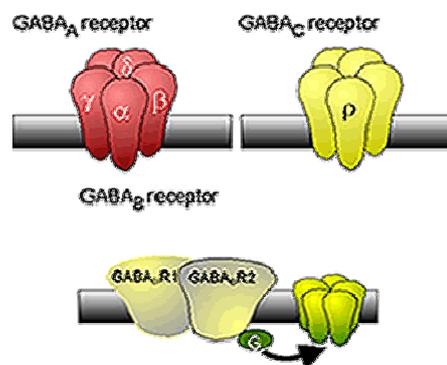


Fig. I.1- GABA_A, GABA_B, GABA_C: tre diversi tipi di recettori gabaergici nella membrana neuronale.

• GABA_A

Il recettore GABA_A è un complesso sovramolecolare a struttura pentamerica, composto da 5 subunità proteiche^{11,12} che vanno a formare il canale per gli ioni cloruro; il recettore inoltre contiene molti siti di legame, tra i quali quelli per benzodiazepine e barbiturici.

L'attivazione di questo recettore riduce l'eccitazione cellulare, determinando inibizione neuronale attraverso un'iperpolarizzazione della membrana. Nella risposta che si genera dall'attivazione di questo recettore si rilevano meccanismi pre- e post-sinaptici.

Le benzodiazepine si legano con alta affinità e specificità ai recettori GABA_A ma la loro azione non è diretta: sono definite "modulatori allosterici positivi" del recettore. In pratica le benzodiazepine, interagendo col proprio sito di legame, incrementano la frequenza di apertura del canale ionico generando un'inibizione neuronale sia per iperpolarizzazione di membrana, sia per blocco della depolarizzazione: potenziano l'azione del GABA ma non hanno effetto in assenza del neurotrasmettitore (perciò sono definite modulatori allosterici).

I recettori $GABA_A$ fanno parte della superfamiglia dei recettori a canale ionico come il recettore nicotino, glicinergico e il $5-HT_3$, con i quali la sequenza aminoacidica del $GABA_A$ mostra un'affinità pari al 20-30%.

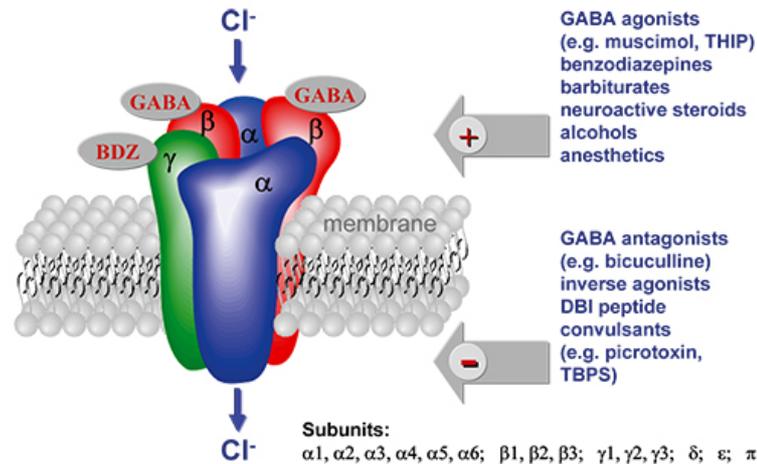


Fig. I.2- Rappresentazione schematica del recettore $GABA_A$ con i suoi siti di legame ortosterici ed allosterici¹³.

• $GABA_B$

Il recettore $GABA_B$ è definito “metabotropico”: i suoi effetti sono dipendenti dall’attivazione della proteina G e portano ad un aumento della conduttanza della membrana neuronale al K^+ e ad una diminuzione della conduttanza al Ca^{2+} . E’ ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale e soprattutto nel midollo spinale, ma è anche diffuso a livello periferico. Infatti è presente sulle cellule muscolari lisce dell’utero, intestino, vescica, corteccia renale e cellule interstiziali dei testicoli.

I recettori sono stati identificati e clonati: sono formati da due subunità $GABA_{(B1)}$ e $GABA_{(B2)}$ (prima conosciute come GBR1 e GBR2) che unendosi tramite le loro estremità carbossi-terminali danno luogo a recettori funzionali.

Le due subunità possiedono una larga porzione N-terminale extracellulare caratterizzata da due domini globulari e sembra che la chiusura di questi due domini determini l’attivazione del recettore dopo che si è legato l’agonista. I recettori $GABA_B$ sono attivati da agonisti di sintesi, come il Baclofen, utilizzato nel trattamento della spasticità muscolare. Anche se il ruolo dei recettori $GABA_B$ rimane da chiarire, potrebbero essere coinvolti nel controllo degli stati epilettici, nel potenziamento dei farmaci antidepressivi, nella riduzione dei sintomi da abuso di cocaina oppure potrebbero trovare impiego nei disturbi della psiche¹⁴.

• $GABA_c$

Il recettore $GABA_c$ è un recettore canale per gli ioni cloruro, formato da subunità oligomeriche ρ_{1-3} . E’ espresso principalmente in specifiche popolazioni di neuroni della retina, nell’assone terminale e nei

dendriti delle cellule bipolari. Questo recettore è insensibile ai ligandi Bicucullina e Baclofen ed è invece sensibile ad un analogo rigido del GABA, il CACA (acido cis-4-aminocrotonico). E' classificato nella superfamiglia dei recettori canale nicotinici ed è insensibile alle benzodiazepine perché è sprovvisto delle subunità α e γ_2 . Il recettore GABA_C è inserito in una fitta rete di regolazione neurologica a livello della retina.

I recettori GABA_A e GABA_C sono caratterizzati da importanti differenze elettrofisiologiche: la molecola del GABA ha un'affinità sette volte maggiore per i recettori GABA_C rispetto ai recettori GABA_A e inoltre i GABA_C sono più sensibili al GABA; un altro dato rilevante è che la stimolazione del recettore GABA_C comporta un passaggio di ioni cloruro più lento ma più prolungato e sostenuto rispetto alla stimolazione dei recettori GABA_A¹⁵.

I.1.2- Sottotipi recettoriali Bz/GABA_A

Nel 1996 Johnston ha descritto i recettori GABA_A come "i più complicati della superfamiglia dei recettori ionotropici attivati da ligandi, in termini del largo numero di sottotipi e anche della varietà di sostanze che interagiscono con i siti specifici del recettore stesso". Al posto di recettore, più frequentemente, si parla di complesso recettoriale.

Questo complesso recettoriale contiene numerosi siti di regolazione allosterica, Johnston stesso ne individuò 11 (negli ultimi anni se ne sono aggiunti altri):

1. sito degli agonisti del GABA, riconosciuto anche dagli antagonisti competitivi;
2. sito della picrotossina, TBPS e Ro-54864;
3. sito dei barbiturici ipnotico-sedativi;
4. sito delle benzodiazepine;
5. sito dei neurosteroidi;
6. sito dell'etanolo;
7. sito degli anestetici;
8. sito della furosemide;
9. sito di alcuni cationi bivalenti (Zn^{2+});
10. sito del La^{3+} ;
11. sito dei fosfolipidi;
12. sito di fosforilazione coinvolgente l'attività di specifiche proteine chinasi;
13. sito coinvolto nell'interazione tra i recettori GABA_A e i microtubuli, che ancorano gli stessi alla membrana postsinaptica.

La diversa combinazione delle 5 subunità proteiche ne determina le proprietà farmacologiche e elettrofisiologiche. Sono state sequenziate e clonate dal sistema nervoso di mammiferi 19 subunità (6α , 3β , 3γ , 1δ , 1ϵ , 1π , 1θ , 3σ). Tutti questi polipeptidi possiedono approssimativamente una massa molecolare di circa 50 kDa¹⁶ e sono strutturalmente correlati tra loro. Ogni subunità presenta 4 domini idrofobici transmembranali, TM1-TM4, ciascuno di circa 20 aminoacidi.

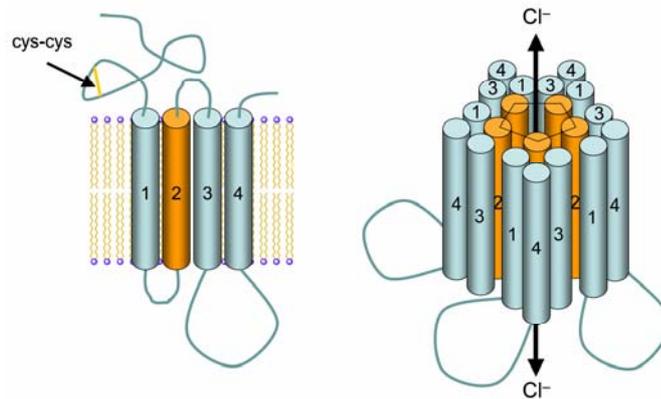


Fig. I.3- Struttura pentamerica del recettore canale GABA_A.

Ogni subunità presenta una grande regione extracellulare (porzione TM1) che contiene molti potenziali siti di glicosilazione e un caratteristico “cys-loop” formato da un legame a ponte disolfuro tra la Cys 138 e la Cys 152. Questa regione è molto importante perché vi risiedono parte dei siti di legame per gli agonisti gabaergici e il sito di legame delle benzodiazepine. Il dominio TM2 di ciascuna subunità forma il canale ionico. La proteina attraversa il doppio strato lipidico della membrana quattro volte e poi si trova una grande ansa intracellulare che è localizzata tra la TM3 e la TM4. Questa è la zona maggiormente diversa nella sequenza aminoacidica fra le varie subunità; questo “loop” è caratterizzato dai siti di fosforilazione che sono necessari per la regolazione del recettore (sono il substrato delle proteine chinasi AMPc dipendenti). La porzione NH₂-terminale è legata al dominio TM1 mentre la parte C-terminale al TM4¹⁰.

I recettori gabaergici a livello del SNC, che sono situati su interneuroni deputati al controllo della dinamica e della sincronia neuronale, influiscono grazie alla loro attività inibitoria sul complesso sistema di oscillazioni nervose. L’attività di tanti interneuroni del SNC è quindi sotto regolazione del sistema gabaergico e dipende anche dalla tipologia di sottotipi recettoriali espressi a livello sinaptico o extrasinaptico; per esempio, sulle cellule piramidali dendritiche dell’ippocampo esiste un sistema di regolazione sinaptica dove le subunità interessate sono di tipo α_1 e α_2 .

L’omologia all’interno di ogni classe di subunità è circa del 60-80% (per esempio tra α_1 e α_2) mentre tra una classe e l’altra è del 30-40% (α e γ)¹⁷.

E' stata descritta anche la distribuzione delle varie subunità: la più diffusa è la α_1 che è concentrata maggiormente nella corteccia e in altre parti del SNC, come il cervelletto mentre è meno abbondante nell'ippocampo.

La subunità α_2 è invece presente in differenti aree quali bulbo olfattivo, striato, ippocampo e nuclei basali, mentre è poco diffusa nel talamo.

La subunità α_3 si trova nel bulbo olfattivo, nella corteccia, nel talamo e nella amigdala; la α_4 è concentrata nel talamo e nel bulbo.

Le strutture dove si trova maggiormente la subunità α_6 sono le cellule granulari del cervelletto e la coclea, mentre è del tutto assente nell'ipotalamo e nella corteccia. La subunità α_5 , invece, è l'unica tra le subunità α ad essere presente soprattutto a livello extrasinaptico¹⁸; i recettori contenenti questa subunità sono collocati strategicamente alla base delle spine di innervazione di tipo glutamminergico NMDA, allo scopo di modulare e sincronizzare i processi che regolano gli "input" eccitatori¹⁹.

Le subunità β sono largamente rappresentate in tutte le zone del cervello: la β_1 e la β_2 soprattutto nell'ippocampo, mentre a livello di cervelletto e corteccia prevale la subunità β_2 . La subunità γ_1 è diffusa soprattutto nell'amigdala e nei nuclei del setto, la γ_2 è abbondante in molte regioni mentre la γ_3 è presente nella corteccia e nei nuclei basali. Le subunità δ sono poco diffuse e si trovano principalmente nelle cellule granulari, nel talamo e nella zona bulbare. Anche le subunità ϵ sono presenti in bassa concentrazione e occupano prevalentemente ipotalamo e ippocampo. Le combinazioni fra subunità α , β , δ e fra α , β , ϵ danno origine a recettori insensibili alle benzodiazepine.

La subunità π è stata rintracciata in molti organi periferici umani, soprattutto nell'utero e in combinazione con α , β e γ crea sottotipi recettoriali che presentano una buona conduttanza agli ioni cloruro ma anche insensibilità alle benzodiazepine.

L'ultima subunità scoperta è stata la θ ²⁰ che è espressa nella substantia nigra e nello striato.

Molto particolari sono le subunità ρ ^{21,22} le quali si assemblano in modo del tutto originale, mostrando le proprietà caratteristiche dei recettori GABA_C²⁰.

L'esistenza di molteplici subunità può dare origine teoricamente a migliaia di sottotipi recettoriali diversi. In realtà si è visto che i sottotipi principalmente espressi sono solo una ventina.

La maggioranza dei recettori è composta da 1γ , 2β e 2α . La presenza della subunità γ all'interno del recettore GABA_A è necessaria per la formazione del sito di legame benzodiazepinico che è localizzato all'interfaccia tra una subunità α e una γ .

La combinazione più rappresentata è quella $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ ^{12,16} con stechiometria $2\alpha_12\beta_21\gamma_2$, si trova in tutto il SNC e costituisce circa il 60% di tutti i recettori GABA_A. Pentameri che coinvolgono α_2 e α_3 sono meno abbondanti (rappresentano circa il 35% del totale) e la loro espressione è maggiore con β_2 , β_3 e γ_2 .

Non è ancora noto se entrambi le subunità α o soltanto una, contengano i siti di legame per le benzodiazepine, probabilmente vi è una subunità attiva e una farmacologicamente inattiva (teoria degli "space receptors").

I cambiamenti conformazionali benzodiazepino-indotti nel dominio transmembranale incrementano la reattività delle cisteine facenti parte della subunità α nel segmento TM3.

E' stato dimostrato, realizzando una subunità mutante α_1 (si sono sostituite le cisteine con paracloromercurbenzensolfonato) e trattando il recettore modificato con Diazepam, che le due subunità α hanno distinte conformazioni nello stato di legame del recettore col Diazepam; di conseguenza è stato ipotizzato che il Diazepam alteri soltanto l'affinità del GABA in uno dei due siti di legame e cioè alteri una delle conformazioni delle due subunità α presenti nel recettore funzionale.

In accordo con questa ipotesi sono i dati cinetici del canale dello ione cloruro che indicano che le benzodiazepine incrementano soltanto l'affinità di binding della prima molecola di GABA. Sapendo che il sito di legame per le benzodiazepine si trova all'interfaccia α - γ ^{16,21}, è immediato supporre che la subunità α attivata dal Diazepam sia quella adiacente alla subunità γ . Questo spiega inequivocabilmente perché le benzodiazepine siano incapaci di aprire i recettori GABA_A da sole. Ne consegue che se il recettore fosse costituito da 2α , 2γ e 1β la funzionalità per le benzodiazepine sarebbe raddoppiata o comunque sensibilmente diversa, per la presenza di due interfaccia α - γ e una sola interfaccia α - β ²²⁻²⁷.

Nel sito di legame per le benzodiazepine, all'interfaccia delle subunità α e γ , sono stati identificati diversi aminoacidi importanti per le interazioni ligande-recettore: quelli determinanti sembrano essere l'His 102, la Gly 201 nelle subunità α , la Ph 77, la Met 130²⁸ e la Thr 142²⁹ nelle γ . L'His 102 interagisce con il pendaglio fenilico del Diazepam, del Flunitrazepam e delle altre 5-fenilbenzodiazepine; tale aminoacido è assente nelle α_4 ed è sostituito dall'Arg 100 nelle α_6 . Queste differenze rendono le subunità α_4 e α_6 insensibili alle classiche benzodiazepine, perciò chiamate Diazepam-Insensitive (DI). Nelle subunità α_1 , gli aminoacidi che sembrano principalmente coinvolti nel sito di legame delle benzodiazepine sono l'His 101³⁰, la Tyr 159³¹, la Thr 162, la Gly 200³², la Val 201; sulle subunità γ_2 sono inoltre richiesti per l'alta affinità i seguenti aminoacidi: Lys 41, Trp 82, Arg 114, Asp 161.

Quindi l'alta affinità di legame delle benzodiazepine è conferita dalle subunità γ_2 in combinazione con le α_1 , α_2 , α_3 o α_5 , mentre l'assemblaggio con le subunità α_4 e α_6 genera siti che non hanno affinità per le benzodiazepine (DI).

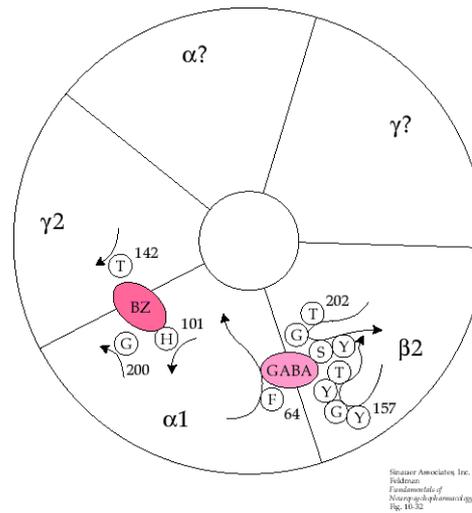


Fig. I.4- Subunità ed aminoacidi coinvolti nei siti di legame del recettore GABA_A.

I.1.3- Metodologie utilizzate per la valutazione degli effetti farmacologici dei sottotipi recettoriali del GABA_A

La farmacologia del recettore benzodiazepinico è stata dimostrata dipendere dal tipo di subunità α presente nel complesso recettoriale, quindi la ricerca farmaceutica attualmente cerca di chiarire il ruolo di ognuna di queste subunità ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_5$) ed evidenziarne le proprietà farmacologiche a loro associate, allo scopo di ottenere composti con azione selettiva.

Le differenze fra alcune subunità del recettore Bz/GABA_A sono spesso imputabili alla semplice sostituzione di un solo aminoacido; ciò è stato dimostrato ad esempio nel caso delle subunità α_4 e α_6 nei roditori insensibili al Diazepam: responsabile di tale insensibilità è la sostituzione dell'His 101 con l'Arg^{33,34}.

Un metodo per capire il ruolo delle subunità che compongono il complesso recettoriale è di ridurne in modo completo la loro espressione (strategia dei topi **knock-out**): la tecnica usa un processo di delezione completa di segmenti cromosomici che codificano per una specifica subunità recettoriale dando luogo a linee di topi mancanti di una determinata subunità. La strategia, pur essendo utilizzata correntemente, è stata oggetto di critiche perché è ipotizzabile che l'ablazione di subunità possa perturbare la disposizione strutturale dei recettori e causare alterazioni nella fisiologia dei topi mutati. Inoltre, l'esistenza di geni che codificano per varie isoforme potrebbe dar luogo ad una iper-espressione di alcune subunità in caso di ablazione di altre. La tecnica knock-out è stata eseguita operando su molte subunità tra cui le subunità α, β, γ e δ .

La perdita della subunità α_1 comporta nei topi un notevole incremento della mortalità sia prenatale che postnatale. L'eliminazione di questa subunità altera la risposta farmacologica nei confronti dello Zolpidem (ligande selettivo per la subunità α_1) e causa, inoltre, insensibilità agli effetti anticonvulsivi

del Diazepam, risultato che evidenzia il suo coinvolgimento negli eventi convulsivi. La perdita della α_1 determina un aumento per effetto di compensazione dell'espressione di altre subunità tra cui soprattutto le $\alpha_{2/3}$ e le $\beta_{2/3}$. L'eliminazione della subunità α_6 non provoca grosse differenze rispetto ai topi non mutati, ma è interessante notare che la perdita di questa subunità può ridurre l'espressione della subunità δ a livello delle cellule granulari del cervelletto; la perdita della δ non è letale, ma risulta un'alterazione nella risposta all'alcool e una minore risposta ai neurosteroidi. La sottrazione della subunità γ_2 comporta gravi disordini nelle normali funzioni dei topi, tra cui ritardi di crescita, disfunzioni senso-motorie fino ad arrivare alla morte. E' stato notato che i recettori GABA_A in cui è stata eliminata la subunità γ_2 risultano essere insensibili alle benzodiazepine a conferma che il sito delle benzodiazepine è all'interfaccia α/γ . La tecnica dei topi knock-out, che produce una completa perdita della funzione delle subunità, è stata sostituita da altre tecniche che si basano su un approccio più relativo e quindi meno drastico. Tra queste la più importante è sicuramente la tecnica dei topi knock-in³⁵.

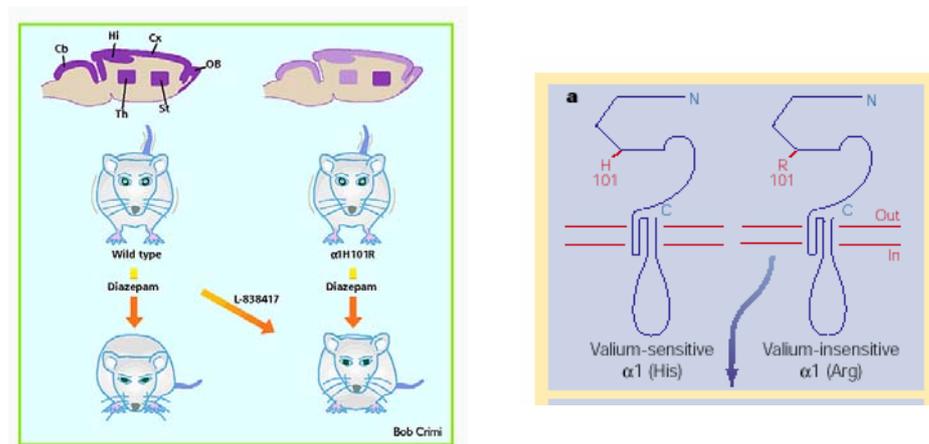


Fig. I.5- Uso di tecniche di biologia molecolare (strategia knock-in) per dimostrare la relazione tra residui aminoacidi, subunità e profilo farmacologico.

Sperimentalmente, con questa tecnica viene mutato un singolo aminoacido di una desiderata subunità α ed è esaminato un eventuale cambiamento della risposta farmacologica dei topi mutati nei confronti del Diazepam. La presenza del residuo di His nella posizione 101 della subunità α_1 (nelle altre subunità α_3 e α_5 rispettivamente nella posizione 126 e 105) sembra responsabile dell'alta affinità delle benzodiazepine e la sua sostituzione con un residuo di Arginina (presente nelle subunità α_4 e α_6) diminuisce drasticamente la loro possibilità di legame. Il sito per le benzodiazepine può quindi essere reso "Diazepam Insensitive" mutando il residuo di Istidina con uno di Arginina nel gene codificante per ogni subunità α . I topi così mutati vengono definiti [α_1 (H101R), α_2 (H101R), α_3 (H126R), α_5 (H105R)] dove R (Replacement), in questo caso, sta per Arginina³⁶.

E' fondamentale dire che i topi mutati possiedono un normale livello di espressione e di distribuzione cellulare delle varie subunità che risulta indistinguibile dai topi cosiddetti "Wild type", con fenotipo naturale che possiedono un normale corredo genico. I topi mutati su ogni subunità α vengono trattati con Diazepam e successivamente vengono osservati gli effetti farmacologici comparandoli con i ceppi "Wild type". Da questi studi è stato possibile associare ad ogni subunità α determinati effetti farmacologici:

a) Effetto anticonvulsivante

Bisogna innanzitutto dire che l'argomento è assai complesso, essendo dipendente anche dal tipo di convulsioni indotte (MES o da PTZ) che necessitano di terapia diversa. La subunità α_1 non è l'unica responsabile dell'effetto anticonvulsivante.

E' stato infatti visto che il Diazepam impediva nei topi wild-type gli attacchi mioclonici e le convulsioni toniche indotte da Pentilentetrazolo, mentre i topi mutati α_1 (His 101R) risultano soltanto parzialmente protetti dal farmaco (il diazepam protegge circa il 45.5% dei topi mutati dallo sviluppo di convulsioni). Ciò suggerisce che l'attività anticonvulsivante del Diazepam che rimane nei topi mutati è legata non tanto alla subunità α_1 , quanto piuttosto alle subunità α_2 , α_3 , α_5 e può essere antagonizzata dal Flumazenil, antagonista benzodiazepinico non selettivo.

Altri studi condotti hanno invece affermato che lo Zolpidem, agonista selettivo α_1 , protegge contro le convulsioni toniche letali con potenza comparabile a quella del Diazepam, ma non protegge dalle scosse miocloniche neppure ad alte dosi (30 mg/kg). L'azione anticonvulsivante dello Zolpidem è completamente assente nei topi mutati, indicando che la protezione esercitata dal farmaco contro le convulsioni toniche è mediata esclusivamente dal recettore Bz/GABA_A che contiene la subunità α_1 .

Un discorso a parte deve essere fatto per la forma epilettica delle assenze che prevede scariche ad alta frequenza fra il talamo e la corteccia cerebrale. I nuclei reticolari del talamo regolano le scariche corticali. A livello di questi nuclei, l'unica subunità presente è rappresentata dalla subunità α_3 , infatti il Clonazepam protegge dalle scariche talamiche nei topi mutati α_1 (His 101R) ma non nei topi mutati α_3 (His 101R). Ciò sta a significare che il controllo delle scariche talamo-corticali è mediato esclusivamente dai recettori contenenti la subunità α_3 ³⁷.

b) Effetto sedativo e ipnotico

I principali test farmacologici per la valutazione dell'effetto sedativo ed ipnotico (test della tavola a buchi e del rota rod) eseguiti con topi knock-in (H101R) hanno evidenziato che l'effetto sedativo delle benzodiazepine sembra principalmente mediato dalla subunità α_1 ^{30,33,38}.

Inoltre, il Diazepam somministrato ai topi mutati α_1 determina solo un parziale deficit mnemonico rispetto ai topi wild type e quindi la subunità α_1 potrebbe essere coinvolta anche nei processi regolanti memoria e

conoscenza (tra cui l'amnesia anterograda, che è un classico effetto delle benzodiazepine). I cambiamenti che avvengono nella composizione del sonno (soppressione o accorciamento della fase REM) e nella frequenza dell'elettroencefalogramma che vengono indotti dalle classiche benzodiazepine sembrano essere dovuti all'attivazione della subunità α_2 ³⁹. E' bene ricordare che le benzodiazepine (e ancora di più gli analoghi recenti come lo Zolpidem) sono usati come ipnotici perché danno un'alterazione minore della composizione del sonno rispetto ai vecchi ipnotici come i barbiturici.

c) Effetto ansiolitico

L'effetto ansiolitico è mediato principalmente dalla subunità α_2 ³⁸. E' stato infatti osservato che i topi α_1 (His 101R), α_3 (H126R), α_5 (H105R) trattati con Diazepam hanno incrementato il tempo trascorso nell'area illuminata e il numero delle entrate nei bracci aperti rispettivamente nel light-dark box test e nel labirinto a croce sollevata. Al contrario i topi in cui era stata mutata la subunità α_2 sono risultati insensibili all'effetto ansiolitico del Diazepam. Si potrebbe supporre che tale deficit comportamentale sia da attribuirsi ad una compromissione dell'attività motoria, ma tale dubbio è fugato dal fatto che i topi α_2 (His 101R) rispondono all'azione ansiolitica di altri farmaci, come il Fenobarbital, che agiscono sul recettore gabaergico ma in siti diversi da quelli delle benzodiazepine⁴⁰.

L'azione ansiolitica del Diazepam è pertanto mediata da quei recettori che esprimono la subunità α_2 (solo il 15% di tutti i recettori GABA_A).

Molto interessante è il comportamento di alcuni ligandi di nuova generazione (come l'Ocinaplon): queste molecole, nonostante attivino le subunità α_1 , α_2 e α_3 , hanno come effetto farmacologico solamente la riduzione dell'ansia⁴¹⁻⁴³. Sono state fatte alcune ipotesi sulle cause di questo comportamento, la più accreditata sostiene che l'effetto sedativo richiede un'attivazione massimale dei recettori contenenti la subunità α_1 , mentre per l'effetto ansiolitico è sufficiente un parziale potenziamento dei recettori contenenti la subunità α_2 ⁴².

Esistono però autori che non sono pienamente d'accordo sull'attribuire alle subunità α_2 la piena responsabilità dell'azione ansiolitica.

Non è da escludere che il sottotipo α_3 possa contribuire in parte a questo effetto, visto che ambedue le subunità sono altamente concentrate nell'amigdala e nelle regioni corticali, che sono due distretti coinvolti nell'elaborazione delle emozioni. In accordo a questa teoria c'è lo studio sul TP-003 che è un modulatore selettivo della subunità α_3 ma ha un profilo farmacologico simile ad un ansioselettivo^{43,44}.

Inoltre un esperimento⁴⁵ del 1999 ha evidenziato che la β -CCT, antagonista selettivo α_1 , blocca completamente gli effetti ansiolitici del Diazepam nel light-dark box test, suggerendo quindi che tali effetti siano espliciti da α_1 . A conferma di ciò, si può citare Paronis⁴⁶ che ha constatato che l'ansiolisi non è un effetto solo α_2 -mediato ma anche α_1 mediato, verificando che l'agonista α_1 selettivo Zolpidem conferiva effetti ansiolitici alle scimmie e che tale effetto non veniva antagonizzato, bensì potenziato, dall'antagonista

α_1 selettivo β -CCT. Una mancanza della risposta al Diazepam nella linea di topi con mutazione puntiforme testimonia il ruolo fisiologico del rispettivo sottotipo recettoriale.

d) Effetto miorilassante

Questo effetto (misurato con il grip strenght-meter test) appare mediato principalmente dai recettori α_2 ma a dosi più alte di Diazepam (10 mg/kg) rispetto alla dose a cui si manifesta l'azione ansiolitica (1-2 mg/kg). Infatti i topi mutati α_2 (H101R) non subiscono l'effetto miorilassante del Diazepam. La subunità α_3 può contribuire all'effetto miorilassante del Diazepam ma solo a dosi ancora più alte (30 mg/kg). I risultati sono in accordo con la presenza delle subunità α_2 e α_3 sui motoneuroni spinali e sovra spinali³⁹.

e) Memoria e apprendimento (Alzheimer Disease)

Il peggioramento della memoria e dell'apprendimento è un classico effetto collaterale delle benzodiazepine. E' stato dimostrato, infatti, che pazienti sotto l'influenza di agonisti al recettore benzodiazepinico per interventi chirurgici, soffrono di amnesia anterograda; a conferma di ciò, si è scoperto che l'agonista inverso β -carbolinico DMCM aumenta la memoria. Sulle cellule dell'ippocampo, a livello extrasinaptico, sono presenti recettori contenenti la subunità α_5 , questi recettori sono in una posizione privilegiata per modulare l'input eccitatorio che giunge dalla via glutaminergica mediata da recettori NMDA. Studiando topi privi di questa subunità, sono stati osservati miglioramenti della performance nei test sulla memoria e l'apprendimento. Da questo si deduce che ligandi ad azione agonista inversa, α_5 selettivi, possono incrementare le capacità cognitive e la memoria³⁹.

E' stato inoltre osservato che i pazienti affetti da Alzheimer Disease (AD), malattia neurodegenerativa progressiva con sistematiche lesioni dell'ippocampo e delle regioni cortico-limbiche, hanno conservato le subunità α_5 . Si ritiene che il principale modello cellulare e molecolare di formazione della memoria e dell'apprendimento a livello ippocampale sia "long term potentiation" (LTP), il quale coinvolge i recettori glutaminergici per l'NMDA. L'osservazione che agonisti benzodiazepinici come Flunitrazepam e Midazolam prevengono l'induzione della LTP, mentre agonisti inversi migliorano la memoria e l'approfondimento, ha portato a concludere che i due tipi di memoria siano diversamente mediate. Per i pazienti AD saranno quindi indicati agonisti inversi $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ selettivi non convulsivanti, capaci di disinibire selettivamente i neuroni colinergici nel proencefalo basale; è noto infatti che gli agonisti inversi incrementano i livelli di Acetilcolina nel SNC⁴⁷.

f) Effetto sui processi senso-motori e sulla schizofrenia

Con tale termine si intende qualsiasi disordine mentale appartenente a un gruppo di gravi malattie psicotiche caratterizzate da una particolare forma di dissociazione e deterioramento progressivo della personalità nel suo complesso. La superattività del sistema dopaminergico nel cervello è considerata essere

un fattore che contribuisce alla sintomatologia della schizofrenia; studi morfologici hanno dimostrato che il sistema dopaminergico riceve input inibitori principalmente attraverso il sottotipo recettoriale α_3 del complesso recettoriale GABA_A/Bdz. Esperimenti effettuati su topi che hanno subito un α_3 -knock-out, suggeriscono infatti che l'utilizzo di agonisti selettivi per tale sottotipo recettoriale possa costituire un effettivo trattamento per deficit sensoriali e motori in varie condizioni psichiatriche³⁹.

g) Potenziamiento degli effetti indotti dall'etanolo

I composti che deprimono il SNC come sedativo-ipnotici, anticonvulsivanti, antidepressivi, ansiolitici, analgesici, possono contribuire ad un potenziamento degli effetti dell'etanolo.

Nel 1999 è stato dimostrato che il potenziamento dell'etanolo verificato con il Diazepam è dovuto all'attivazione delle subunità α_2 , α_3 , α_5 a livello del recettore Bzd/GABA_A. Il Diazepam infatti, potenzia l'effetto sedativo dell'etanolo, incrementando la durata della perdita del riflesso di raddrizzamento sia nei wild type che in quelli mutati α_1 (H101R). Questo significa che l'effetto di potenziamento dell'etanolo che si verifica somministrando molecole che si legano al sito delle benzodiazepine è esclusivamente mediato dalle subunità α_2 , α_3 , α_5 ma non dalla subunità α_1 ^{48,49}.

h) Nuovi utilizzi farmacologici dei ligandi gabaergici

Encefalopatia epatica. E' una malattia neuropsichiatrica che danneggia l'encefalo dopo un'insufficienza epatica. In alcuni studi è stato osservato che questa patologia è caratterizzata da un aumentato tono gabaergico: di conseguenza è stato valutato l'impiego terapeutico di antagonisti gabaergici come la Bicucullina, l'isopropile-biciclofosfato e il Flumazenil (antagonista del complesso GABA_A/Bzd)⁵⁰⁻⁵².

Intossicazione acuta da benzodiazepine. Per questo uso e per alleviare la sindrome da astinenza il farmaco più indicato è il Flumazenil.

Radiotraccianti. Stanno trovando sempre più impiego il Flumazenil marcato con C¹¹ per la tomografia ad emissione di positroni (PET)⁵³ e lo Iomazenil marcato con I¹²⁵ nella tomografia ad emissione singola di positroni (SPET)⁵⁴. Entrambi i radio traccianti sono utili per valutare in vivo la capacità di binding delle benzodiazepine al recettore GABA_A.

i) Coinvolgimento delle subunità nella dipendenza da benzodiazepine

L'utilizzazione prolungata di farmaci benzodiazepinici può comportare dipendenza, alterazioni nella trasmissione gabaergica e anche modificazioni nell'espressione dei sottotipi recettoriali. A questo proposito la natura e il meccanismo di queste alterazioni non sono ancora chiari. Uno studio sul livello dell'espressione di proteine del recettore GABA_A dimostra che un trattamento con farmaci benzodiazepinici di due settimane può comportare una diminuzione della subunità α_1 ed una sovraespressione di α_3 , α_5 , β_2 , β_3 e γ_2 ⁵⁵.

I.1.4- Ligandi al recettore Bz/GABA_A

Il recettore GABA_A è stato scoperto come target dell'azione farmacologica delle benzodiazepine già alla fine degli anni '70 ed è stato evidenziato che si trova all'interfaccia α/γ . Recentemente grazie alle nuove tecniche di mutagenesi è stato possibile definire che lo spettro d'azione di questi farmaci è in particolare correlazione con il tipo di subunità α presente nel complesso recettoriale.

Esiste un'ampia varietà di sostanze, farmacologicamente e clinicamente importanti, in grado di modulare questo recettore (oltre alle benzodiazepine): i barbiturici, i neurosteroidi, gli anestetici, sostanze convulsivanti come la picrotossina, la bicucullina e le β -carboline⁵⁶. Queste molecole hanno il proprio sito di riconoscimento sul recettore, ben distinto dagli altri, e tramite l'interazione col sito di legame possono modulare l'azione del GABA. In particolare, col sito di legame delle benzodiazepine possono interagire numerose classi di composti strutturalmente diverse che sono accomunate dal fatto di includere derivati eterociclici azotati, planari, policondensati.

Questi composti sono stati identificati e classificati in base alla loro capacità di aumentare o ridurre l'azione del GABA sul complesso recettoriale. I ligandi capaci di aumentare l'azione del GABA, incrementando la frequenza di apertura del canale sono definiti *agonisti* o *modulatori allosterici positivi* e sono responsabili dell'azione ansiolitica, sedativa, ipnotica, anticonvulsivante e miorilassante (come il Diazepam).

La scoperta di alcuni agenti come le β -carboline, che diminuiscono l'azione del GABA (sono capaci di diminuire la corrente del flusso degli ioni cloruro in presenza del neurotrasmettitore) e hanno effetti opposti alle benzodiazepine, ossia sono ansiogene e/o proconvulsivanti, ha portato all'introduzione del concetto di *agonista inverso* o *modulatore allosterico negativo*. E' stato proposto che cambiamenti conformazionali di due o più siti recettoriali rendano conto delle differenze osservate nell'azione farmacologica di questi ligandi¹⁷.

Una terza classe di composti corrisponde a quelle molecole che si legano al sito benzodiazepinico ma non alterano direttamente la corrente del cloro indotta dal GABA e sono privi di attività farmacologica propria. Essi prevengono l'azione di agonisti ed agonisti inversi e sono definiti *antagonisti* (es. Flumazenil).

Per la valutazione degli effetti farmacologici viene considerata la variazione di corrente dovuta agli ioni cloruro, che avviene in presenza di ligandi diversi: un agonista aumenta questa corrente, un agonista inverso la diminuisce ed un antagonista, se presente da solo, non genera modificazioni.

Inoltre agonisti e agonisti inversi sono a loro volta suddivisi in due tipi: *full agonist* e *full inverse agonist*, essi esibiscono, rispettivamente un massimale aumento e una massimale riduzione della corrente gabaergica; i composti che hanno una debole capacità modulatoria e una bassa efficacia sono definiti *agonisti* e *agonisti inversi parziali*.

Lo studio degli agonisti parziali ha avuto un notevole impulso in quanto essi rappresentano l'opportunità di avere composti caratterizzati da un profilo farmacologico selettivo, per esempio dotati solo di attività ansiolitica e quindi privi dell'attività ipnotico-sedativa delle classiche benzodiazepine. Gli studi sugli agonisti parziali non sottotipo selettivi di prima generazione (come Bretazenil e Abecarnil) hanno mostrato la relazione tra l'attività farmacologica e il numero di recettori occupati. A questo proposito è emerso il concetto che un agonista parziale per mostrare la stessa attività ansiolitica di un composto full agonist richiede un maggiore livello di occupazione recettoriale. Per questo motivo i composti agonisti parziali possono essere in grado di esplicare l'effetto ansiolitico ad una dose che si dimostra non sufficiente per causare indesiderati effetti ipnotico/sedativi. La loro azione può quindi divenire selettiva in relazione alla dose somministrata, quindi si può parlare di selettività dose dipendente. Ligandi al recettore GABA_A/Bz con profilo di agonisti parziali non selettivi hanno però avuto scarso successo: alcuni si sono rivelati tossici ed in altri casi il confine tra azione ansiolitica e sedativa era troppo stretto, comportando l'impossibilità di ottenere un'azione farmacologica selettiva⁵⁷. La ricerca farmaceutica in questo settore è ormai improntata sulla sintesi di ligandi con profilo agonista parziale capaci di esplicare effetti farmacologici selettivi.

Ci sono due caratteristiche distinte che consentono di ottenere un'azione selettiva: l'affinità selettiva e l'efficacia selettiva.

L'affinità selettiva è l'approccio più ovvio e si basa sullo sviluppo di molecole che abbiano affinità per un sottotipo recettoriale rispetto agli altri. Fino ad ora non sono molti i composti che rientrano in questa categoria; i maggiori successi sono stati conseguiti per i ligandi α_1 selettivi, sono stati ottenuti infatti Zolpidem, Zaleplon e Zopiclone che, per via della loro selettività, sono usati nel trattamento dell'insonnia. Ancora non sono stati trovati composti che abbiano totale selettività per i sottotipi α_2 , α_3 e α_5 o comunque non sono ad uno stadio avanzato di sviluppo.

Il concetto di efficacia selettiva è più complesso e riguarda i composti che non mostrano elevata sottotipo-selettività in vitro, in quanto affini a tutti i sottotipi, ma presentano una spiccata selettività d'azione in vivo.

Ci sono tre modi per ottenere l'efficacia selettiva:

- composti dotati di efficacia selettiva assoluta; si ha quando un composto è selettivamente efficace per un solo sottotipo, nonostante sia affine a tutti i sottotipi (ad esempio *full agonist* per un sottotipo ma antagonista per gli altri);
- in questo gruppo sono comprese le molecole che mostrano efficacia a più di un sottotipo (ad esempio antagonista per un sottotipo e agonista parziale per gli altri)⁵⁸;
- composti che presentano efficacia selettiva relativa; la loro azione farmacologica selettiva può esplicarsi perché possiedono diversi gradi di efficacia sui diversi sottotipi recettoriali GABA_A senza essere antagonisti su alcun sottotipo (per esempio *full agonist* su un sottotipo e agonista parziale sugli altri).

E' possibile avere alcuni dati preliminari o informazioni indicative *in vitro* sul profilo farmacologico dei ligandi al sito di legame per le Bz, usando una particolare tecnica di binding denominata GABA shift⁵⁹. Viene valutata la capacità di spiazzare un ligande marcato dai siti di riconoscimento, utilizzando un ligande d'interesse in presenza o in assenza di GABA. Il valore numerico ottenuto è la IC₅₀. Ciò è valutato sia in presenza sia in assenza di GABA ed il rapporto tra le due IC₅₀ si definisce GABA Ratio. Si tratta di un numero maggiore di 1 per gli agonisti, uguale a 1 per gli antagonisti e minore di 1 per gli agonisti inversi.

Un'altra tecnica che fornisce analoghe informazioni è quella che utilizza [³⁵S]TBPS (*ter-butilciclofosforotionato*), che si lega con elevata affinità al sito di legame per la picrotossina, localizzato sul canale per gli ioni cloruro del complesso recettoriale del GABA_A.

L'interazione dei ligandi al sito per le Bz modula allostericamente il legame del TBPS sul proprio sito e questa modulazione nel legame viene espressa come variazione nel binding del TBPS in presenza ed in assenza del composto da saggiare.

Gli agonisti aumentano il binding shift del [³⁵S]TBPS ed hanno valori positivi (agonisti totali [³⁵S]TBPS shift ≥1), mentre gli agonisti inversi riducono il binding shift del [³⁵S]TBPS ed hanno valori negativi, gli antagonisti non hanno effetti (valori [³⁵S]TBPS shift = 0)⁶⁰.

Tali valori sono spesso confrontati con un'altra tecnica, sicuramente la più affidabile, che prevede la misurazione diretta della variazione del flusso di ioni cloruro, conseguente al legame dei ligandi al sito di riconoscimento benzodiazepinico che, modulando allostericamente il recettore per il GABA, determinano una variazione nella frequenza di apertura del canale per gli ioni cloruro.

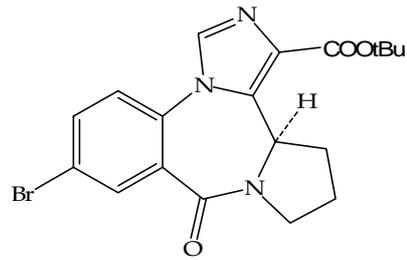
Gli agonisti pieni incrementano la corrente ionica, gli agonisti inversi diminuiscono il flusso e gli antagonisti non hanno effetti^{61,62}.

L'attuale conoscenza dell'esistenza di numerosi sottotipi recettoriali suggerisce perciò la necessità di sviluppare ligandi selettivi per i diversi sottotipi recettoriali.

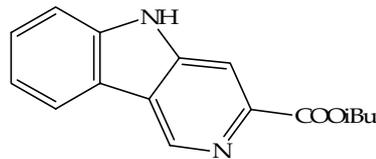
Con questo scopo sono stati sintetizzati numerosi composti che hanno permesso di acquisire anche nuove informazioni sul meccanismo di interazione ligande-recettore. Infatti emerge dalla letteratura che, oltre alle classiche benzodiazepine, i numerosi composti dotati di affinità per il BzR centrale sono in realtà molecole a nucleo non benzodiazepinico, caratterizzate da strutture chimiche estremamente diverse tra loro.

Qui di seguito vengono riportati i più importanti:

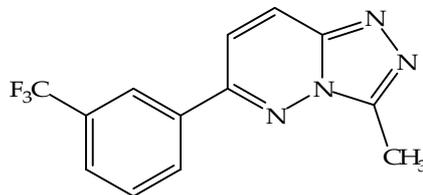
- *Bretazenil*: è una imidazobenzodiazepina che non presenta attività sottotipo-selettiva *in vitro*, ma *in vivo* è un potente ansiolitico e anticonvulsivante⁶³;



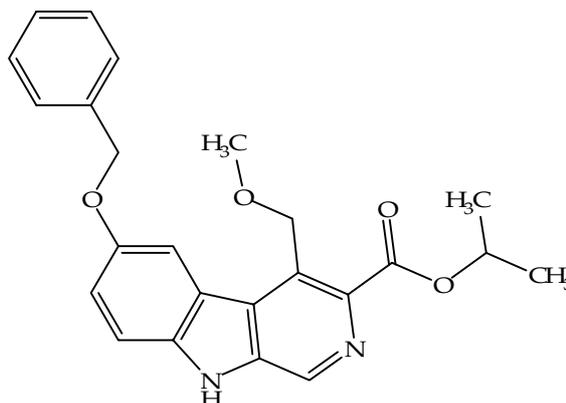
- β -CCT : antagonista del recettore contenente la subunità α_1 , è in grado di bloccare gli effetti ansiolitico e anticonvulsivante, ma non quello miorilassante delle benzodiazepine⁶⁴;



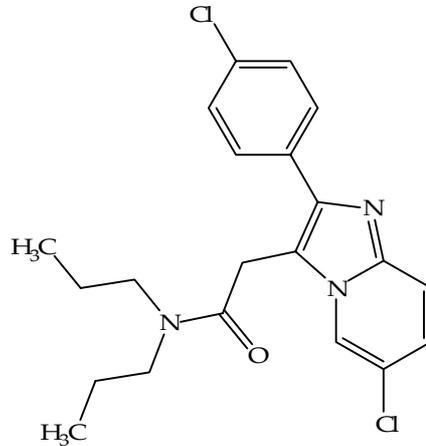
- CL-218,872: è la prima molecola a struttura non-benzodiazepinica, ma con potenza paragonabile a quella delle Bz; compare per la prima volta in letteratura nel 1979⁶⁵. Mostra attività ansiolitica e anticonvulsivante⁶⁶;



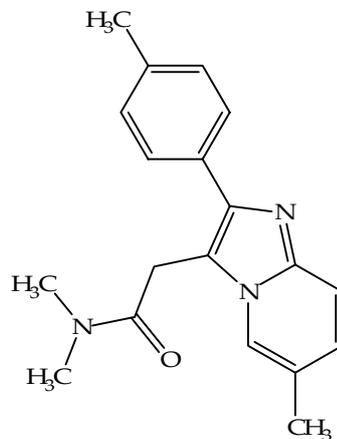
- Abecarnil : è una β -carbolina che mostra *in vitro* affinità paragonabili su α_1 e α_3 . I test *in vivo* mostrano invece attività ansiolitica e anticonvulsivante a basse dosi, non accompagnate da atassia e miorilassamento⁶³;



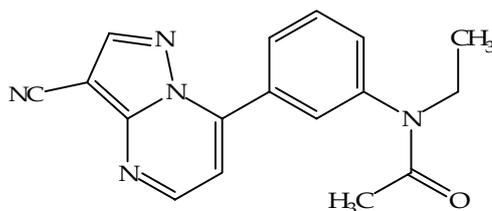
- *Alpidem* : è una imidazopiridina che *in vivo* possiede interessanti proprietà ansiolitiche. Studi di binding hanno rivelato affinità per i sottotipi contenenti le subunità α_1 e per il Recettore Benzodiazepinico Periferico⁶⁷;



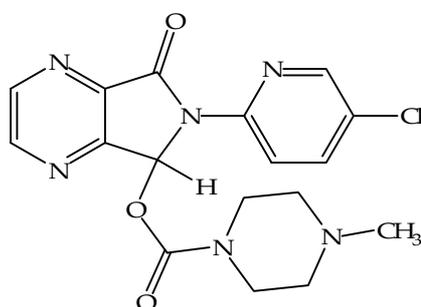
- *Zolpidem* : è una imidazopiridina, agonista altamente selettivo α_1 ^{66,68}; la sua elevata attività intrinseca si manifesta con azione ipnotica e anticonvulsivante. Viene largamente usato come ipnotico (Nottem®, Stilnox®, Niotal®);



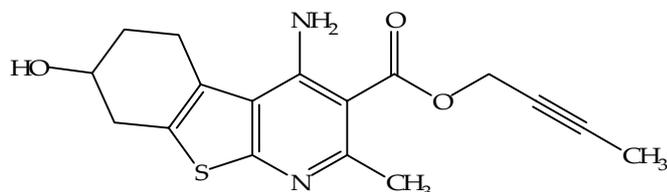
- *Zaleplon* : è una pirazolo[1,5-a]pirimidina attualmente in commercio per il trattamento dell'insonnia (Sonata®, Zerenè®). Si lega preferenzialmente ai sottotipi $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ e a quelli contenenti $\alpha_1\beta_2\gamma_3$; la sua selettività per la subunità α_1 spiega l'attività ipnotica che lo caratterizza⁶⁹;



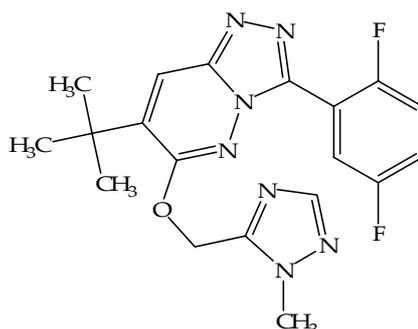
- *Zopiclone*: è una molecola efficace quanto le benzodiazepine nel trattamento dell'insonnia (Imovane®). E' attivo soprattutto sul sottotipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Dai dati sperimentali si rileva che non provoca dipendenza ed è ben tollerata sia nei giovani che negli anziani. L'unico effetto collaterale rilevato è il retrogusto amaro^{16,66};



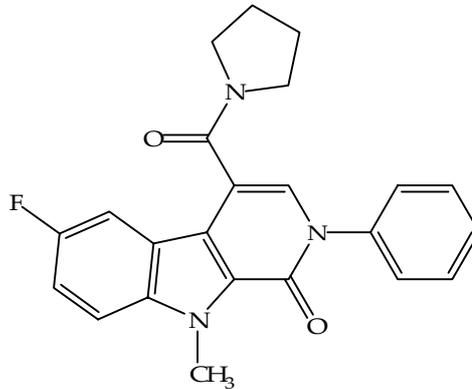
- *SB-205,384*: è l'unica molecola selettiva in vitro per la combinazione $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ ⁷⁰ ;



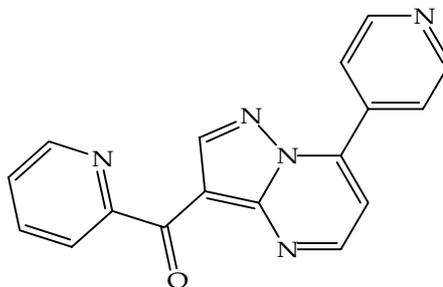
- *L-838,417*: si tratta di un antagonista α_1 e parziale agonista α_2 , α_3 , α_5 ^{66,68}; questa molecola è stata usata sia per indagare il ruolo della subunità α^7 , sia per capire quale subunità fosse implicata nell'attività anticonvulsivante delle benzodiazepine;



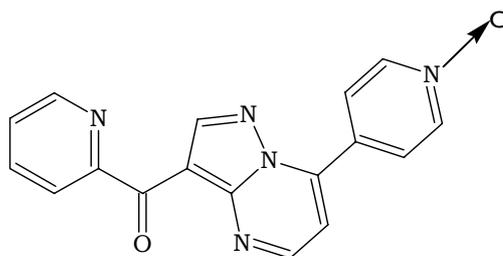
- *SL-651,498*: è un derivato pirido-indolico che mostra *in vitro* un'elevata affinità per α_2 e α_3 , ma modesta su α_1 e α_5 ⁷². Studi *in vivo* hanno evidenziato una potente azione ansiolitica, senza ripercussioni sulla coordinazione motoria e sulla memoria^{66,73}; è stato quindi ipotizzato che SL-651,498 sia un agonista su α_2 e α_3 e antagonista su α_1 e α_5 ;



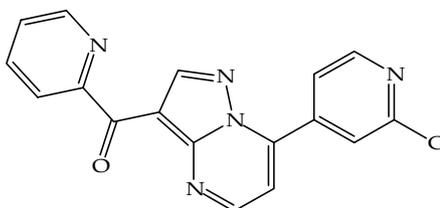
- *Ocinaplon*: ligande a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico; è un agente ansiolitico e anticonvulsivante, privo della componente sedativa e di incoordinazione motoria⁷³, selettivo per il sottotipo α_2 ^{41,42,66}. E' arrivato fino alla fase clinica III poi è stato sospeso perché si è riscontrato l'aumento degli enzimi microsomiali epatici nei soggetti testati⁷⁴;



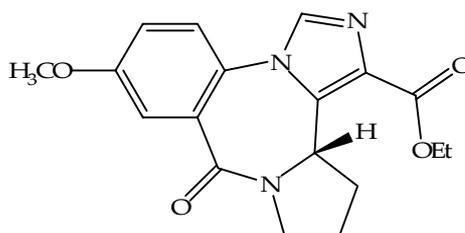
- *DOV 315,090*: è un metabolita dell'Ocinaplon; possiede attività modulatoria sui sottotipi α_1 , α_2 , α_3 e α_5 . Ha una maggior efficacia rispetto all'Ocinaplon sul sottotipo α_3 mentre ha una minor efficacia sulla subunità α_5 ⁷⁴;



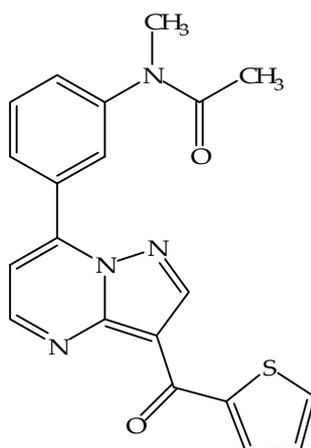
- *DOV-51892*: è una molecola strutturalmente analoga all'Ocinaplon; è considerato un "supermodulatore" del sottotipo α_1 perché ha un'efficacia maggiore del Diazepam su questa subunità; dai dati in vivo, però, rivela un profilo ansioselettivo (privo anche di effetti collaterali come atassia e miorelассamento) nonostante sia meno affine ai sottotipi α_2 e α_3 ⁴²;



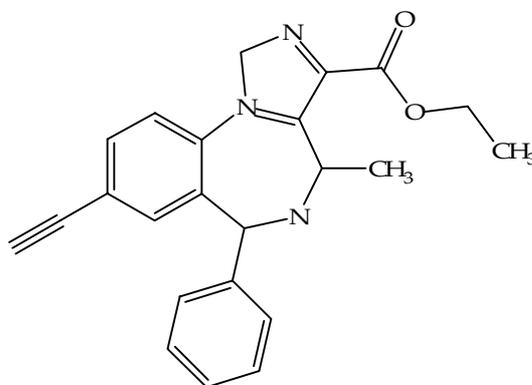
- *L-655,708*: molecola che presenta in vitro un'elevata affinità nei confronti dei recettori contenenti la subunità α_5 ⁷⁵; studi farmacologici in vivo hanno evidenziato un miglioramento sulle funzioni cognitive e sulla memoria⁷⁶, rivelando un profilo farmacologico di agonista inverso;



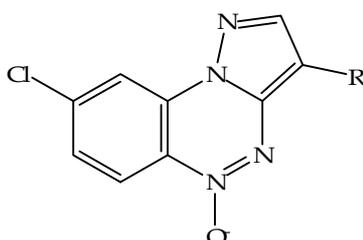
- *Indiplon*: è una nuova pirazolo[1,5-*a*]pirimidina, con alta affinità per la subunità α_1 e minore per la α_6 ⁷⁷. Grazie al suo rapido onset e alla sua breve durata d'azione, può essere un farmaco candidato per l'induzione del sonno⁷⁸;



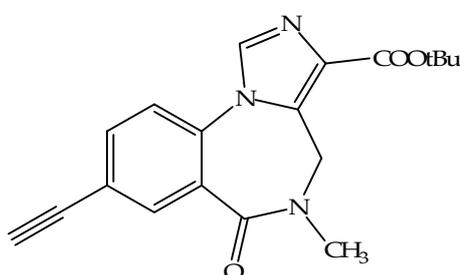
- *SH-053*: questa molecola di nuova generazione presenta due enantiomeri i quali hanno un comportamento diverso nei confronti del recettore GABA_A. L'isomero S agisce sui sottotipi α_2 , α_3 e α_5 mentre l'isomero R è essenzialmente selettivo per la subunità α_5 . Entrambi gli enantiomeri provocano un decremento dell'attività motoria (e anche un lieve effetto sedativo); questo suggerisce che la subunità α_5 , oltre ad avere effetti sulla memoria e sull'apprendimento, contribuisce all'azione sedativa e influisce sui comportamenti motori⁷⁹;



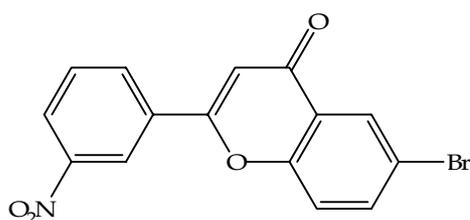
- *Pirazolobenzotriazine*: sono una serie di composti che si legano con alta affinità al recettore GABA_A; sono attivi sul sottotipo α_5 come agonisti inversi, quindi hanno un utilizzo potenziale nei deficit cognitivi^{16,80,81};



- RY-24*: come le molecole della serie precedente, anche questo composto (e i suoi analoghi) è nato in seguito al crescente interesse per la subunità α_5 . Infatti RY-24 è un agonista inverso molto affine a questo sottotipo recettoriale ($K_i = 0,4 \text{ nM}$). Il profilo farmacologico di questo composto è molto interessante: oltre al ruolo che hanno gli agonisti inversi α_5 nell'ansia e nell'apprendimento, è stato rilevato che questa molecola causa una soppressione degli effetti mediati dall'etanolo (per esempio sedazione ed effetti sull'attività motoria); è stato ipotizzato che i recettori α_5 dell'ippocampo e del ventre pallido rappresentino un'estensione del circuito mesolimbico su cui influisce l'etanolo¹⁶;



- Flavonoidi*: sono sostanze conosciute da molto tempo che si trovano in varie piante; recente è la scoperta che si legano al recettore benzodiazepinico, questo giustifica il loro uso come tranquillanti (derivante dalla medicina popolare); hanno un potente effetto ansiolitico perchè interagiscono con elevata affinità con i recettori $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (nella figura è mostrato il 6-Br-3'-nitroflavone che si lega al recettore con una $K_i = 1,0 \text{ nM}$)¹⁶;



Possiamo, senza dubbi affermare che la grande novità degli ultimi anni nel campo della chimica farmaceutica dei ligandi al BzR consiste nella dimostrazione che da assemblaggi sottotipali diversi, ossia da come fisicamente è assortito il recettore, dipendono gli effetti farmacologici che i ligandi evocano. Perciò il disegno di molecole selettive per aumentare la risposta di un determinato sottotipo recettoriale, rappresenta il target e la chiave della selettività tanto auspicata nella terapia con le benzodiazepine.

I.1.5- Modelli di interazione ligande-recettore

Studi basati sulla valutazione dell'affinità di un numero elevato di ligandi del recettore benzodiazepinico hanno stabilito una sorta di mappa di relazioni struttura-attività (SAR), che ha permesso di creare modelli farmacoforici in grado di unire l'attività di agonisti, antagonisti, agonisti inversi, anche molto diversi tra loro.

Il primo modello di questo tipo sul BzR è stato pubblicato, nel 1995, da Zhang, Koheler e Cook⁸² e comprende composti appartenenti a dodici classi chimiche diverse, tra cui benzodiazepine, β -carboline, triazolo-pirimidine, pirazolo-chinoloni.

Il modello si basa sull'individuazione di 4 punti basilari per l'interazione ligande-recettore: H₁, H₂/A₃, A₂ e L₁. Sul recettore infatti viene definito:

H₁ che è un centro donatore di legami a idrogeno, H₂ che può anche essere A₃ ossia accettore di legame a idrogeno.

A₂ è un centro solo accettore di legame a idrogeno.

L₁ è una cavità lipofila ove si realizzano interazioni π - π o forze di Van der Waals.

Altre regioni identificate successivamente sono L₂, L₃ e L_D; aree lipofile e zone di repulsione sterica e/o elettrostatica S₁, S₂ e S₃.

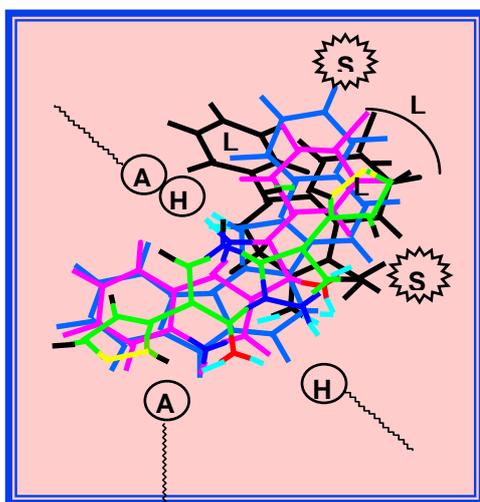


Fig. I.6- H₁ e H₂ individuano siti donatori di legame a idrogeno sulla proteina recettrice; A₂ e A₃ sono i siti accettori di legami a idrogeno; L₁, L₂ e L₃ sono tasche lipofile (L₃ è fuori dal piano). S sono regioni di repulsione sterica. Sovrapposizione del 3,6 β -tienilpirazolo [1,5,a]pirimidin-7-one (verde, agonista parziale) con GCS-9896 (magenta), diazepam (nero), piridodiindoli (blu)⁸³.

Affinché un ligande svolga l'attività di agonista, è necessaria l'interazione con H₁, H₂/A₃, L₁, L₂ e/o L₃. L'occupazione della cavità L₃ sembra necessaria per un'azione di agonista pieno; si ipotizza che in tale area si collochi il sostituente fenilico del Diazepam e di tutte le altre 5-fenilbenzodiazepine.

Per l'attività di agonista inverso sembra invece richiesta l'interazione con la cavità lipofila L₁, con H₁ e con A₂^{84,85}.

Alla luce delle scoperte dei sottotipi recettoriali, la cui interazione media ciascun distinto effetto delle

classiche benzodiazepine, oggi si è giunti alla convinzione che le diverse subunità differiscono nel modello farmacoforico, per le dimensioni e la forma delle aree lipofile.

Nel 2000, alla luce di questa nuova conoscenza, il modello "omnicomprensivo" di Cook *et al.* è stato rivisto creando modelli farmacoforici⁸⁵ per i diversi sottotipi, utilizzando ben 151 ligandi appartenenti a nove diverse famiglie di molecole: imidazo-benzodiazepine, β -carboline e pirido-diindoli, pirazolo-chinolin-3-oni, 1,4-benzodiazepine, triazolo-pirimidine (CL- 218,872) e imidazo-piridine (Zolpidem).

Le osservazioni fatte da numerosissimi ricercatori, facendo uso di saggi di binding su sottotipi recettoriali e con l'ausilio di metodiche di molecular modelling⁸⁶, hanno portato alla formulazione delle seguenti ipotesi:

- la cavità lipofila L₂ ha dimensioni maggiori nei sottotipi contenenti la subunità α_5 , infatti la piena occupazione da parte del ligande della tasca L₂ favorisce l' α_5 sottotipo-selettività;
- l'occupazione della cavità lipofila L_{Di} aumenta la selettività α_1 .
- l'occupazione contemporanea di L₂ e L_{Di} favorisce l' α_2 selettività;
- il volume del farmacoforo per i recettori contenenti l' α_6 è più piccolo degli α_1 , manca infatti l'area L₃ la cui completa occupazione è condizione necessaria per il full agonism.

I requisiti minimi che il ligande deve avere per l'interazione con il recettore benzodiazepinico, consistono nelle interazioni H₁, H₂ e L₁, regioni comuni a tutti i sottotipi recettoriali, essendo questa condizione necessaria per il riconoscimento recettoriale, mentre l'origine della sottotipo-selettività è dovuta all'interazione con le zone lipofile L₂, L₃ e L_{Di} peculiari ad ogni sottotipo recettoriale.

Successivamente è stato proposto un modello farmacoforico^{87,88} detto "Catalyst", in cui rispetto al modello di Cook (1995-2000) sono state individuate nuove aree di repulsione elettrostatiche e/o sterica. Tale modello è stato validato con un ibrido strutturale tra una serie di flavonoidi, altamente affini al BzR, e CGS-9896.

Nel modello sono presenti un sito accettore di legami a idrogeno (A₂), un sito donatore di legami a idrogeno (H₁), un sito bifunzionale donatore/accettore di legami a idrogeno (H₂/A₃), tre cavità lipofile (L₁-L₃), e ben cinque zone di repulsione sterica e/o elettronica (S₁-S₅).

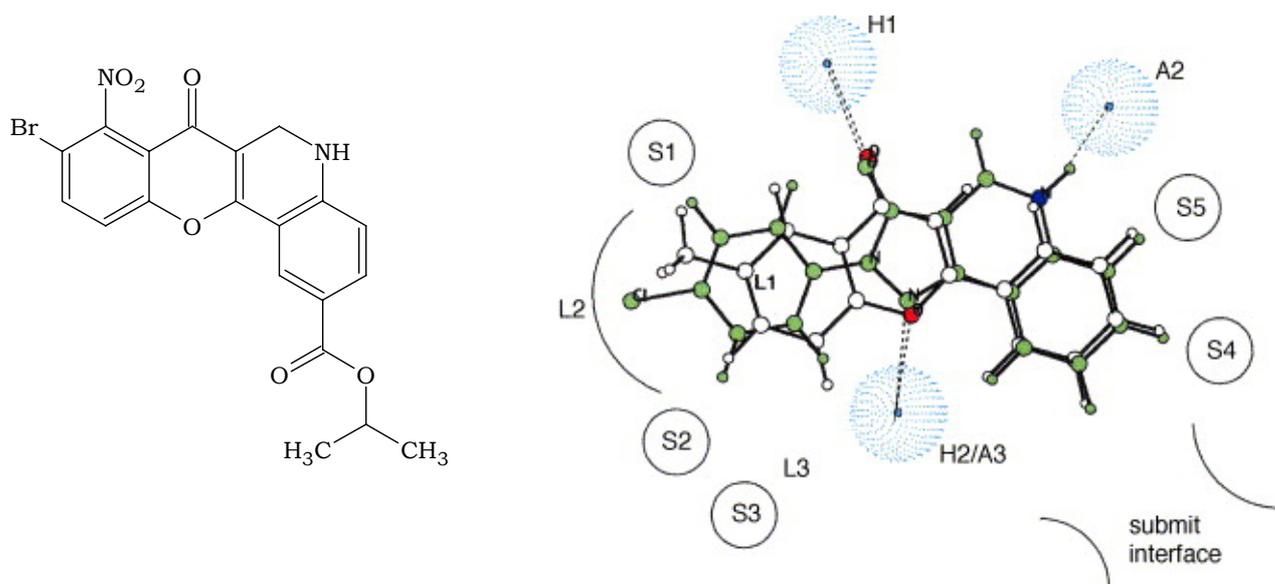


Fig. 1.7- Modello farmacoforico usato come base per la generazione del modello farmacoforico "Catalyst" su flavonoides⁸⁸.

Nel 2007, in uno studio di Clayton et al.¹⁶, è stato aggiornato il modello farmacoforico di Cook e sono state aggiunte nuove considerazioni:

- le dimensioni dei siti di legame delle subunità α_1 , α_2 e α_3 sono molto simili tra di loro. L' α_2 e l' α_3 sono molto simili anche per forma, polarità e lipofilità;
- la subunità α_1 è molto diversa dall' α_4 e dall' α_6 ; la maggiore differenza riguarda soprattutto la regione L_{Di} che è molto più grande nel sottotipo α_1 ;
- la regione L_3 è molto piccola o è assente anche nel sottotipo α_4 (oltre all' α_6), questa è forse la causa principale per cui questi sottotipi sono Diazepam Insensitive;
- le regioni L_2 e L_{Di} sono leggermente più piccole nella subunità α_6 rispetto al sottotipo α_4 ;
- la regione L_2 contribuisce alla α_2 selettività (oltre che per l' α_5); questa regione è più profonda e più larga in questi sottotipi rispetto agli altri.

In letteratura si ritrova anche un diverso approccio nello studio dell'interazione ligande-recettore, derivante dallo studio delle subunità α_1 , α_2 , α_3 e α_5 . Sono stati individuati gli aminoacidi che le compongono, ritenuti responsabili delle interazioni con i vari ligandi al BzR ed è stata riportata la struttura tridimensionale dei domini extracellulari delle subunità α_1 , α_2 , α_3 e α_5 , dove è identificato, all'interfaccia con la subunità γ_2 , il sito di legame per i ligandi al BzR⁸⁹.

Attualmente è in corso uno studio nel quale si cerca di confrontare la struttura del recettore GABA_A con quella del recettore nicotinico (che è stato sequenziato e quindi è perfettamente conosciuto). Lo scopo è quello di rilevare una certa omologia tra i due recettori in modo da poter identificare più facilmente futuri ligandi; purtroppo fino ad ora non sono pervenuti risultati interessanti.

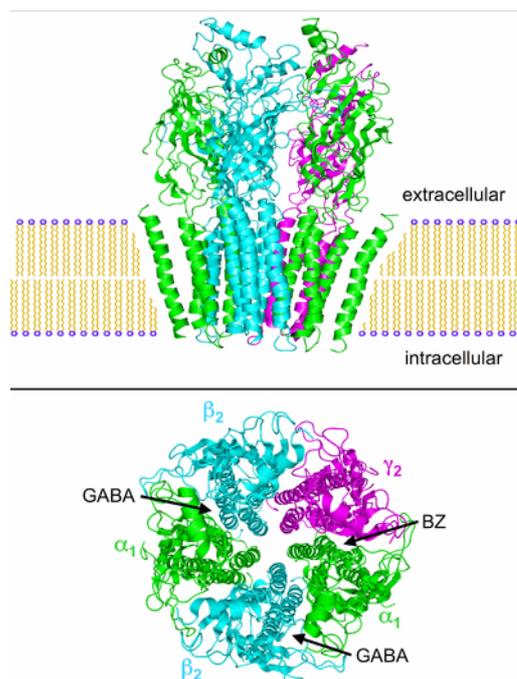


Fig. I.8- Struttura del recettore nicotico (nAChR).

Infine viene riportato un nuovo modello farmacoforico derivato dallo studio di una nuova serie di molecole affini al BzR/GABA_A: le pirazolo[5,1-c][1,2,4]benzotriazine 5-ossido 8-alcossi-/arilossi-/arilalchilossi e 8-aril-/arilalchilderivati variamente sostituiti in posizione 3⁸¹.

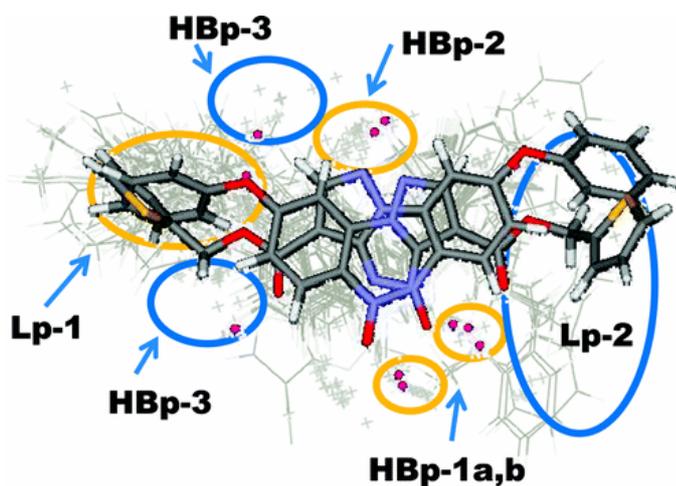


Fig. I.9- Due possibili orientazioni della molecola 3-(2-Thienilmethoxycarbonilmetil)-8-fenossipirazolo[5,1-c][1,2,4]benzotriazina 5-ossidoneel modello farmacoforico. (HBp= Hidrogen Bond interaction point; Lp= Lipophilic point)⁸¹.

I.2- Progetto della Ricerca

Il progetto della ricerca, oggetto di questo lavoro di tesi, si inserisce in un ampio studio da tempo intrapreso nel gruppo del Prof. Bruni, sulle relazioni struttura-attività di ligandi al recettore benzodiazepinico centrale e periferico (CBR e TSPO), i quali sono strutturalmente e funzionalmente assai diversi tra loro.

Le strutture in questione sono comunque riconducibili a requisiti molecolari comuni: sono tutti derivati eterociclici azotati planari policondensati, contenenti il pirazolo.

La prima linea di ricerca comprende composti a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico^{83,90-94} e molti dei quali mostrano un'elevata affinità al recettore GABA_A-BzR ed una spiccata sottotipo-selettività *in vitro*, che spesso si riscontra anche nella sperimentazione *in vivo*. All'interno di questa classe di composti biciclici sono state sintetizzate tre diverse serie che si distinguono per il sostituente presente in posizione 6. La serie pirazolica è quella di più vecchia data e presenta vari sostituenti in posizione 3, tutti di tipo arilico. Successivamente è stata sintetizzata la serie fenilica, recante in 3 quei sostituenti che nella serie precedente avevano mostrato i migliori risultati ai saggi biologici di affinità recettoriale. L'idea di sostituire la posizione 6 è nata per dimostrare la non essenzialità del nucleo pirazolico in tale posizione, ipotesi confermata dai risultati forniti dagli studi di binding.

Un'ulteriore sostituzione in 6 con un anello tienilico, ha portato alla realizzazione di composti che si sono dimostrati ligandi affini e selettivi.

L'ultima modifica introdotta nella struttura pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica, in posizione 6, ha dato luogo alla serie, cosiddetta, benzilica, creata per studiare le relazioni intercorrenti tra lipofilia del sostituente e attività intrinseca del ligande, in presenza di un elemento spaziatore tra nucleo biciclico e sostituente fenilico.

La posizione 3 reca quei sostituenti che hanno fatto registrare i più alti valori di affinità al BzR nelle varie serie (pirazolica, fenilica, benzilica e tienilica).

L'altra linea di ricerca, portata avanti dalla Prof.ssa Costanzo all'interno del medesimo laboratorio, presenta derivati a nucleo pirazolo[5,1-*c*]benzotriazinico^{80,81,95,96}. Questi composti tricyclici hanno mostrato, nella maggior parte dei casi, una scarsa sottotipo-selettività *in vitro*, ma una spiccata sottotipo-selettività *in vivo* con prevalente attività ansiolitica, nella maggioranza dei casi.

Alla luce di questi risultati sperimentali è stata ideata una nuova classe di composti, a nucleo pirazolo[5,1-*c*]triazinico (PT) che può essere considerata come "ibrido strutturale" dei due nuclei sopra descritti: sono una semplificazione molecolare delle pirazolo[5,1-*c*]benzotriazine ma contemporaneamente analoghi strutturali delle pirazolo[1,5-*a*]pirimidine.

Anche in questo caso i sostituenti in posizione 3 sono stati selezionati tra quelli dimostratisi migliori nelle varie serie pirazolo[1,5-*a*]pirimidiniche precedentemente elencate.

Riassumendo, gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono:

conferma dell'essenzialità dei raggruppamenti N(4)H e C(7)O ai fini dell'interazione recettoriale e valutazione dell'azoto in posizione 1 nell'ancoraggio al sito di legame;

indagine sulla sostituzione di un atomo di carbonio con un azoto in posizione 5 (serie PT);

modifiche in posizione 3: introduzione di nuovi sostituenti sull'anello benzenico con caratteristiche elettroniche, lipofile e steriche diverse;

modifiche in posizione 6 per un accurato studio QSAR volto alla definizione dei requisiti strutturali correlati all' α_n sottotipo-selettività: sintesi di nuovi composti delle serie 6-fenilica, 6- β -tienilica, 6-benzilica e 6-pirazolica;

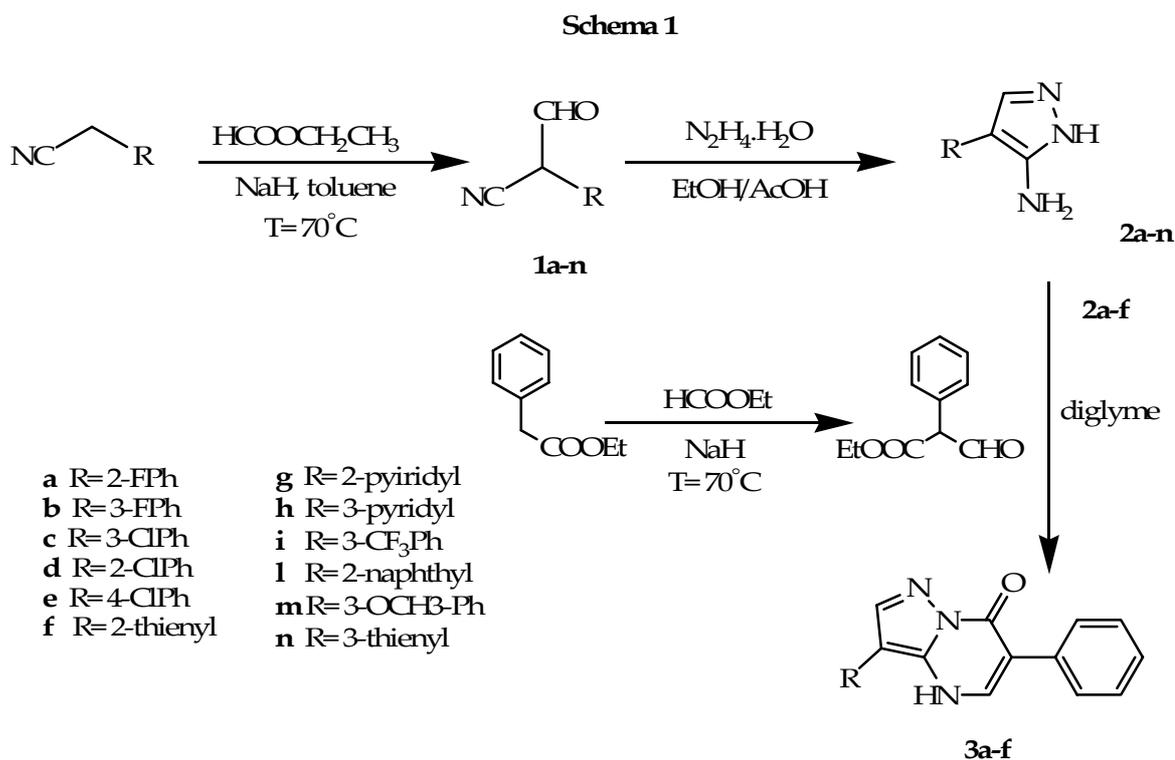
studio dei limiti spaziali per la cavità che alloggia i sostituenti in posizione 3 e in posizione 6.

I.3- Parte Chimica

La sequenza sintetica per la realizzazione dei nuovi composti 3-aril-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-oni (**3a-f**) si articola in 3 passaggi.

Il primo passaggio prevede la reazione di condensazione di Claisen fra gli opportuni acetonitrili 2-aril-sostituiti (intermedi che sono stati utilizzati anche per la sintesi di altri composti finali facenti parte di questo progetto di tesi) e formiato di etile (Schema 1). Dai formil derivati così ottenuti (**1a-n**) si realizza la chiusura ad aminopirazoli (**2a-n**) mediante idrazina idrata in ambiente alcolico con catalisi acida (Schema 1).

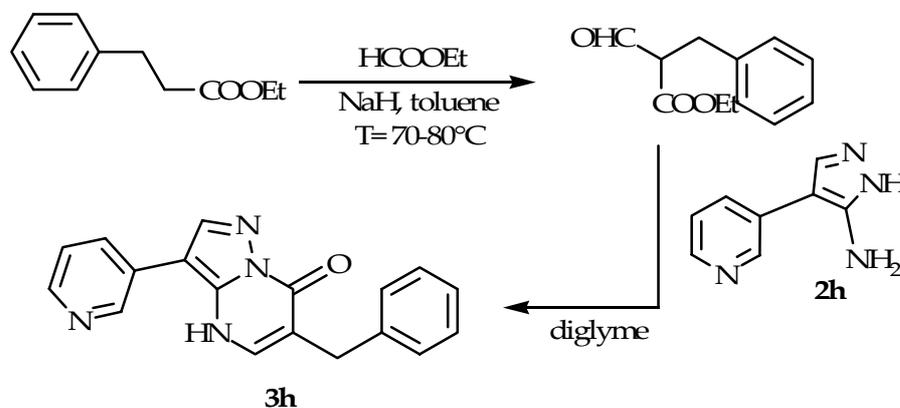
Il terzo passaggio prevede l'uso del fenilformilacetato di etile, ottenuto grazie ad una condensazione di Claisen tra fenilacetato di etile e formiato di etile (Schema 1).



La reazione che porta alla chiusura a pirazolopirimidine (**3a-f**) ha un meccanismo che si compie in tre steps: per primo si verifica l'attacco nucleofilo del gruppo aminico sul gruppo formilico con formazione del doppio legame carbonio-azoto; successivamente avviene l'attacco del -COOEt sull'NH

pirazolico con formazione del carbonile e l'eliminazione di EtOH; infine si verifica uno shift del doppio legame C-N verso il legame C-C con l'eliminazione di una molecola di H₂O.

Schema 2



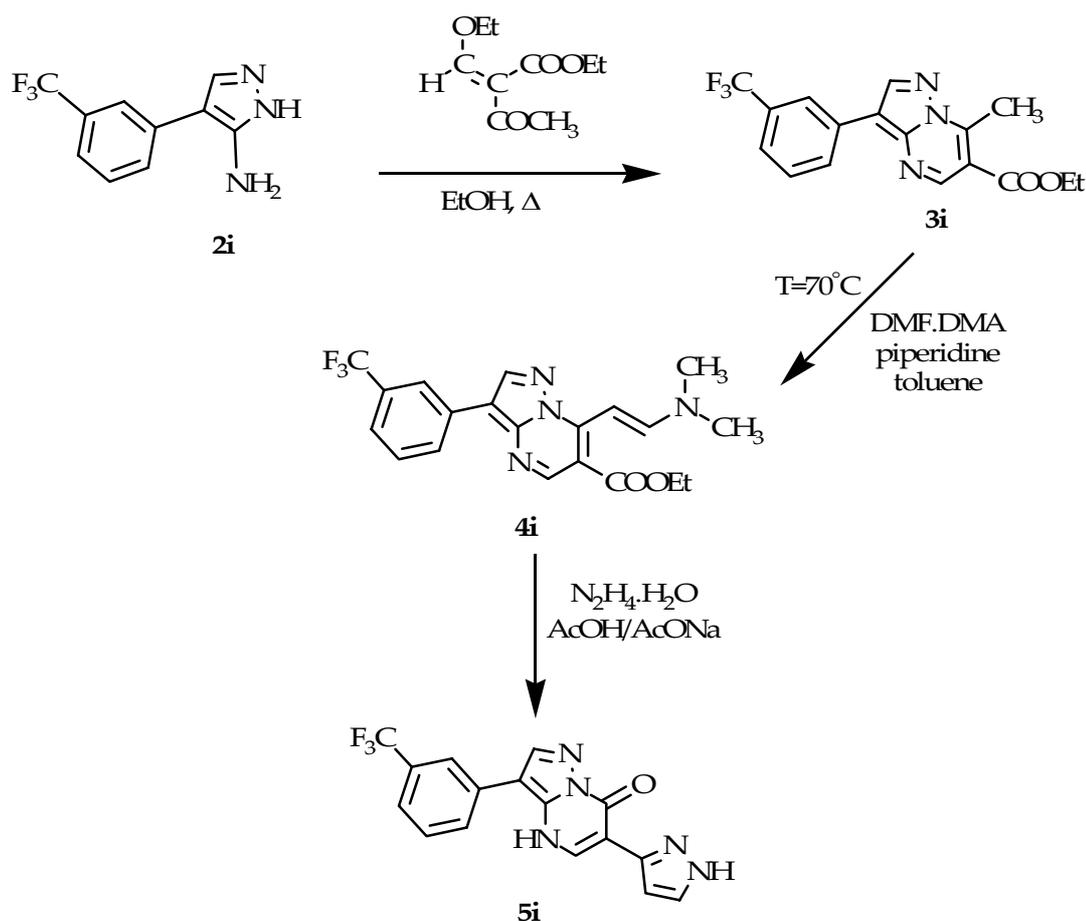
A completamento della serie delle pirazolo-pirimidine sono state sintetizzate la 3-(3-piridil)-6-benzilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (**3h**) e la 6-(1H-pirazol-3-il)-3-(3-(trifluorometil)fenil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (**5i**).

La sintesi del composto **3h** prevede reazioni analoghe a quelle viste per le altre pirazolo[1,5-*a*]pirimidine (**3a-f**) con la differenza che al posto del 2-formil-2-fenilacetato di etile viene usato il 2-formil-propionilacetato di etile (Schema 2).

Per ottenere il composto (**5i**) si parte dal corrispondente aminopirazolo (**2i**), si attua la chiusura a pirazolopirimidina con l'etil-2-acetil-3-etossiacrilato, la reazione porta all'ottenimento del composto **3i** recante un un gruppo carbossietilico in posizione 6 e un metile in 7. Il passaggio successivo prevede che si sfrutti l'acidità del 7-CH₃ per l'ottenimento del dimetilaminovinilderivato corrispondente (**4i**) mediante l'uso del DMF.DMA. Il passaggio finale della sintesi prevede la reazione con idrazina idrata che porta alla formazione dell'atteso pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-one (**5i**) (Schema 3).

Il meccanismo di queste ultime due reazioni viene descritto in dettaglio successivamente quando verrà riportata la sintesi delle pirazolo-triazine.

Schema 3

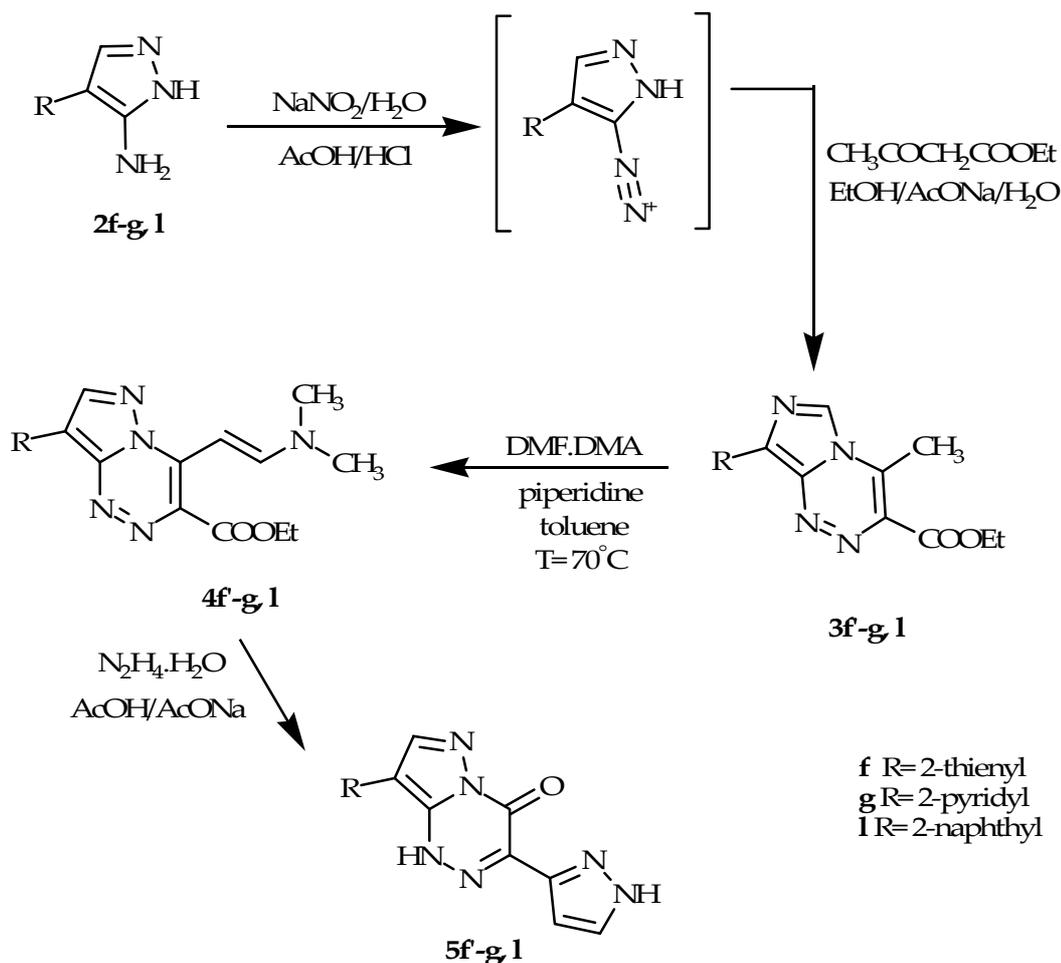


La sequenza sintetica per la realizzazione dei nuovi composti 4,7-diidro-3-aryl-6(1'*H*-pirazol-3'-il)pirazolo[5,1-*c*]triazin-7-oni (**5f'**, **g**, **1**) si articola in 5 passaggi.

I primi due passaggi sono comuni alla sintesi delle pirazolo-pirimidine e consistono nella formazione del nucleo 3(5)-aminopirazolico (vedi Schema 1).

Il terzo passaggio porta alla realizzazione del sistema biciclico pirazolo[5,1-*c*]triazinico (Schema 4). La reazione procede attraverso la formazione di sali di diazonio sul gruppo aminico esociclico degli aminopirazoli formati tramite acido nitroso (che come noto si ottiene *in situ* dalla reazione tra acido cloridrico concentrato e sodio nitrito). La reazione procede in tempi brevi e con successo, mantenendo rigorosamente la temperatura dell'ambiente di reazione tra 0° e 5°C. Successivamente si ha la copulazione dei diazoderivati per aggiunta di una soluzione di acetoacetato di etile in etanolo, che porta all'ottenimento dei corrispondenti 7-metilpirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilati di etile (**3f'**, **g**, **1**, Schema 4).

Schema 4



Nel complesso il terzo passaggio dell'intera sequenza sintetica avviene rapidamente (circa 2h) e i prodotti che si ottengono (**3f', g, 1**) sono purificabili tramite cromatografia su colonna.

L'atomo di carbonio in posizione 7 dei composti **3f', 3g, 31** risulta coniugato con l'intero sistema di elettroni π dell'anello ed è caratterizzato da un minimo di densità elettronica. Essa induce nel gruppo metilico legato al C₇ caratteristiche nettamente acide rilevabili dal valore del suo chemical shift, singolarmente alto per un gruppo metilico legato ad un carbonio.

La peculiarità del gruppo metilico in posizione 7 era già stata evidenziata in derivati a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico^{97,98}, dai quali i **3f', 3g, 31** differiscono esclusivamente per la presenza di un atomo di azoto in posizione 5.

Tale analogia strutturale ha permesso di sfruttare la reattività dei 7-metilderivati pirazolo[5,1-*c*]triazinici utilizzando il metodo sviluppato da Bredereck e collaboratori⁹⁹, che prevede l'impiego di acetali della dimetilformamide. Questa reazione consiste nell'attacco di derivati dell'acido formico quali dialchilamino dialcossimetani o bis (dialchilamino) monoalcossimetani su gruppi metilici o metilenici acidi.

La facilità della reazione è in relazione diretta con l'acidità del gruppo metilico o metilenico del substrato. Per valori di acidità molto deboli sono necessari reattivi molto energici quali il bis(dimetilamino)terbutossimetano o il tris(dimetilamino)metano; mentre per valori di acidità più elevati si possono usare reattivi meno energici e commercialmente più disponibili quali il dimetilamino dimetossimetano, più noto come dimetilacetale della dimetilformamide.

Il quarto step della sequenza sintetica prevede quindi la reazione dei 7-metilpirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilati di etile **3f'**, **3g**, **3l** con il dimetil-acetale della dimetilformamide (DMF.DMA), condotta in soluzione di toluene anidro a 80°C, con l'aggiunta di quantità catalitiche di piperidina, che porta ai corrispondenti 7-(2-dimetilaminovinil)pirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilati di etile **4f'**, **4g**, **4l** (Schema 4). L'aggiunta di piperidina si rende necessaria quando, o per motivi elettronici o per motivi sterici, il metile in posizione 7 risulta essere meno reattivo. In tal caso l'aggiunta di piperidina alla soluzione di DMF.DMA si presume porti alla formazione dell'aminale corrispondente, di gran lunga più reattivo dell'originario e capace di reagire in tempi assai più brevi¹⁰⁰.

La reazione di formazione dei dimetilaminovinilderivati è stata a lungo indagata a partire dai derivati 7-metilpirazolo[1,5-*a*]pirimidinici¹⁰¹; nel caso dei derivati 7-metilpirazolo[5,1-*c*]triazinici è stata osservata una riduzione dei tempi di reazione, imputabile probabilmente ad una maggiore reattività del gruppo metilico in posizione 7. I prodotti **4f'**, **4g**, **4l** sono purificabili tramite cromatografia su colonna.

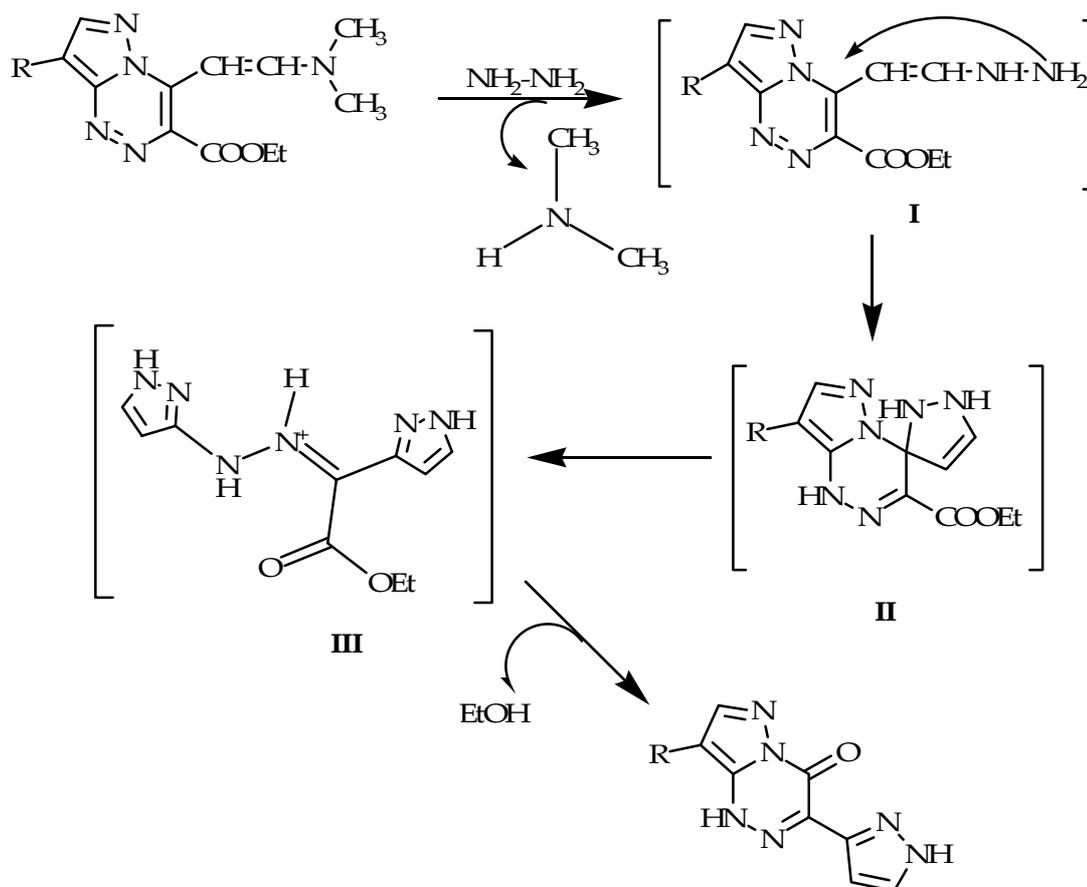
I dimetilaminovinilderivati (**4f'**, **g**, **l**) così isolati sono prodotti stabili, intensamente colorati di giallo. Il controllo cromatografico con TLC della reazione di Bredereck, evidenzia la presenza di due macchie di diversa intensità, dovute alla possibilità di isomeria *cis/trans* sul raggruppamento dimetilaminovinilico in posizione 7. La presenza dei due isomeri è evidenziabile dall'osservazione dello spettro ¹H-NMR del grezzo di reazione, ove sono presenti due set di segnali con differenti costanti di accoppiamento in corrispondenza della regione dei protoni vinilici.

I dimetilaminovinilderivati, essendo enammine a tautomeria bloccata derivante da un'aldeide, esplicano una pronta reattività nei confronti di sostanze a carattere nucleofilo quale l'idrazina e questa loro caratteristica è sfruttata nell'ultimo step di questa sequenza sintetica, per l'ottenimento dei prodotti finali (Schema 4).

Dalla reazione dei dimetilaminovinilderivati e idrazina, in acido acetico con sodio acetato, si ottengono i prodotti finali **5f'**, **5g**, **5l**. L'ambiente di reazione costituito dal tampone acetato è utile per l'ottenimento dei prodotti finali in forma pura.

Il meccanismo della reazione è molto complesso ed è stato approfonditamente indagato su composti analoghi a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico attraverso l'isolamento di intermedi e la loro caratterizzazione spettroscopica confermata da un'analisi diffrattometrica con raggi X¹⁰².

Schema 4a



Per similitudine strutturale ed analogia strutturale, si presuppone che il meccanismo di reazione nel caso dei derivati a nucleo pirazolo[5,1-*c*]triazinico sia analogo a quello dei sistemi pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici; anche i controlli cromatografici, effettuati durante lo svolgimento della reazione, sembrano confermare tale ipotesi, rivelando la formazione di vari intermedi prima dell'ottenimento dei prodotti finali. Il meccanismo di reazione prevede inizialmente la formazione di un intermedio lineare, derivante dall'attacco dell'idrazina idrata sul carbonio enaminico con conseguente eliminazione di dimetilamina (**I**). Successivamente l'attacco nucleofilo dell'azoto terminale dell'intermedio lineare formatosi, sul C⁷, elettronepovero, causa la chiusura di un secondo anello pirazolico con formazione di un composto spiro non isolabile (**II**). Si ha poi la rottura del legame tra il C-7 e l'N-8 che porta all'apertura dell'anello triazinico con formazione di un nuovo intermedio aperto (**III**) (Schema 4a).

Infine la reazione fra il gruppo etossicarbonilico e l'azoto in α alla catena imminica dell'ammino-pirazolo distale al gruppo etossicarbonilico stesso, dà origine ai prodotti finali per eliminazione di una molecola di etanolo. I composti **5f'**, **5g**, **5l** si realizzano in tempi molto lunghi e sono accompagnati da numerosi prodotti secondari che rendono indispensabile la loro purificazione tramite cromatografia su colonna.

Nell'ambito del processo di sintesi dei 7-metilpirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilati di etile, è necessario aprire una parentesi relativamente al composto che reca in posizione 3 un sostituito β -tienilico. Questo aminopirazolo sottoposto alla reazione di diazotazione, ha dato luogo ad un intermedio molto reattivo, per il quale è favorito un attacco intramolecolare, piuttosto che l'attesa reazione di copulazione con acetoacetato di etile. Infatti, nel caso di questo composto, l'atomo di azoto del sale di diazonio compie un attacco elettrofilo sulla posizione 2' del sostituito eteroaromatico dell'aminopirazolo. Tale attacco porta alla formazione di un composto triciclico, la cui struttura è stata confermata dall'analisi diffrattometrica a raggi X (nella figura I-10 è mostrata la struttura del composto derivante dal 3-(3-metossifenil)-aminopirazolo che ha una reattività identica all'omologo tienilico).

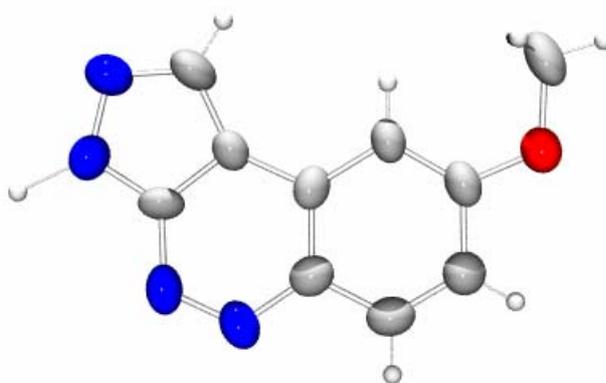
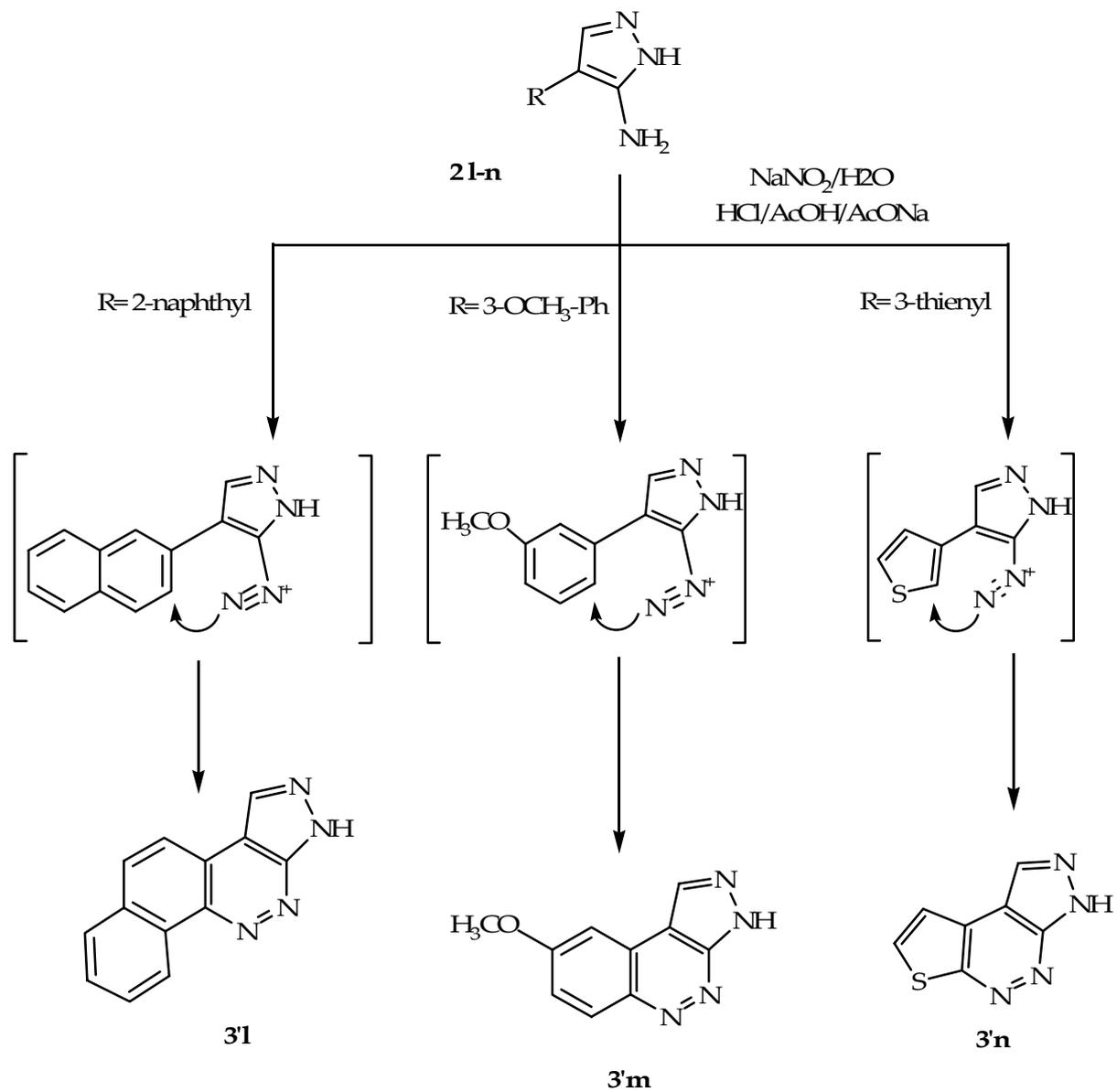


Fig.I-10-Diagramma della struttura cristallina, realizzato con programma ORTEP3, del composto 8-metossi-3H-pirazolo[3,4-c]cinnolina (3'm).

La spiegazione di tale reattività, apparentemente anomala, va ricercata nelle caratteristiche elettroniche del sostituito aromatico in 4 dell'aminopirazolo. Infatti sia il 3-3'-tienilaminopirazolo, sia il 3-3'-metossifenilaminopirazolo presentano la posizione 2' particolarmente ricca di elettroni e quindi più reattiva nei confronti di agenti elettrofili. Nell'aminopirazolo la posizione 2' dell'anello β -tienilico elettrone ricco è quella dotata della maggiore densità elettronica; lo stesso si può dire per la posizione 2 dell'anello meta-metossi-fenilico.

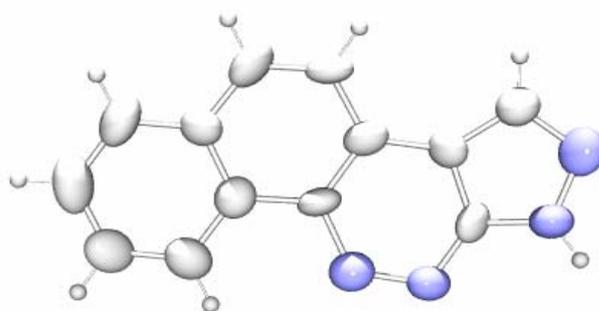
Per avere ulteriore conferma che la reazione procede secondo l'attacco intramolecolare ipotizzato, con formazione del composto triciclico sopraindicato indipendente dalla presenza di acetoacetato di etile, è stata eseguita la reazione di diazotazione, in assenza dell'agente copulante; come atteso, si ottiene la formazione dei sistemi triciclici suddetti (3'n, 3'm, Schema 5).

Schema 5



La reazione di diazocopolazione sull'aminopirazolo **21** ha dato luogo, oltre al prodotto atteso (**31**, Schema 4), ad un derivato secondario (**3'1**), identificato successivamente tramite diffrazione a raggi X (fig. I-11). Il prodotto **3'1** non è noto in letteratura. Tale composto a struttura tetraciclica deriva dall'attacco elettrofilo intramolecolare compiuto dall'atomo di azoto del sale di diazonio sul carbonio α del sostituente naftilico in posizione 4 dell'aminopirazolo (Schema 5).

La spiegazione di tale reattività può essere ricercata nelle caratteristiche elettroniche del sostituente e nella cinetica di reazione. Nel caso dell'aminopirazolo **21** l'attacco intramolecolare in α è cineticamente favorito a temperatura ambiente e compete quindi con la reazione di copolazione con acetoacetato di etile.



*Fig.I-11- Diagramma della struttura cristallina, realizzato con programma ORTEP3, del composto 1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolina (**3'1**).*

Queste strutture tricycliche e tetracycliche sono diventate oggetto d'indagine con target biologico diverso, che sarà oggetto di discussione nella Parte III di questa tesi.

L'obiettivo sintetico è, quindi, diventato la sintesi delle pirazolo[5,1-c]triazine recanti in posizione 3 rispettivamente l'anello β -tienilico e l'anello meta-metossi-fenilico a completamento della serie pirazolo-triazinica progettata.

La prima alternativa sintetica è stata individuata con la reazione di Suzuki che prevede l'introduzione di sostituenti aromatici su bromo-derivati mediante l'uso di opportuni acidi boronici.

Nel nostro caso si tratta di far reagire l'acido tiofenboronico con il 3-Br-7-metil-pirazolo[1,5-c]triazin-6-carbossilato di etile (**50**) precedentemente preparato.

L'ottenimento di quest'ultimo viene riportato nello Schema 6 a partire dal corrispondente 3(5)-aminopirazolo (**30**) preparato secondo la via sintetica riportata, attraverso tre passaggi.

La prima reazione consiste nella formazione dell'etil-4-amino-1H-pirazolo-3-carbossilato (**10**) partendo dall'etil-2-cianoacrilato e idrazina idrata. È una reazione che avviene in ambiente alcolico facendo uso di idrazina idrata con meccanismo del tutto simile alle sintesi già descritte per altri aminopirazoli.

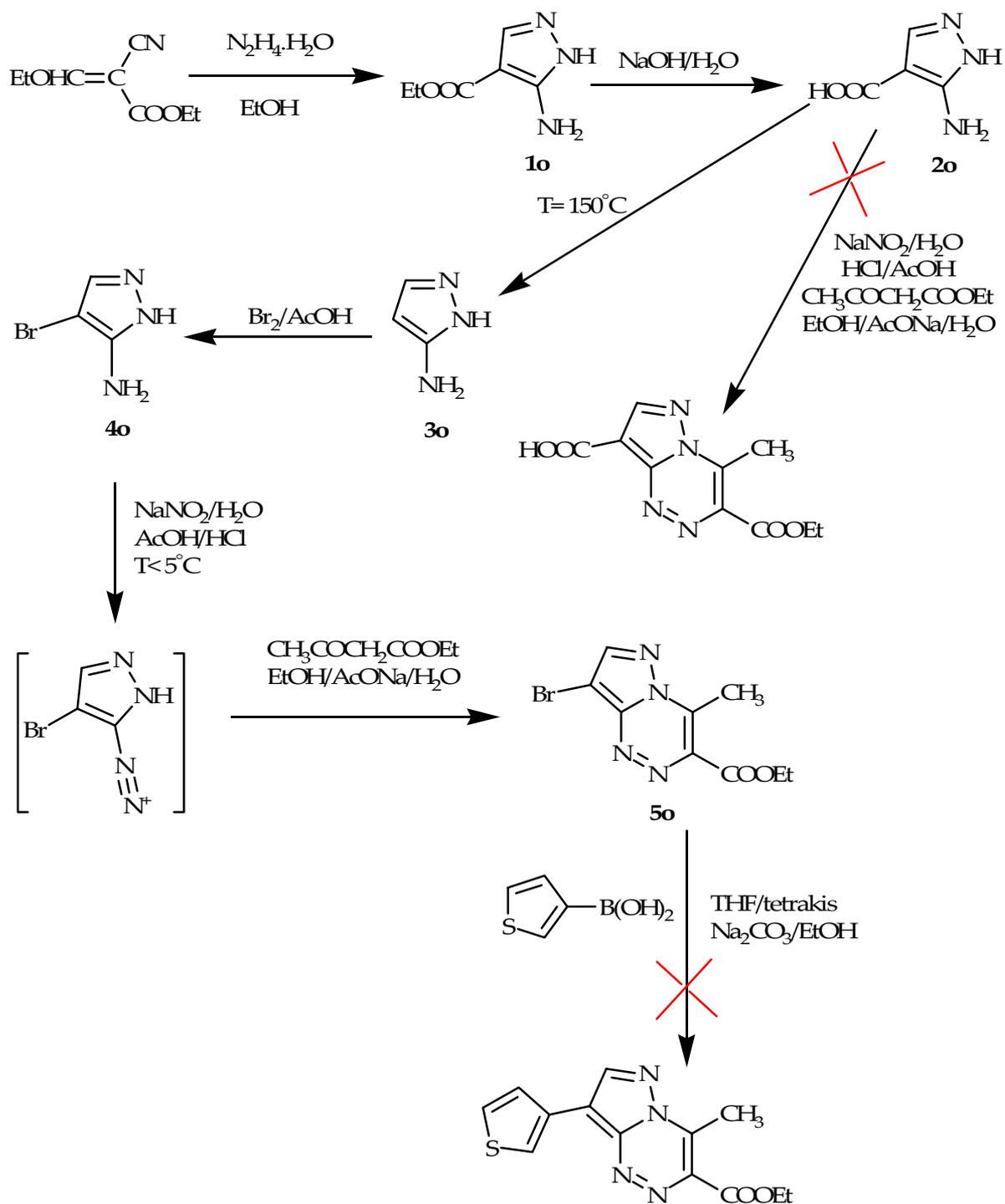
La seconda reazione è un'idrolisi in ambiente basico (NaOH 4N) in cui il gruppo estereo dell'etil-4-amino-1H-pirazolo-3-carbossilato viene idrolizzato a gruppo carbossilico, per dare l'atteso 3-carbossi-4-amino-1H-pirazolo (**2o**). Il passaggio successivo è una semplice decarbossilazione a secco, che avviene portando la temperatura a circa 150°C e ottenendo così l'aminopirazolo privo di sostituenti in posizione 3 (**3o**).

A questo punto avviene l'introduzione dell'atomo di Br attraverso una bromurazione in ambiente acido, con la formazione del 3-Br-4-amino-1H-pirazolo (**4o**). Il composto **4o** viene poi trasformato nel corrispondente 7-metilpirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilato di etile (**5o**) grazie alla stessa reazione precedentemente descritta per le altre pirazolo-triazine.

Nel passaggio successivo si fa reagire l'intermedio bromurato **5o** con l'acido 3-tiofenboronico (reazione di Suzuki) in modo da ottenere il 7-metil-3-(tien-3-il)pirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilato di etile. La reazione prevede l'uso del tetrakis come catalizzatore e del tetraidrofurano come solvente, ma quest'ultimo passaggio sintetico non porta ai risultati attesi (Schema 6).

Si è pertanto tentata l'introduzione del gruppo tienilico con una variante della reazione di Suzuki sul 7-metil-3-carbossi-pirazolo[5,1-*c*]triazin-6-carbossilato di etile. Questo intermedio, teoricamente, può essere ottenuto dall'aminopirazolo corrispondente mediante la reazione già vista e precedentemente descritta per la sintesi delle pirazolo-triazine (Schema 4); anche in questo caso non siamo riusciti ad ottenere il prodotto atteso.

Schema 6

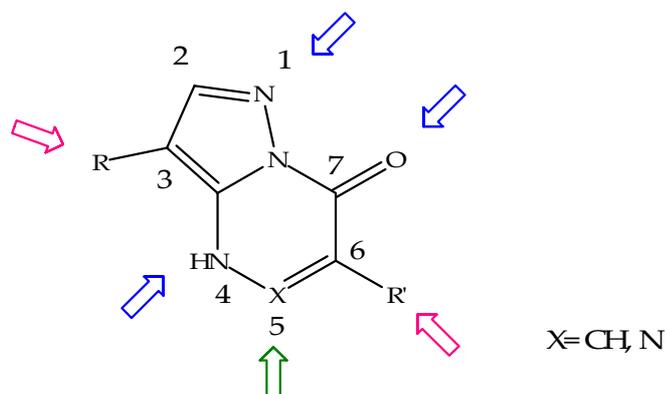


I.4- Relazioni Struttura-Affinità/ Attività

Lo studio delle relazioni struttura-affinità/attività di ligandi al BzR a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico e pirazolo[5,1-*c*]triazinico è da tempo oggetto di ricerca nel laboratorio del Prof. Bruni, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche.

All'interno della classe pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica si collocano quattro serie, ognuna caratterizzata da un diverso sostituente in posizione 6: pirazolica, β -tienilica, fenilica e benzilica.

La classe di ligandi a nucleo pirazolo[5,1-*c*]triazinico si inserisce nel quadro delle relazioni struttura-affinità/attività tra ligandi e BzR, come analoghi strutturali della classe pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica.



Qui di seguito vengono riportati i requisiti strutturali essenziali per il riconoscimento recettoriale, emersi dallo studio SAFIR/SAR da tempo intrapreso.

- *Posizione 1*: si ipotizza che l'azoto in questa posizione sia coinvolto tramite un legame a tre centri, con il gruppo carbonilico in 7 e il sito recettoriale donatore di legame ad idrogeno, H₁. Sono stati progettati e realizzati composti recanti sull'azoto in posizione 1 un gruppo metilico, questi sono risultati al binding con diminuiti valori di affinità, confermando l'ipotesi di un legame con il recettore coinvolgente N-1, CO-7 e il sito donatore di legame a idrogeno (H₁) del recettore.
- *Posizione 4*: sull'azoto in questa posizione sono state realizzate sostituzioni con gruppi alchilici di vario tipo (Me, Et, ...), e i risultanti ligandi, pur mantenendo il riconoscimento per il sito recettoriale, presentavano valori di affinità notevolmente minori. Ciò ha fatto ipotizzare che il gruppo NH in posizione 4⁹¹ fosse coinvolto in un legame ad idrogeno con il sito accettore (H₂/A₃) sulla proteina recettoriale.

- *Posizione 7*: il gruppo carbonilico in questa posizione risulta essenziale per il riconoscimento recettoriale, infatti sembra coinvolto in un legame ad idrogeno con il sito H₁. Questa ipotesi è confermata dalla mancanza di riconoscimento recettoriale per i composti recanti in 7 un gruppo metossilico, un atomo di zolfo o un gruppo metilenico. Anche i prodotti che presentano rispettivamente un gruppo clorometilico e benzilico in tale posizione, sono privi di affinità per il recettore.
- *Posizione 6*: i sostituenti in questa posizione vanno a collocarsi in un'area lipofila della proteina recettrice che sembrerebbe di dimensioni minori rispetto alla cavità che accoglie i sostituenti in 3. Riguardo alla posizione 6, studi di binding sulla serie pirazolica hanno evidenziato la possibilità di introdurre raggruppamenti alchilici sugli atomi di azoto del pirazolo, portando anche un miglioramento dell'affinità. Bisogna precisare che la cavità lipofila in cui si colloca il sostituente in 6 ha delle limitazioni spaziali: alchilare l'azoto in prossimità del legame tra l'anello pirazolico ed il nucleo biciclico può risultare sfavorevole. E' importante sottolineare inoltre che studi di binding hanno dimostrato la non essenzialità dell'anello pirazolico; sono state realizzate infatti una serie 6-fenilica⁹¹, 6-β-tienilica⁹⁴ e 6-benzilica che fanno registrare da buoni a ottimi valori di affinità. Un sostituente stericamente meno ingombrante, come il gruppo etossicarbonilico in posizione 6, porta ad una mancanza di riconoscimento per la tasca lipofila del recettore.
- *Posizione 3*: anche i sostituenti della posizione 3 vanno a collocarsi in una tasca lipofila della proteina recettrice che, come si è detto, si ipotizza essere più ampia di quella che accoglie il sostituente in 6 e caratterizzata da residui aminoacidici diversi. Quest'ultima ipotesi nasce dalla valutazione dei valori di affinità ottenuti interscambiando fra loro i due sostituenti in 3 e 6. Una conoscenza più precisa, relativa ai requisiti strutturali capaci di discriminare fra le diverse tasche lipofile, è forse l'indirizzo più attuale per la sintesi di nuovi ligandi α₁ sottotipo-selettivi.
Ritornando all'analisi della posizione 3, bisogna dire che il lavoro degli ultimi anni ha portato ad un'ottimizzazione strutturale con funzionalizzazione dell'anello benzenico attraverso l'introduzione di sostituenti di varia natura e la sostituzione del fenile con anelli eteroaromatici di diverse dimensioni. E' stata valutata anche l'influenza degli effetti elettronici (σ), sterici (E_s) e lipofili (π) sull'attività biologica attraverso opportune sostituzioni sulle posizioni 2, 3 e 4 dell'anello fenilico.
I sostituenti elettrondonatori in posizione meta al fenile, fanno registrare i migliori valori di affinità in entrambe le serie 6-pirazolica e 6-fenilica: questo fa pensare che tali sostituenti interagiscano favorevolmente, tramite legami ad idrogeno, con residui aminoacidici della proteina recettrice all'interno della tasca lipofila, dove va a collocarsi il sostituente in posizione 3.

Questi risultati suggeriscono che tale tasca possieda una precisa orientazione spaziale rispetto alla struttura rigida biciclica planare, in cui il ligande è costretto per realizzare l'interazione ottimale coinvolgente i siti H₁, H₂/A₃ del recettore precedentemente descritti.

- *Posizione 2*: attraverso l'introduzione di un sostituente alchilico o arilico in questa posizione abbiamo ottenuto molecole prive di riconoscimento recettoriale¹⁰³. In letteratura sono comunque presenti molecole a nucleo pirazolo-triazinico in cui la presenza di un sostituente in posizione 2 conferisce non solo riconoscimento recettoriale ma anche sottotipo selettività (α_1 - α_3)¹⁰⁴.
- *Posizione 5*: l'introduzione di un metile sull'atomo di carbonio in 5 ha portato ad un derivato totalmente privo di affinità che suggerisce la probabile esistenza, in corrispondenza della suddetta posizione per derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici, di una zona proibita per il ligande e totalmente occupata dalla proteina recettrice (S₂).

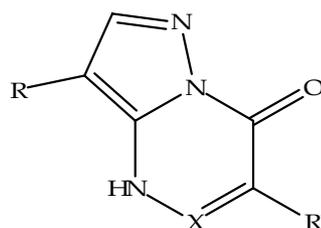
Le prove di binding sulla nuova classe di pirazolo[5,1-*c*]triazine per valutare l'affinità recettoriale su BzR sono state effettuate presso il Dipartimento di Psichiatria, Neurobiologia, Farmacologia e Biotecnologie dell'Università di Pisa nel laboratorio della Prof.ssa Martini.

I composti realizzati in questo lavoro di tesi appartenenti alle serie: pirazolo-pirimidinica 6-fenilica, 6-pirazolica, 6-benzilica e pirazolo-triazinica hanno permesso una più accurata valutazione dell' α sottotipo-selettività di cui i ligandi risultano essere dotati. Ciò ha permesso:

- una selezione di questi per indirizzare lo studio alle prove in vivo e la definizione dei requisiti di α_1 e α_5 sottotipo-selettività;
- un incremento del numero di dati per l'elaborazione di un modello di interazione tridimensionale QSAR in corso di realizzazione su templati di proteine pentameriche a canale, quali nAChBP e GLIC.

La capacità dei derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici e pirazolo[1,5-*c*]triazinici di interagire con il sito di legame per le benzodiazepine associato al complesso recettoriale GABA_A, è stata valutata tramite studi di binding su omogenati di membrane corticali bovine, usando come ligande marcato [³H]Ro15-1788. Come si vede dai dati della Tabella 1 i composti **3h** e **5i** hanno buoni valori di affinità al CBR; inoltre poiché è possibile avanzare un'ipotesi di classificazione dei ligandi per attività intrinseca, valutata sulla base dei valori di GABA ratio è stato scelto per il prosieguo dei test *in vivo* il composto **3h**, che risulta essere un *full agonist*, esertando, a seguito del legame con il CBR, un effetto massimale sulla corrente GABAergica.

Tabella I.4.1



Composti	X	R	R'	K _i (nM) ^a	α ₁	α ₂	α ₃	α ₅
3a	CH	2-FPh	Ph	228,9 ±22	319 ±25	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	150,5 ±15
3b	CH	3-FPh	Ph	147,4 ±7	180,6 ±15	906 ±90	<i>n.t.</i>	916,1 ±19
3c	CH	3-ClPh	Ph	282,2 ±7	209,4 ±15	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	50,5 ±3,0
3d	CH	2-ClPh	Ph	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
3e	CH	4-ClPh	Ph	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
3f	CH	α-Tienil	Ph	215 ±10	166,8 ±10	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	258,4 ±20
5f'	N	α-Tienil	β-Pirazol	236,9 ±18	284,8 ±25	41.2 ±0.4	28%	662,2 ±60
5g	N	α-Piridil	β-Pirazol	10.5 ±1.0	9.1 ±0.9	12 ±0.1	<i>n.t.</i>	32%
5l	N	2-Naftil	β-Pirazol	2298 ±96	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
3h	CH	β-Piridil	Benzil	73,3 ±3	183 ±18	14 %	<i>n.t.</i>	31 %
5i	CH	3-CF ₃ Ph	β-Pirazol	19.4 ±2.0	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>

^a I valori di K_i sono la media SEM di cinque determinazioni

Alcuni spunti interessanti sono offerti anche dagli altri composti, ad esempio **3a** e **3b**. Queste due molecole presentano in posizione 3 un sostituente arilico recante rispettivamente un atomo di fluoro in posizione orto e meta. Questa differenza però porta ad una diversa sottotipo-selettività tra le due molecole: il composto con il fluoro in orto (**3a**) ha una maggiore affinità per il sottotipo α₅ rispetto al sottotipo α₁, mentre il composto **3b**, che ha il fluoro in meta, ha una marcata sottotipo-selettività di tipo α₁.

Dalla tabella si possono, inoltre, mettere in evidenza le variazioni di affinità causate dal tipo di alogeno presente sul sostituente fenilico in posizione 3. Si prendono in considerazione i composti **3b** e **3c**: entrambi recano in 3 un anello acrilico meta-sostituito; il composto **3b** reca in tale posizione un atomo di fluoro, mentre il **3c** un atomo di cloro. Per quanto riguarda la sottotipo-selettività α₁/α₅ delle due molecole, si notano differenze sostanziali attribuibili all'alogeno: la presenza del F porta ad avere una maggiore α₁ sottotipo-selettività, mentre la presenza del Cl sposta la selettività verso il sottotipo α₅. Inoltre si nota che il composto **3c** è interessante anche per il buon valore di affinità rilevato per la subunità α₅ (K_i= 50,5).

Risulta inoltre interessante confrontare la serie 6-fenilica delle pirazolo[1,5-*a*]pirimidine con la serie pirazolo[5,1-*c*]triazinica: per quanto riguarda i composti **3f** e **5f'**, recanti un anello α -tienilico in posizione 3, sembra che l'anello eteroaromatico in tale posizione conferisca alla molecola una maggiore affinità per il sottotipo α_1 . Un'ulteriore osservazione che può essere fatta riguarda la maggiore affinità del composto **3f** rispetto al composto **5f'** per i sottotipi α_1/α_5 : probabilmente ciò è imputabile alla differente lipofilia conferita alla serie pirazolo-pirimidinica dal fenile in posizione 6, rispetto al pirazolo della serie pirazolo-triazinica.

Per concludere, bisogna aggiungere che è attualmente in corso uno studio *in vivo* presso il laboratorio della Prof. ssa Ghelardini del Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Firenze.

Questo studio riguarda la valutazione dell'attività ansiolitica (Light-Dark Box Test e Rat Elevated Plus Maze Test) di alcuni ligandi sintetizzati presso il nostro laboratorio, tra cui il composto **3h**, considerati come analoghi dell'Ocinaplon.

Per completare tale studio, occorrerebbero anche i dati di tali esperimenti condotti con l'Ocinaplon, ma purtroppo questo, non essendo più in commercio, non è reperibile, neppure come campione a scopo di ricerca.

Al momento stiamo tentando di sintetizzare l'Ocinaplon presso il nostro laboratorio, con i dati relativi alla sintesi riportati nel Patent¹⁰⁵.

I.5- Parte Sperimentale

I.5.1- Parte Sperimentale Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Gallenkamp e non sono corretti.

Le analisi elementari sono state realizzate per C, H, N con apparecchio Perkin Elmer 240 C e risultano \pm 0,4% dei valori teorici.

Lo spettro ^1H è stato realizzato con apparecchio Avance 400 Bruker e i chemical shifts sono stati riportati in δ (ppm).

I campioni sono stati controllati con T.L.C. realizzata con lastrine Merck silica gel F 254. La separazione cromatografica è stata realizzata utilizzando gel di silice 60 (Merck, 70-230 mesh).

L'indagine diffrattometrica a raggi X è stata eseguita con diffrattometro OXFORD XCALIBUR3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 0.71068 \text{ \AA}$) del Centro Intradipartimentale di Cristallografia Strutturale (C.R.I.S.T.), ad opera della Dott.ssa Carla Bazzicalupi.

Procedura generale per la preparazione di 2-formilacetoni-trili (1a-n).

Ad una sospensione di sodio idruro al 50% in olio minerale (50 mmol) viene aggiunto toluene anidro (100 ml) in un pallone da un litro. La miscela viene riscaldata a 70°C e una soluzione dell'opportuno acetonitrile (50 mmol) e formiato di etile (55 mmol, 5 ml) in toluene anidro (50 ml), viene aggiunta goccia a goccia in un'ora. Dopo 6 ore sotto agitazione e riscaldamento a $70^\circ\text{-}80^\circ\text{C}$, il solido ottenuto viene lasciato a riposo per una notte.

La miscela viene poi trattata con ghiaccio (100 ml) e la fase acquosa è separata e lavata con etere dietilico. L'acidificazione con acido cloridrico concentrato causa la separazione di un olio che viene estratto con etere dietilico. Gli estratti vengono anidrificati con solfato di sodio e ridotti di volume sottovuoto ottenendo un prodotto solido.

2-(2-fluorofenil)-3-oxopropanonitrile (1a)¹⁰⁶

2-(3-fluorofenil)-3-oxopropanonitrile (1b)¹⁰⁶

2-(3-clorofenil)-3-oxopropanonitrile (1c)¹⁰⁶

2-(2-clorofenil)-3-oxopropanonitrile (1d)¹⁰⁶

2-(4-clorofenil)-3-oxopropanonitrile (1e)¹⁰⁶

3-oxo-2-(tiofen-2-il)propanonitrile (1f)¹⁰⁷

3-oxo-2-(piridin-2-il)propanonitrile (1g)¹⁰⁸

3-oxo-2-(piridin-3-il)propanonitrile (1h)¹⁰⁸

3-oxo-2-(2-(trifluorometil)fenil)propanonitrile (1i)¹⁰⁹

2-(naftalen-2-il)-3-oxopropanonitrile (1l)¹¹⁰

2-(3-metossifenil)-3-oxopropanonitrile (1m)¹¹¹

3-oxo-2-(tiofen-3-il)propanonitrile (1n)¹⁰⁷

Procedura generale per la preparazione di 3-aminopirazoli 4-eteroarilsostituiti (2a-n).

Ad una soluzione dell'opportuno formilacetone nitrile 2-sostituito (**1a-n**) (25 mmol) in etanolo (50 ml), viene aggiunta idrazina idrata (50 mmol) e acido acetico glaciale (5 ml); la miscela di reazione viene tenuta a riflusso per circa 3-4 ore sotto agitazione magnetica. Quindi viene evaporato l'etanolo, si raffredda il residuo ceroso in bagno di ghiaccio e si aggiunge acqua per favorire la precipitazione. Il solido formatosi viene filtrato e lavato con acqua.

4-(2-fluorofenil)-1H-pirazol-5-amino (2a)⁹⁰

4-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-5-amino (2b)⁹⁰

4-(3-clorofenil)-1H-pirazol-5-amino (2c)¹¹²

4-(2-clorofenil)-1H-pirazol-5-amino (2d)¹¹²

4-(4-clorofenil)-1H-pirazol-5-amino (2e)¹¹²

4-(tiofen-2-il)-1H-pirazol-5-amino (2f)¹¹³

4-(piridin-2-il)-1H-pirazol-5-amino (2g)⁹⁴

4-(piridin-3-il)-1H-pirazol-5-amino (2h)⁹⁴

4-(3-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-5-amino (2i)⁹⁰

4-(3-metossifenil)-1H-pirazol-5-amino (2m)¹¹³

4-(tiofen-3-il)-1H-pirazol-5-amino (2n)¹¹³

Procedura per la preparazione del 2-formilfenilacetato di etile.

Una sospensione di NaH in un olio minerale (50 mmol) in toluene (50 ml) viene scaldata sotto agitazione. Nella miscela ottenuta viene sgocciolata in un'ora una soluzione composta da fenilacetato di etile (50 mmol), formiato di etile (55 mmol) e toluene anidro (80 ml); la temperatura viene portata a 70°C. La miscela di reazione viene riscaldata sotto agitazione per circa 5 ore. Successivamente viene estratto il sale sodico in acqua e vengono lavate le impurezze con etere dietilico. La fase acquosa viene acidificata con HCl concentrato fino a pH 3. Si forma una massa gelatinosa che viene estratta con etere dietilico, si anidrififica con solfato di sodio e si riduce di volume sottovuoto. Si ottiene un olio giallo che viene fatto precipitare con etere isopropilico, quindi si filtra sottovuoto il solido bianco ottenuto.

Olio giallo (ceroso all'aria), resa 65%, p.f. 109°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,28 (t, 3H, CH₃ etile), 4,12 (q, 2H, CH₂ etile), 7,24-7,56 (m, 5H, Ph), 8,90 (s, 1H, CH), 10,95 (s slargato, 1H, CHO).

Procedura generale per la sintesi dei 3-aril-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3a-f)

Ad una sospensione del 2-formil-fenilacetato di etile (11 mmol) in diglyme (10 ml), si aggiunge il 3-aril-4-amino pirazolo corrispondente (**2a-f**). La miscela viene messa sotto agitazione a refluxo per circa 4 ore. Durante questo tempo si nota, prima un viraggio del colore della soluzione e poi la formazione di un precipitato. Il solido viene filtrato sottovuoto e lavato con diglyme.

3-(2-fluorofenil)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3a)

Cristalli gialli, resa 50%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,31-7,70 (m, 9H, 6-Ph, 3-oFPh), 8,03 (s, 1H, H-2), 8,17 (s, 1H, H-5), 12,59 (s, 1H, NH scambiabile).

3-(3-fluorofenil)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3b)

Cristalli bianchi, resa 66%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,13-7,70 (m, 9H, 6-Ph, 3-mFPh), 8,01 (s, 1H, H-2), 8,36 (s, 1H, H-5), 12,66 (s, 1H, NH scambiabile).

3-(3-clorofenil)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3c)

Cristalli bianchi, resa 49%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,35-7,72 (m, 9H, 6-Ph, 3-mClPh), 8,01 (s, 1H, H-2), 8,36 (s, 1H, H-5), 12,73 (s, 1H, NH scambiabile).

3-(2-clorofenil)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3d)

Cristalli bianchi, resa 19%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,36-7,46 (m, 5H, 6-Ph), 7,54-7,70 (m, 4H, 3-oClPh), 8,01 (s, 1H, H-2), 8,09 (s, 1H, H-5), 12,63 (s, 1H, NH scambiabile).

3-(4-clorofenil)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3e)

Cristalli bianco-rosati, resa 13%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,35 (dd, 1H, 6-Ph), 7,39-7,52 (dd, 2H, 6-Ph), 7,44-7,55 (d, 2H, 3-pClPh), 7,69 (m, 4H, 3-pClPh, 6-Ph), 8,00 (s, 1H, H-5), 8,32 (s, 1H, H-2), 12,66 (s, 1H, NH scambiabile).

3-(tiofen-2-il)-6-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3f)

Solido grigio, resa 45%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7,19-7,70 (m, 8H, 3-αtienil, 6-Ph), 7,99 (s, 1H, H-2), 8,18 (s, 1H, H-5), 12,60 (s, 1H, NH scambiabile).

Procedura per la sintesi del 3-(3-piridil)-6-benzilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one (3h)

Ad una sospensione del 2-formil-propionilacetato di etile (11 mmol) in diglyme (10 ml), si aggiungono 10 mmol di **2h**. La miscela viene messa sotto agitazione a riflusso per circa 4 ore. Durante questo tempo si nota prima un viraggio del colore e poi la formazione di un precipitato. Il solido viene filtrato sottovuoto e lavato con diglyme.

Solido bianco, resa 29%, p.f. 292°-294°C, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 3,823 (s, 2H, CH₂); 7,191-7,321 (m, 5H, Ph), 7,42-7,48 (dd, 1H, 3-piridil), 7,86 (s, 1H, H-2), 8,01-8,02 (d, 1H, 3-piridil), 8,31 (s, 1H, H-5), 8,50-8,51 (d, 1H, 3-piridil), 8,85-8,86 (d, 1H, 3-piridil), 12,35 (s, 1H, NH scambiabile).

Procedura per la formazione del 7-metil-3-(3-(trifluorometil)fenil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-6-carbossilato di etile (3i)

Una miscela di etil-2-acetil-3-etossiacrilato (55 mmol) e **2i** (50 mmol) in etanolo (100 ml) viene messa a riflusso sotto agitazione magnetica per 8 ore. Dopo raffreddamento il precipitato di colore giallo viene recuperato tramite filtrazione⁹⁰.

Procedura per la formazione del 7-(2-(dimetilamino)vinil)-3-(3-(trifluorometil)fenil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-6-carbossilato di etile (4i)

Ad una soluzione del composto **3i** (5mmol) in toluene anidro (100 ml) si aggiungono piperidina (0,5 ml) e DMA/DMF (10 mmol) e si lascia sotto agitazione magnetica a 70°C per 8 ore. Dopo aver evaporato il toluene, si recupera un olio giallo che precipita come solido in etere isopropilico e viene recuperato filtrando sottovuoto.

Il composto viene purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente cicloesano/EtOAc (2/1).

Solido arancione, resa 17%, p.f. 158°-160°C, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,68-1,69 (t, 3H, CH₃ etile), 3,31 (s, 3H, NCH₃), 3,52 (s, 3H, NCH₃), 4,28-4,29 (q, 2H, CH₂ etile), 7,61-7,62 (d, 1H, CH), 8,30-8,37 (m, 4H, 3-CF₃Ph), 8,61 (s, 1H, H-5), 9,96 (s, 1H, H-2), 10,05-10,10 (d, 1H, CH).

Procedura per la sintesi del 6-(1H-pirazol-3-il)-3-(3-(trifluorometil)fenil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-one(5i)

Una soluzione di **4i** (1 mmol) e acido acetico (10 ml) viene messa a riflusso e sotto agitazione magnetica, quindi si aggiungono acetato di sodio (0,2 g) e idrazina idrata (1 mmol). La reazione va avanti per 6 ore.

Successivamente si aggiunge acqua per favorire la precipitazione ma il precipitato non si forma; si estrae con etile acetato, si evapora e si mette nell'essiccatore (con NaOH) per eliminare i residui di acido.

Il composto viene purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10/1).

Cristalli giallo chiaro, resa 46%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6,61-6,67 (t, 1H, 3-mCF₃Ph), 7,36-7,37 (d, 1H, 6-pirazolo), 7,43-7,44 (t, 1H, 3-mCF₃Ph), 7,53-7,54 (t, 1H, 3-mCF₃Ph), 8,36-8,37 (d, 1H, 6-pirazolo), 8,37 (s, 1H, H-2), 8,49 (s, 1H, 3-mCF₃Ph), 8,66 (s, 1H, H-5).

Procedura generale per la preparazione di 7-metilpirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilati di etile (3f', 3g, 3l).

Una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (**2f**, **2g**, **2l**, 10 mmol) in acido acetico (16 ml) e HCl concentrato (6 ml) viene raffreddata in bagno di ghiaccio fino a 5°C, quindi viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaNO₂ (10 mmol) in acqua (3 ml). Dopo circa un'ora si aggiungono a temperatura ambiente una soluzione di acetato di sodio (1 g) in acqua e una di acetoacetato di etile (10 mmol) in etanolo. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per un'ora, quindi si aggiunge acqua e, filtrando, si recupera il precipitato solido. Se non si ottiene un precipitato, si estrae con etile acetato e la fase organica viene evaporata, recuperando un solido.

7-metil-3-(tiofen-2-il)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (3f')

Il composto viene purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente Toluene/EtOAc (8/2).

Solido arancione, resa 58%, p.f. 138°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,39-1,43 (t, 3H, CH₃ etile), 3,04 (s, 3H, 7-CH₃), 4,46-4,51 (q, 2H, CH₂ etile), 7,23-7,26 (dd, 1H, 3-αtienil), 7,67-7,68 (dd, 1H, 3-αtienil), 7,86-7,87 (dd, 1H, 3-βtienil), 9,602 (s, 1H, H-2).

7-metil-3-(pirid-2-il)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (3g)

Solido scuro, resa 23%, p.f. 162°-164°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,41-1,44 (t, 3H, CH₃ etile), 3,14 (s, 3H, 7-CH₃), 4,48-4,53 (q, 2H, CH₂ etile), 7,40-7,42 (dd, 1H, 3-2piridile), 8,00-8,04 (dd, 1H, 3-2piridile), 8,64-8,66 (dd, 1H, 3-2piridile), 8,71-8,72 (dd, 1H, 3-2piridile), 9,17 (s, 1H, H-2).

7-Metil-3-(2-naftil)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (3l)

Cristalli bianchi da etanolo, resa 45%, p.f. 180°-185°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.5-1.58 (t, 3H, OCH₂CH₃), 3.2-3.32 (s, 3H, 7-CH₃), 4.55-4.70 (q, 2H, OCH₂CH₃), 7.4-8.5 (m, 7H, Naft), 7.8-8.1(m, 4H, Naft), 8.65-8.70 (s, 1H, H-2).

Procedura generale per l'ottenimento dei 7-(2-dimetilaminovinil)-3-eteroarilpirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilati di etile (4f', 4g, 4l).

Ad una sospensione dell'opportuno 7-metil-derivato (3f', 3g, 3l, 5 mmol) in toluene anidro (50 ml) vengono aggiunte DMF.DMA (10 mmol) ed una quantità catalitica di piperidina (0.5 ml). La miscela viene riscaldata a 70°-80°C sotto agitazione magnetica per tre ore. L'evaporazione sottovuoto della miscela di reazione porta all'ottenimento di prodotti solidi di colore giallo.

7-(2-dimetilaminovinil)-3-(tiofen-2-il)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (4f')

Il composto viene purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente Toluene/EtOAc/AcOH (8/2/1).

Solido giallo, resa 94%, p.f. 178°-180°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,35-1,39 (t, 3H, CH₃ etile), 3,66 (s, 6H, N(CH₃)₂), 4,36-4,41 (q, 2H, CH₂ etile), 6,78-6,81 (d, 1H, CH), 7,17-7,19 (dd, 1H, 3-tienile), 7,55-7,56 (dd, 1H, 3-tienile), 7,74-7,75 (dd, 1H, 3-tienile), 8,77 (s, 1H, H-2), 9,66-9,69 (d, 1H, CH-vinile).

7-(2-dimetilaminovinil)-3-(pirid-2-il)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (4g)

Il composto viene purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10/1).

Solido giallo, resa 36%, p.f. 202°-204°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,50-1,52 (t, 3H, CH₃ etile), 3,47 (s, 3H, N-CH₃), 3,72 (s, 3H, N-CH₃), 4,52-4,55 (q, 2H, CH₂ etile), 6,94-6,97 (d, 1H, CH cis), 7,08-7,11 (d, 1H, CH trans), 7,54-7,60 (dd, 1H, 3-piridile), 8,29-8,34 (dd, 1H, 3-piridile), 8,69-8,71 (dd, 1H, 3-piridile), 9,46-9,48 (d, 1H, CH-vinile), 9,91-9,98 (dd, 1H, 3-piridile), 10,90 (s, 1H, H-2).

7-(2-Dimetilaminovinil)3-(2-naftil)pirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (4l)

Cristalli giallo oca da metanolo, resa 70%, p.f. 197°-202°C, ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.49-1.51 (t, 3H, OCH₂CH₃), 3.15 (s slargato, 6H, N-(CH₃)₂), 4.45-4.60 (q, 2H, OCH₂CH₃), 7.00 (d, 1H, CH-vinile), 7.4-8.65 (m, 7H, NaftH), 8.90-9.00 (s, 1H, H-2), 9.75 (d, 1H, CH-vinile).

Procedura generale per l'ottenimento di 4,7-diidro-3-aril-6-(1'H-pirazol-3'-il)pirazolo[5,1-c]triazin-7-oni (5f', 5g, 5l).

Ad una soluzione dei composti 4f', 4g, 4l (1 mmol) in AcOH (10 ml) sono aggiunti 0,05 ml di idrazina idrata e 0,2 g di sodio acetato; si lascia a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 10 ore. Una volta raffreddata, si aggiunge acqua alla miscela di reazione e, filtrando, si recupera il precipitato solido. Se non si forma alcun precipitato, si estrae con etile acetato. Dopo aver anidrificato con solfato di sodio, si riduce di volume e si recupera un solido.

4,7-diidro-3-(tiofen-2-il)-6-(1'H-pirazol-3'-il)pirazolo[5,1-c]triazin-7-one (5f')

Il composto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH (10/1).

Solido grigio, resa 82%, p.f. >300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6,90-6,91 (d, 1H, 6-pirazolo), 7,09-7,10 (dd, 1H, 3-αtienile), 7,36-7,37 (dd, 1H, 3-αtienile), 7,54-7,55 (d, 1H, 6-pirazolo), 7,57-7,58 (dd, 1H, 3-αtienile), 8,23 (s, 1H, H-2).

4,7-diidro-3-(pirid-2-il)-6-(1'H-pirazol-3'-il)pirazolo[5,1-c]triazin-7-one (5g)

Il composto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, usando come miscela eluente EtOAc/MeOH (10/2).

Solido arancione, resa 66%, p.f. 297°-299°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6,40 (s, 2H, NH scambiabile), 7,10-7,12 (d, 1H, 6-pirazolo), 7,39-7,42 (t, 1H, 3-2piridile), 8,02-8,03 (t, 1H, 3-2piridile), 8,38-8,40 (d, 1H, 6-pirazolo), 8,68-8,72 (m, 2H, 3-2piridile), 9,06 (s, 1H, H-2).

4,7-Diidro-3-(2-naftil)-6-(1'H-pirazol-3'-il)pirazolo[5,1-c]triazin-7-one (5l).

Solido giallo-oro, resa 84%, p.f. > 300°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 6.69-7.00 (d, 1H, H-4), 7.50-8.00 (m, 7H, NaftH), 8.3-8.4 (s, 1H, H-4), 8.63 (s, 1H, H-2).

Procedura per la formazione del 5-amino-1H-pirazolo-4-carbossilato di etile (1o)

Ad una soluzione di 2-ciano-3-etossiacrilato di etile (100 mmol) in etanolo (300 ml), si aggiunge idrazina idrata (100 mmol). La reazione viene messa a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 4 ore; quindi si evapora il solvente sottovuoto ottenendo un olio¹⁴.

Procedura per la formazione dell'acido 5-amino-1H-pirazolo-4-carbossilico (2o)

Una sospensione del composto **1o** (100 mmol) in soluzione acquosa di NaOH 4N (200 ml) viene messa a riflusso sotto agitazione magnetica per 5 ore. La soluzione vira dall'arancione al giallo. Dopo raffreddamento, si acidifica con HCl concentrato fino a pH 5 e si ha la formazione di un precipitato giallo che viene filtrato sottovuoto¹⁵.

Procedura per la formazione del 5-amino-1H-pirazolo (3o)

Si compie una decarbossilazione a secco, riscaldando il composto **2o** fino a 150°C. Si ottiene una sostanza gialla di consistenza gelatinosa¹⁶.

Procedura per la formazione del 4-bromo-1H-5-amino-pirazolo (4o)

Ad una soluzione del composto **3o** (20 mmol) in acido acetico (10 ml), si aggiunge goccia a goccia una miscela di bromo (20 mmol) e acido acetico (5 ml), quindi si lascia sotto agitazione magnetica in bagno di ghiaccio. Dopo circa 4 ore si forma una sospensione densa, si filtra sottovuoto e si recupera il precipitato con 50 ml di CCl₄. Il solido verde così ottenuto, viene sciolto in acqua, si aggiunge bicarbonato di sodio fino a saturazione e siccome non si è formato alcun precipitato si estrae con acetato di etile. Dopo aver anidrificato con solfato di sodio, si evapora il solvente sottovuoto¹¹⁷.

Procedura per l'ottenimento del 7-metil-3-bromopirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilato di etile (5o)

(vedi sopra: Procedura generale per la preparazione di 7-metilpirazolo[5,1-c]triazin-6-carbossilati di etile (3f', 3g, 3l)).

Solido arancione, resa 85%, p.f. 89-91°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,39-1,42 (t, 3H, CH₃ etile), 3,07 (s, 3H, 7-CH₃), 4,46-4,51 (q, 2H, CH₂ etile), 8,81 (s, 1H, H-2).

I.5.2- Parte Sperimentale Biologica**Determinazione del legame del [³H]Ro15-1788 al Recettore Benzodiazepinico Centrale su membrane di corteccia bovina.**

Le membrane di corteccia bovina sono state preparate mediante centrifugazioni differenziali come descritto da Squires *et al.*¹¹⁸ e sono state sottoposte a lavaggi per eliminare il GABA endogeno. La frazione di membrane lavate è stata diluita 1:20 con tampone Tris-Citrato 50 mM pH 7.1 (T₁) ed omogenata mediante Ultraturrax. Aliquote da 50 µl (~ 0.2 mg di proteine) sono state incubate con il radioligande [³H]Ro15-1788 (~ 0.2 nM, attività specifica 85 Ci/mmol, Dupont-New England Nuclear Boston, MA, USA) in un volume finale di 500 µl di T₁ a 0°C per 90 minuti. Il legame aspecifico è stato determinato in presenza di diazepam non marcato 10 µM. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati rapidamente filtrati a pressione ridotta su filtri di fibra di vetro Whatman GF/C, effettuando un lavaggio da 5 ml in provetta più due lavaggi da 5 ml su filtro con tampone T₁ freddo (4°C). Per la filtrazione è stato utilizzato un apparecchio Millipore, costituito da sistema a tenuta per filtri ed un attacco per la pompa a vuoto, questo strumento consente la filtrazione simultanea di 12 campioni. Effettuata la filtrazione, i filtri sono stati posti in pico vials in cui sono stati aggiunti 4 ml di liquido di scintillazione Ready-Safe Beckman. Il conteggio della radioattività è stato effettuato mediante scintillatore in fase liquida 1600-TR Packard con efficienza del 66% ed espressa come disintegrazioni per minuto (dpm).

Determinazione del legame del [³H]Ro15-1788 sulle membrane di corteccia bovina in presenza di composti di nuova sintesi.

Per i composti che risultano affini al recettore benzodiazepinico viene misurata anche l'affinità sul recettore centrale per valutarne la selettività.

Il saggio di binding del [³H]Ro15-1788 sulle membrane di corteccia bovina e di ratto è stato condotto come riportato precedentemente. In questo caso il legame del radioligande è stato valutato in presenza di composti di nuova sintesi. I composti sono stati solubilizzati in etanolo assoluto o in dimetilsolfossido (DMSO) e aggiunti alla miscela di incubazione ad una concentrazione di 10 µM. Per i ligandi che, alla concentrazione suddetta, hanno mostrato una buona capacità inibitoria (circa del 60-70%) sul legame del radioligande, è stato determinato il valore di IC₅₀ dal quale è stato derivato il valore di K_i. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte per valutare l'errore standard della media (SEM).

Studi di binding su sottotipi recettoriali Bz/GABA_A α₁β₂γ₂, α₂β₂γ₂, α₃β₂γ₂, α₅β₃γ₂

L'omogenato di membrane di cellule HEK293 (circa 0,10mg di proteine per le linee cellulari che esprimono la combinazione α₁β₂γ₂ e α₅β₂γ₂, circa 0,16mg per quelle che esprimono le combinazioni α₂β₂γ₂ e α₃β₂γ₂) viene incubato con [³H]Ro 15-1788 (attività specifica 70,8µCi/nmole) alla concentrazione circa 2nM a 4°C per 60 minuti, in tampone fosfato PPB + KCl 100mM pH 7.2, in un volume finale di 500µl in presenza di concentrazioni crescenti di composti di nuova sintesi. Il legame aspecifico viene determinato incubando le membrane in presenza di Diazepam 10µM.

Dopo l'incubazione i campioni sono diluiti con 5ml di tampone PPB + KCl, portato a 4°C e rapidamente filtrati a pressione ridotta, su filtri di fibra di vetro Whatmann GF/C, effettuando due lavaggi su provetta.

I composti sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO) e aggiunti alla miscela di incubazione a concentrazioni crescenti (da 1nM a 10µM), in quantità corrispondente ad una concentrazione di solvente pari al 2%.

Per i derivati, che hanno mostrato una buona capacità inibitoria (circa del 70-80%) sul legame del radioligando alle membrane, è stata calcolata la concentrazione capace di inibire il 50% del legame del [³H]RO 15-1788 (IC₅₀).

La corrispondente costante di inibizione all'equilibrio per il composto saggiato, definita K_i, può essere determinata attraverso l'equazione di Cheng e Prusoff¹¹⁹.

II.1- Introduzione

Nel 1977 Braestrup e Squires¹²⁰ scoprirono che benzodiazepine ad azione centrale come il Diazepam potevano legarsi a siti che non erano associati al complesso recettoriale GABA_A, sia a livello centrale che periferico. Originariamente trovato nel rene di topo, questo sito di affinità per il Diazepam fu chiamato “recettore benzodiazepinico periferico” (PBR)^{121,122} in accordo con la sua distribuzione tissutale, con la classe di ligandi con i quali è stato scoperto e per distinguerlo dal recettore benzodiazepinico centrale (CBR) esclusivamente espresso nel SNC. Il CBR si trova sul complesso recettoriale GABA_A ed è un sito di legame per le benzodiazepine (Bzs), le quali sono modulatori allosterici del canale per gli ioni cloruro, come visto nella parte I di questa tesi. Il PBR è farmacologicamente, anatomicamente e strutturalmente distinto dal CBR.

Esso è largamente espresso in ogni parte del corpo, ma soprattutto in tessuti ghiandolari e secretori come le ghiandole surrenali, la ghiandola pineale e salivare, le gonadi e l'epitelio olfattivo, mentre rene, cuore e polmone ne presentano una densità inferiore. Inoltre il PBR è presente nelle cellule del sangue come leucociti, monociti, cellule polimorfonucleate, piastrine ed eritrociti. A differenza del CBR la sua presenza nel SNC è limitata principalmente alle cellule gliali ed endoteliali; l'unica struttura neuronale che contiene discreti livelli di PBR è la zona glomerulare del tubercolo olfattivo¹²³.

Inoltre la distribuzione tissutale del PBR, sebbene ubiquitaria, non è omogenea, ma compartimentalizzata a seconda dello specifico organo: nella ghiandola surrenale la parte midollare è virtualmente priva del recettore, mentre la densità nella parte corticale è molto alta; nel rene la sua localizzazione è selettiva per il tubulo contorto distale e per il tratto ascendente dell'ansa di Henle.

A livello subcellulare il PBR è localizzato per la maggior parte sulla membrana esterna dei mitocondri. A conferma di ciò si trovano numerosi lavori: Anholt *et al.*¹²⁴ nel 1986, trattando con digitonina i mitocondri isolati delle surreni di ratto, dimostrarono che il recettore si trova sulla membrana esterna; Mukherjee e Das¹²⁵ nel 1989 confermarono i dati precedenti ed evidenziarono inoltre la presenza del recettore sulla membrana interna dei mitocondri del polmone di ratto. Ciò nonostante altri studi hanno evidenziato una sua diversa localizzazione subcellulare a livello dell'Apparato del Golgi, nei lisosomi, nei perossisomi¹²⁶; Nel 1999 è stata dimostrata per la prima volta la presenza del PBR anche nel nucleo in linee cellulari epatiche cancerose¹²⁷; inoltre è interessante la scoperta della sua presenza sulle membrane plasmatiche di alcune cellule come gli eritrociti che sono privi di mitocondri. Probabilmente la diversa localizzazione subcellulare potrebbe riflettere una diversa funzionalità della proteina in condizioni normali e/o patologiche.

In considerazione della principale localizzazione del recettore benzodiazepinico periferico nei mitocondri, tale sito di legame viene anche definito recettore benzodiazepinico mitocondriale (MBR)¹²⁸. Ulteriori sinonimi che identificano il recettore benzodiazepinico periferico sono: complesso recettoriale mitocondriale per DBI^{129,130} (mDRC), intendendo per DBI un inibitore del binding del Diazepam (si tratta di un ligande endogeno di 11 kDa, costituito da 86 aminoacidi, che è in grado di inibire il legame con [³H]Diazepam sulla membrana di cellule cerebrali ed impedire l'apertura del canale per gli ioni cloruro del GABA_A); recettore ω₃¹³¹; p-site¹³². Nonostante PBR sia la denominazione più usata e ampiamente accettata dalla comunità scientifica, la continua scoperta di ligandi sintetici strutturalmente diversi e la diffusa localizzazione del recettore sia a livello periferico che centrale ha prodotto l'esigenza di una rivisitazione del nome.

Nel 2006 Papadopoulos *et al.* hanno proposto Traslocator protein (TSPO) come nuovo nome per il PBR.

Tale scelta è giustificata dal fatto che :

- il termine "benzodiazepinico" è limitativo alla luce della scoperta di numerosi ligandi sia esogeni sia endogeni che si legano con affinità simile o maggiore rispetto alle Bzs e che presentano strutture anche molto diverse da esse;
- il termine "periferico" non riflette la reale distribuzione della proteina che si trova anche a livello cerebrale, in strutture non neuronali, come la glia;
- questa proteina sembra non essere un recettore inteso nel senso classico del termine, perché implicato in numerosi processi cellulari, anche molto diversi tra loro; infatti la nuova definizione TSPO nasce dall'osservazione che la funzione principale e maggiormente caratterizzata è il trasporto di colesterolo (ma anche di altre molecole come porfirine, anioni, proteine varie) all'interno del mitocondrio.

TSPO identifica solo la proteina di 18 kDa, che è la minima unità funzionale necessaria per l'interazione con i più conosciuti ligandi; tale nomenclatura è stata approvata dal HUGO Gene Nomenclature Committee¹³³.

II.1.1- Struttura

Da un punto di vista strutturale il TSPO è una proteina di 18 kDa costituita da 169 aminoacidi, caratterizzata da elevata idrofobicità, ricchezza in triptofano, carica positiva e punto isoelettrico 9,6¹³⁴. Tale proteina è stata sequenziata ed è stato così possibile risalire al suo gene codificante. Il cDNA del TSPO è stato clonato da diverse specie (roditori^{135,136}, bovini¹³⁷, uomo¹³⁸) e mantiene l'80% di sequenze omologhe¹³⁹. L'elevata conservazione attraverso l'evoluzione potrebbe suggerire che le funzioni di tale gene siano estremamente importanti per la vita cellulare. Sulla base delle conoscenze della sequenza aminoacidica di tale proteina, si è sviluppato un modello tridimensionale usando simulazioni tramite dinamica molecolare¹⁴⁰.

Tale modello recettoriale riporta una struttura con 5 α -eliche che attraversano la membrana lipidica, legate da loops idrofobici con la porzione aminica terminale intramitocondriale e la regione carbossiterminale, più ampia, extramitocondriale.

Dall'osservazione della sequenza degli aminoacidi, inoltre è emersa nell'uomo ed in alcune specie animali una completa conservazione dei residui di glicina (Gly) nelle zone terminali dei domini transmembrana (TM); tale evidenza può avvalorare l'ipotesi della struttura ad α -eliche, in quanto la Gly si trova spesso come aminoacido coinvolto in strutture che interrompono le α -eliche¹⁴¹.

Al primo modello tridimensionale proposto da Bernassau *et al.* sono state apportate oggi alcune modifiche: se prima si pensava che le α -eliche fossero corte, in grado di attraversare un unico strato lipidico, oggi studi basati su tecniche di immunochimica e mutagenesi hanno evidenziato che tali strutture sono sufficientemente lunghe da attraversare entrambi gli strati fosfolipidici con loops e regioni terminali ridotte¹⁴².

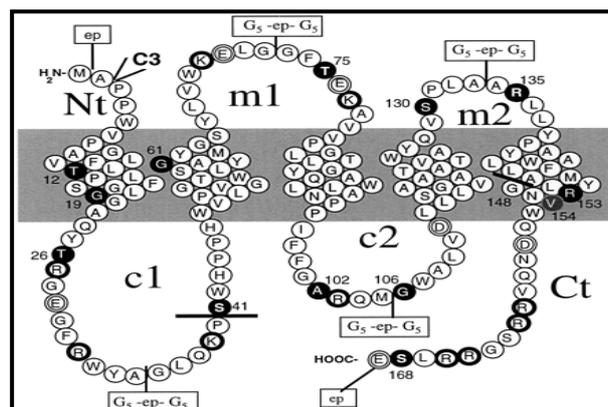


Fig. II.1- Struttura primaria pentamerica del TSPO¹⁴².

Murail *et al.* sono stati i primi a fornire prove sperimentali sulla struttura a 5 α -eliche del TSPO. La struttura secondaria del TSPO ricombinante di topo (mTSPO), solubilizzata in micelle di DPC

(dodecil-fosfolina), è stata investigata mediante spettroscopia CD. Lo spettro corrispondente presenta tre picchi a circa 192, 209 e 221 nm che sono caratteristici di un alto contenuto di α -eliche. Inoltre è stato visto che la sua struttura terziaria è relativamente instabile e che essa è fortemente stabilizzata in risposta alla traslocazione del colesterolo¹⁴³.

Il TSPO può formare un complesso da quattro a sei molecole la cui organizzazione è tale da formare un singolo poro transmembrana in accordo con la sua funzione di trasportatore di proteine nella membrana mitocondriale. A livello subcellulare il TSPO è presente principalmente a livello della membrana esterna dei mitocondri e presenta numerosi siti di contatto tra la membrana interna ed esterna. Esso forma un complesso con un canale ionico VDAC di 32 kDa ed una proteina carrier per l'adenina (ANC), di 30 kDa situata sulla membrana mitocondriale interna¹⁴⁴. Alcuni studi riportano due proteine aggiuntive che possono associarsi al recettore: una proteina di 10 kDa che è stata co-immunoprecipitata con TSPO, localizzata nelle frazioni mitocondriali, ma con attività non nota, e la proteina-1 associata al TSPO (PRAX-1). Quest'ultima è una proteina di 240 kDa che interagisce con il TSPO in rapporto stechiometrico 1:2. Si pensa che la PRAX-1 sia coinvolta nel reclutare targets addizionali nelle vicinanze del TSPO per modularne la funzione¹²⁵. Alcuni studi aggiungono inoltre che il TSPO potrebbe essere un componente del mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) presente sulla membrana mitocondriale; questi pori sarebbero deputati al controllo della permeabilità mitocondriale che, tra l'altro, si è rivelata fondamentale sia nei casi di apoptosi che di necrosi cellulare^{145,146}.

Recentemente è stata fatta luce sulla struttura del canale ionico voltaggio dipendente (VDAC)¹⁴⁷ che costituisce la principale via per l'ingresso e l'uscita di metaboliti attraverso la membrana esterna dei mitocondri. Da tali studi è emerso che il segmento N-terminale voltaggio-dipendente è rivolto verso la parete interna del poro, determinando un parziale restringimento centrale al poro stesso¹⁴⁸. Tale segmento è probabilmente posizionato per regolare la conduttanza di ioni e metaboliti attraverso il poro VDAC. Non si conosce la struttura degli stati "aperto" e "chiuso" del canale ma presumibilmente il passaggio da uno stato all'altro comporta cambiamenti conformazionali che intralciano il passaggio dei metaboliti attraverso il canale. La transizione tra i due stati del canale è associata ad una alterata selettività ionica poiché il canale passa da anione selettivo a catione selettivo rispettivamente quando passa da aperto a chiuso.

Il VDAC, rappresentando la principale via di comunicazione dei mitocondri tra l'interno e l'esterno, risulta coinvolto sia nel metabolismo cellulare che nell'apoptosi. E' stato visto che alterazioni della permeabilità mitocondriale sono implicate nello stress metabolico in patologie cardiovascolari¹⁴⁹ e nel cancro¹⁵⁰.

Molte delle caratteristiche strutturali del TSPO, finora descritte, sono state confermate tramite l'impiego di un modello che si basa sull'uso di un analogo proteico di origine batterica. Infatti, da

alcuni anni, è noto che una proteina sensoriale di membrana TspO (Tryptophan rich-sensory protein) del *Rhodobacter Sphaeroides*¹⁵¹⁻¹⁵³ sembra possedere una stretta correlabilità strutturale e funzionale con il TSPO, in particolare con la proteina di 18 kDa. Questa osservazione potrebbe supportare l'ipotesi che i mitocondri presenti nei mammiferi, traggano la loro origine dai batteri fotosintetici. Tale proteina rappresenta un'ottima opportunità, quale modello semplificato del TSPO, per lo studio della struttura e funzionalità del recettore.

Sulla subunità di 18 kDa è presente il sito di legame per le isochinoline (PK11195), mentre si pensa che il sito di riconoscimento per le Bzs sia dato dall'associazione della subunità VDAC con la subunità di 18 kDa oppure da una particolare conformazione della subunità di 18kDa^{154,155}. L'isochinolina PK11195 e la benzodiazepina Ro5-4864 competono negli esperimenti di binding, ma il loro sito di legame probabilmente non è lo stesso: si pensa alla presenza di una regione di sovrapposizione tra i due siti¹⁵⁶. Papadopoulos e Li¹⁵⁷ hanno ipotizzato che il TSPO possa funzionare da canale per il trasporto del colesterolo ed hanno identificato nella porzione carbossiterminale extramitocondriale gli aminoacidi coinvolti nell'interazione tra tale molecola e la proteina di 18kDa.

In letteratura viene riportata la presenza di una sequenza di riconoscimento per il colesterolo (CRAC) nella porzione carbossiterminale del TSPO¹⁵⁸. In particolar modo hanno dimostrato che gli aminoacidi della porzione carbossiterminale formano una cavità che permette l'inclusione del colesterolo e, attraverso mutazioni puntiformi, che la Tyr 152-153 e Arg 156 sono critiche per l'interazione tra TSPO e colesterolo.

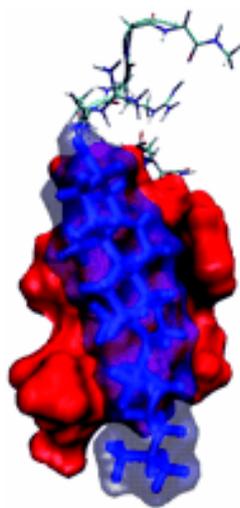


Fig. II.2- Modello di legame del colesterolo al TSPO a livello della sequenza amminoacidica CRAC nella porzione carbossiterminale. La cavità del peptide e la molecola di colesterolo sono rappresentati, rispettivamente, in blu ed in rosso. La figura è stata ottenuta tramite dinamica molecolare¹⁵⁸.

Vari studi hanno descritto il TSPO in forma dimerica che è stata proposta come la forma attiva della proteina^{159,160}. Porfirine come la protoporfirina IX e l'eme sono ligandi endogeni ad alta affinità per il

TSPO, il cui piano di simmetria può risultare nel legame alla forma dimera della proteina come un legame di un singolo ligande a due molecole di TSPO¹⁵⁹. Inoltre l'analisi Scatchard del legame delle porfirine al TSPO ha ipotizzato un modello a doppio sito di legame¹⁶¹, coerente con la formazione di un dimero del TSPO.

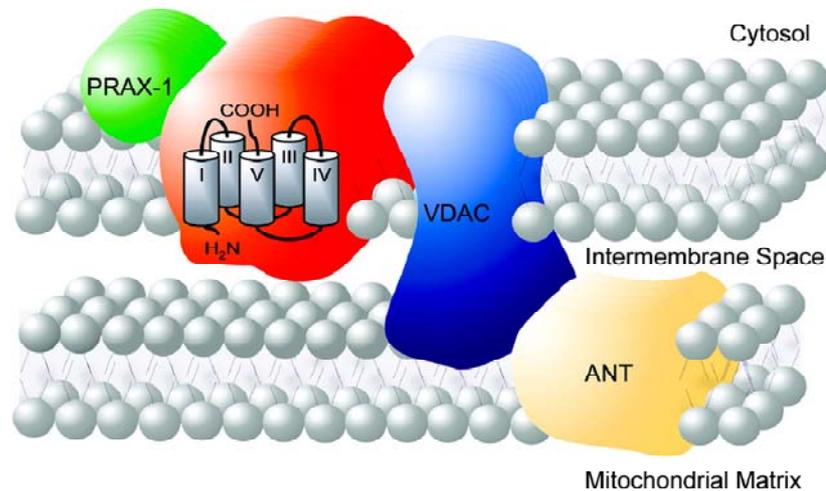


Fig. II.3- Struttura molecolare e localizzazione del 18 kDa TSPO e proteine ad esso associate nelle membrane mitocondriali. Con la 32 kDa VDAC e 30 kDa ANT, TSPO forma un complesso mPTP (mitochondrial permeability transition pores). La PRAX-1 è coinvolta nel reclutare targets addizionali nelle vicinanze del TSPO per modularne la funzione¹⁶².

II.1.2- Funzioni del TSPO nei processi fisiologici e patologici

Nonostante le estese caratterizzazioni farmacologiche e biochimiche e le implicazioni in numerosi processi biologici, la precisa funzione del TSPO rimane tuttora un enigma da svelare. La mancanza della conoscenza strutturale del sito di binding e di ligandi agonisti selettivi rende molto difficile l'interpretazione degli effetti derivanti dall'interazione ligande-recettore. Gli studi iniziali sul TSPO, hanno dimostrato che questo ha densità variabile in diverse condizioni fisiologiche o patologiche.

Tale sistema recettoriale ha elevata espressione nei tessuti endocrini, per cui pare ipotizzabile la possibilità di essere modulato per via ormonale. L'espressione del TSPO varia ad esempio durante il ciclo ovarico con massima espressione dopo l'ovulazione^{163,164}; il TSPO renale varia in densità dopo trattamento con furosemide; ipo- e iper-tiroidismo modificano l'espressione del recettore nel cuore, reni, fegato e testicoli¹⁶⁵. Altri modulatori del TSPO appaiono interleuchine, dopamina, serotonina e noradrenalina.

Stati neuropatologici e traumi sono spesso associati a variazioni di TSPO¹⁶⁶⁻¹⁷⁰.

Aumenti di densità recettoriale sono inoltre osservati in tessuti neoplastici ed associati ai gradi di

malignità del tumore¹⁷¹.

Al TSPO sono attribuite molte implicazioni in diverse attività: regolazione della proliferazione cellulare¹⁷²⁻¹⁷⁴, immunomodulazione^{175,176}, trasporto di anioni, apoptosi, steroidogenesi^{177,178}, infiammazione^{179,180}, omeostasi del calcio¹⁸¹, respirazione cellulare^{182,183}, trasporto di porfirine e biosintesi dell'eme¹⁸⁴.

a) Steroidogenesi

Gli ormoni steroidei sono un gruppo di ormoni di natura lipidica che derivano da un precursore comune che è il colesterolo e che svolgono ruoli biologici molto importanti agendo sul metabolismo, sulla crescita e sulla riproduzione.

La steroidogenesi è il processo che porta alla biosintesi tessuto-specifica degli ormoni steroidei ed implica la conversione, nella membrana mitocondriale interna, del colesterolo a pregnenolone. Tale reazione è catalizzata dall'enzima citocromo P450, la cui attività dipende da un sistema di trasporto elettronico che coinvolge una ferredoxina ed una flavoproteina, catalizzando una serie di reazioni che portano alla formazione degli intermedi 22(R)-idrossicolesterolo e 20,22(R)-idrossicolesterolo ed alla successiva rottura del legame tra il carbonio 20 ed il 22¹⁸⁵. Il pregnenolone, quindi, lascia il mitocondrio per essere trasformato nei prodotti steroidei finali all'interno del reticolo endoplasmatico. Gli ormoni steroidei, dopo essere stati sintetizzati, vengono immessi nel torrente circolatorio dove sono trasportati da carrier specifici SBP (steroid binding protein) fino alle cellule bersaglio. Il recettore per tali ormoni si trova, nelle cellule bersaglio, a livello citoplasmatico. Una volta legati al recettore il complesso ormone-recettore trasloca nel nucleo, dove attiva la sintesi proteica.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che il TSPO risulta coinvolto nel trasporto del colesterolo dall'esterno all'interno del mitocondrio, step limitante dell'intero processo di steroidogenesi¹⁷⁷. Tale processo biosintetico è regolato da ormoni trofici quali l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), nelle cellule adrenocorticali, e l'ormone luteinizzante (LH) nelle cellule testicolari di Leyding ed ovariche. Questi ormoni peptidici interagiscono con uno specifico recettore di membrana accoppiato a proteine G_s e, alla seguente stimolazione dell'adenilato ciclasi, segue un aumento critico di cAMP a livello intracellulare. Tuttavia il preciso meccanismo con cui elevati livelli di cAMP inducono la liberazione del colesterolo dai siti di deposito intracellulari non è ancora del tutto noto; probabilmente l'aumento di cAMP determina l'attivazione di protein-chinasi. A che a loro volta attivano, per fosforilazione, la colesterolo-esterasi che, infine, libera il colesterolo dai siti di deposito. La conseguente fosforilazione di specifiche proteine non ancora individuate innesca una cascata di eventi che ha come risultato finale il trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio¹⁸⁶.

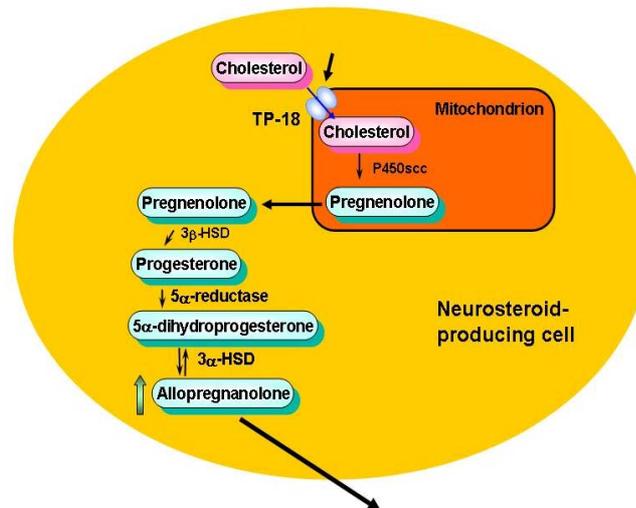


Fig. II.4- Sintesi degli ormoni steroidei¹⁸⁷.

Il ruolo del TSPO è ampiamente dimostrato in esperimenti knockout e antisense¹³³ dai quali si evince che una down-regulation del TSPO causa una diminuzione della sintesi degli steroidi.

L'implicazione del TSPO nel processo di steroidogenesi è confermata dal fatto che, in vari sistemi cellulari ed in mitocondri isolati, ligandi al TSPO stimolano la formazione di steroidi e la quantificazione in vitro ed in vivo di tale effetto rappresenta ancora oggi l'indice di attività biologica più utilizzato per testare i nuovi ligandi¹⁸⁸.

L'altra proteina chiave nel processo di steroidogenesi è la StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) che sembra agire in modo sinergico al TSPO nel trasporto del colesterolo citoplasmatico all'interno del mitocondrio.

Studi recenti hanno individuato un'altra proteina associata al TSPO, la PAP7, che potrebbe mediare la trasduzione del segnale cAMP mediata. La PAP7 umana e di topo è stata clonata sequenziata e studiata nella struttura genomica. Essa è altamente espressa nell'apparato del Golgi e nei mitocondri. La sua inibizione porta ad una diminuzione nel trasporto di colesterolo e quindi ad una riduzione della sintesi ormonale.

Il preciso meccanismo cellulare, mediante il quale il TSPO è in grado di trasportare il colesterolo all'interno del mitocondrio, è ancora oggetto di indagine. La struttura pentamerica transmembranale suggerisce un possibile ruolo di canale, dove la superficie idrofila, ma non carica, della proteina, permette alla molecola anfipila del colesterolo di attraversare la membrana mitocondriale esterna. Ciononostante tale modello è in disaccordo con il fatto che il colesterolo si lega con un'ottima affinità al recettore, evento del tutto inusuale per un canale, e che non esiste in vivo un gradiente di concentrazione tra il citoplasma ed il mitocondrio. Quindi si può ipotizzare per il TSPO un ruolo di trasportatore o scambiatore (ad esempio attraverso lo scambio colesterolo-pregnenolone)¹⁸⁷.

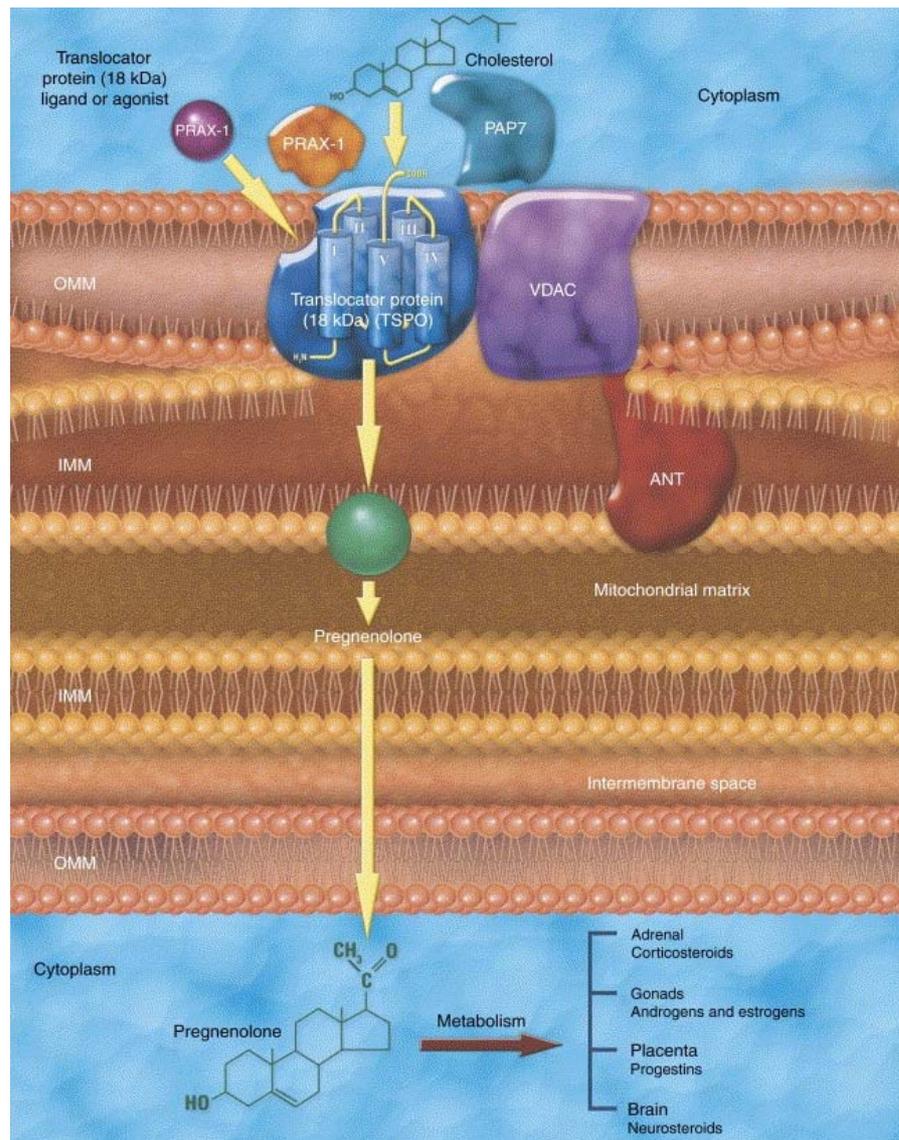


Fig. II.5- TSPO e traslocazione intramitocondriale del colesterolo¹³³.

A livello cerebrale la steroidogenesi avviene nelle cellule gliali; gli steroidi prodotti sono detti neurosteroidi, termine coniato per la prima volta nel 1981. per descrivere intermedi steroidei come deidroepiandrosterone e pregnenolone (ed i loro solfati), le cui concentrazioni cerebrali risultavano essere fino a venti volte superiori rispetto a quelle plasmatiche. Inoltre, tramite esperimenti di surrenalectomia e gonadectomia, fu dimostrato che la loro sintesi era indipendente dalla regolazione classica degli ormoni trofici¹⁸⁹. I neurosteroidi sembrano mediare, a bassissime concentrazioni (nM), effetti paracrini, non genomici, estremamente rapidi, influenzando l'eccitabilità neuronale attraverso la modulazione di complessi recettoriali come il GABA_A¹⁸⁹⁻¹⁹⁴, l'NMDA¹⁹⁵, il recettore sigma-1¹⁹⁶ ed il recettore 5-HT₃¹⁹⁷. Essi risultano quindi coinvolti nei processi di plasticità neuronale, di apprendimento e memoria¹⁹⁸, oltre che nelle risposte agli stati di stress, ansia e depressione¹⁹⁹. Ad esempio i metaboliti 3 α -idrossilati e 5 α -ridotti del progesterone, come l'allopregnenolone (3 α -idrossi,5 α -pregnan-20-one), e del deossicorticosterone, come il 5 α -tetraidrodeossicorticosterone

(THDOC), sono potenti modulatori allosterici positivi del recettore GABA_A: incrementano la corrente inibitoria degli ioni Cl⁻ e presentano un profilo farmaceutico ansiolitico, sedativo, anticonvulsivante, anestetico simile a quello dei barbiturici e delle benzodiazepine; il pregnenolone solfato (PREGS) e il deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) hanno invece proprietà antagoniste sullo stesso recettore²⁰⁰ e sembrano modulare positivamente il recettore per il glutammato NMDA, mostrando così un profilo eccitatorio.

Il fatto che per l'azione sul GABA_A non sembra essere necessaria una specifica subunità del canale pentamerico, come nel caso delle benzodiazepine (subunità γ), probabilmente riflette un largo spettro d'azione a livello del SNC.

Altri dati suggeriscono che il pregnenolone solfato ed il deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) possano agire anche sul sistema colinergico²⁰¹ attraverso un aumento del rilascio di acetilcolina nell'ippocampo²⁰².

Un recente studio condotto da Veiga *et al.*²⁰³ riporta che gli ormoni steroidei (in particolare progesterone, DHP, THP) esercitano un ruolo rilevante nel SNC, preservando la funzionalità e la sopravvivenza neuronale. Nei modelli animali si è visto che tali ormoni hanno la capacità di prevenire la perdita neuronale e la demielinizzazione associata all'invecchiamento. È stato inoltre evidenziato che a seguito di traumi, nel SNC, si osserva una sovraespressione del TSPO.

Risulta quindi ipotizzabile un uso di ligandi al TSPO come possibili agenti nel promuovere la neuroprotezione nei pazienti di età avanzata, stimolando la steroidogenesi; ed inoltre, come si vedrà in seguito, la modulazione del TSPO a livello della glia, la maggiore sede sintetica di neurosteroidi, può rappresentare un innovativo approccio nella cura di numerose malattie neuropsichiatriche.

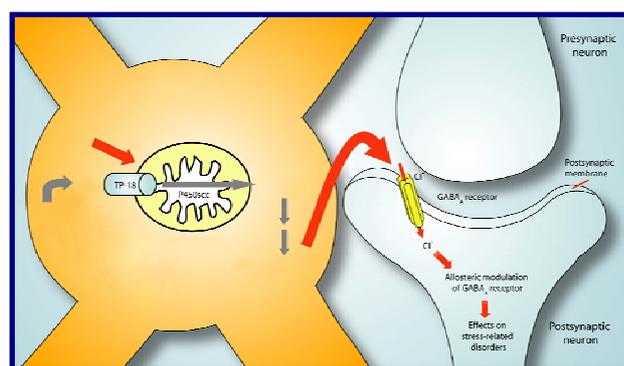


Fig. II.6- Modulazione allosterica sul Recettore GABA_A mediata da neurosteroidi²⁰⁴.

b) I segnali cellulari e il TSPO

Numerosi dati sostengono il coinvolgimento del TSPO nei processi di proliferazione e differenziazione cellulare. L'up-regulation del recettore in cellule tumorali rispetto alle cellule sane e il suo coinvolgimento nel processo apoptotico aprono la strada al potenziale sviluppo di terapie anti-

cancro basate sulla modulazione del TSPO.

Alho *et al.*²⁰⁵ hanno studiato a fondo la relazione tra la proliferazione cellulare e l'espressione del TSPO. Essi hanno dimostrato che l'espressione è massima in colture di astrociti proliferanti, mentre diminuisce quando tornano quiescenti. In queste cellule in rapida crescita il TSPO è stato individuato, oltre che a livello mitocondriale, anche nel reticolo endoplasmatico, nel nucleo e nel centriolo. Da questi dati emerge che, oltre al coinvolgimento nel processo di proliferazione, il TSPO abbia una diversa localizzazione a seconda dello stadio nel ciclo cellulare. Inoltre il TSPO è stato individuato anche nel mondo vegetale; in particolare studi su cellule meristematiche di patata hanno evidenziato un incremento del numero di TSPO nucleari durante la germinazione, in cui è altissima l'attività mitotica²⁰⁶. Per quanto concerne la relazione tra TSPO e patologie neoplastiche sono stati studiati il tumore ovarico²⁰⁷, l'adenocarcinoma del colon²⁰⁸ e i tumori cerebrali (glioma e astrocitoma)^{209,210} dove una maggiore densità di recettore è direttamente proporzionale alla capacità proliferativa delle cellule tumorali.

In ultima analisi è quindi auspicabile che, in un futuro molto prossimo, il monitoraggio dell'espressione-localizzazione del TSPO possa essere utilizzato come strumento (non invasivo) di imaging, come la tecnica di Positron Emission Tomography (PET), sia a scopo diagnostico che prognostico in patologie tumorali in cui risulta evidente la correlazione tra sovraespressione del TSPO e stadiazione della patologia. In un recente studio è stato dimostrato infatti che la sopravvivenza di pazienti affetti da cancro colon-rettale risulta ridotta del 35% quando questi mostrano una alta sovraespressione del TSPO²¹¹. Inoltre uno studio di PET ha mostrato che il PK11195 marcato definiva i confini morfologici e l'estensione del glioma in maniera molto più accurata rispetto alle tradizionali tecniche di imaging²¹².

Sebbene sia dimostrato il suo coinvolgimento, l'effetto di ligandi al TSPO sulla proliferazione cellulare resta un argomento alquanto controverso. Studi evidenziano effetti diversi dei ligandi su cellule diverse: PK11195 e Ro5-4864 stimolano la proliferazione mitocondriale nelle cellule GH₃ del tumore ipofisario e in quelle C₆ del glioma¹⁷⁴; ma gli stessi ligandi hanno effetto antiproliferativo sia su cellule tumorali del timo che nelle cellule MCF-7 del carcinoma del seno. Altri dati indicano, che stimolando le cellule epatiche con ligandi specifici, si ha una modificazione della proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente: basse concentrazioni aumentano la proliferazione cellulare, mentre alte dosi non la modificano in maniera significativa²¹³. Inoltre ligandi al TSPO sembrano modulare la risposta apoptotica in differenti linee cellulari tumorali. FGIN-1-27 e PK11195 hanno mostrato avere una certa attività antitumorale promovendo l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare in linee cellulari di tumori al colon²¹⁴ ed esofagei²¹⁵.

Il meccanismo d'azione dei due composti menzionati è stato chiarito: mentre l'apoptosi da FGIN-1-27 è prevalentemente associata ad una diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, sembra

che PK11195 provochi la morte programmata della cellula mediante una produzione di Reactive Oxygen Species, associata ad una down-regulation della proteina Bcl-2, ad una traslocazione della proteina Bax nel mitocondrio ed ad una conseguente attivazione della caspasi-9²¹⁶. Infatti i mitocondri giocano un importante ruolo nel processo di morte programmata della cellula in quanto essi regolano e modificano il bilancio tra proteine anti apoptosi come la Bcl-2 e proteine pro-apoptotiche come la Bax e la cyclophilin D. Il mPTP (mitochondrial Permeability transition pore), del quale fa parte il TSPO, gioca un ruolo importante nella modulazione dei segnali che inducono morte cellulare per apoptosi o necrosi. L'apertura del mPTP è influenzata da proteine anti e pro-apoptotiche come Bcl-2 e Bax rispettivamente. L'apertura del mPTP causa rigonfiamento e rottura del mitocondrio²¹⁷, con conseguente rilascio nel citoplasma di proteine intermembrana come il citocromo C e AIF (Apoptosis Inducing Factor). Una volta nel citoplasma AIF traslocano nel nucleo della cellula dove causano frammentazione del DNA ed altri processi che inducono morte cellulare¹⁶⁵. Il citocromo C nel citoplasma induce la cascata caspasi con attivazione della caspasi-3 e la finale distruzione del nucleo cellulare, del citoscheletro e della membrana plasmatica. L'apoptosi è definita come l'apertura transitoria del mPTP e la richiusura del poro garantisce che questo processo transitorio non si risolva in necrosi e che siano mantenuti i livelli di ATP all'interno della cellula²¹⁷. In condizioni fisiologiche il sovraccarico di Ca²⁺ dentro la matrice mitocondriale e i ROS sono i segnali critici per l'apertura del mPTP^{165,218}. Infatti tali segnali causano l'attivazione della ciclofillina D, che è situata a livello della matrice mitocondriale interna, la quale avvia una serie di processi che portano all'apertura del mPTP. Tuttavia l'attivazione del TSPO da parte di specifici ligandi come PK11195 può causare l'apertura del mPTP indipendentemente dalla concentrazione di Ca²⁺ nella matrice mitocondriale. Nel 2007 Li et al.²¹⁸ hanno dimostrato che il ligande al TSPO, PK11195, induce il rilascio di citocromo C dal mitocondrio e la rottura della membrana esterna del mitocondrio, inoltre facilita l'induzione dell'apoptosi, blocca l'inibizione dell'apoptosi mediata da Bcl-2 e facilita la necrosi indotta TNF- α . Anche il composto Ro5-4864 ha effetti pro-apoptotici per interazione con il TSPO, esso induce down-regulation di Bcl-2, causa il rilascio di citocromo C e attiva la cascata delle caspasi inducendo così morte cellulare a concentrazioni micromolari (10-100 μ M). Al contrario in altri studi è stato visto che Ro5-4864 può avere anche una potente azione anti-apoptotica²¹⁹.

Probabilmente solo in futuro sarà possibile valutare se l'uso di ligandi al TSPO nella terapia antitumorale, come agenti apoptotici selettivi verso le cellule maligne, possa rivelarsi una strada percorribile. Comunque le recenti delucidazioni circa il meccanismo d'azione di chemioterapici sia classici, come la Doxorubicina, sia nuovi, come il BMD 188 (sperimentale nel cancro alla prostata), capaci di indurre apoptosi mediante la produzione di ROS, non possono che supportare tale linea di ricerca.

Sulla base di queste osservazioni è stato anche investigato il potenziale sinergismo tra noti agenti

antineoplastici e ligandi al TSPO.

Data la sovraespressione del TSPO nelle cellule cancerose si è anche pensato di coniugare agenti antitumorali a ligandi al TSPO al fine di aumentare la selettività del trattamento chemioterapico, con un notevole guadagno in efficacia e una netta diminuzione di effetti collaterali. Per esempio il coniugato Melfalan-ligando al TSPO ha mostrato avere proprietà citotossiche nettamente maggiori rispetto al farmaco somministrato da solo in numerosi tumori cerebrali. Una simile strategia è stata applicata alla Gemcitabina, un potente agente alchilante che ha il difetto di non superare la barriera ematoencefalica, e i risultati hanno mostrato una selettività due volte maggiore verso tumori cerebrali rispetto al farmaco solo²²⁰.

Le possibili correlazioni fra il TSPO e l'attività di agenti antitumorali costituiscono attualmente motivo di approfondite indagini, in considerazione anche del fatto che per molti agenti antineoplastici non è ancora ben noto il meccanismo d'azione.

Un'ulteriore possibile ipotesi sull'eventuale correlazione tra TSPO e la proliferazione cellulare è l'associazione del recettore nei canali del calcio (nella cellula eucariote un requisito essenziale per la mitosi è l'aumento dei livelli citoplasmatici di Ca^{2+}). E' stato dimostrato che alcuni ligandi al TSPO erano in grado di inibire il flusso di ioni Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica, modulando i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti²²¹.

c) Infiammazione e malattie autoimmuni

La presenza del TSPO in un'ampia gamma di cellule immunomodulatrici come microglia, cellule del sangue (monociti, linfociti, neutrofili), nel timo, nei linfonodi, nella milza¹²² implica il coinvolgimento del TSPO nella risposta immunitaria; tuttavia il meccanismo attraverso cui si verifica è ancora molto poco conosciuto. Il TSPO è largamente espresso nei macrofagi e in studi in vivo su topi è stato visto che ligandi al TSPO, nello specifico benzodiazepine, inibiscono la capacità dei macrofagi di produrre ROS e citochine infiammatorie come IL-1, TNF- α e IL-6²²². Inoltre il TSPO è coinvolto nella regolazione del metabolismo ossidativo dei fagociti, un processo necessario per l'effettiva eliminazione degli antigeni. La funzione immunosoppressiva di alcuni ligandi al TSPO suggerisce un ruolo importante di quest'ultimo nei meccanismi di difesa immunitaria e nella risposta infiammatoria. Inoltre il coinvolgimento del TSPO nella sintesi degli steroidi conferma una sua implicazione nei meccanismi di difesa immunitaria poichè i livelli sistemici di steroidi aumentano immediatamente dopo traumi, dolore e febbre in risposta alla stimolazione della secrezione di ACTH da parte di varie citochine. Parallelamente a quanto è stato evidenziato per le cellule tumorali, diverse patologie infiammatorie sono associate ad un aumento nell'espressione del TSPO, ad esempio nell'encefalite autoimmune²²³, nella degenerazione-rigenerazione del nervo sciatico²²⁴, nel timo di topi affetti da artrite²²⁵. Un trattamento cronico con PK11195 riduce drasticamente l'infiammazione, l'iperplasia sinoviale e la

degenerazione sia ossea sia cartilaginea in topi affetti da artrite reumatoide geneticamente indotta (topi MLR/lpr)²²⁶. E' importante notare come il miglioramento dello stato patologico segua un ripristino della normale densità di TSPO nei tessuti interessati. L'effetto protettivo di Ro5-4864 e di SSR180575, oltre a quello di PK11195, è stato dimostrato in vivo anche in un modello sperimentale di lupus eritematoso, dove le lesioni epidermiche risultavano ridotte del 40-60% dopo il trattamento²²⁷. In uno studio correlato è stata anche saggiata l'efficacia di questi tre ligandi nel ritardare lo sviluppo del processo infiammatorio autoimmune anche a livello polmonare²²⁸.

Studi recenti hanno cercato di chiarire il meccanismo d'azione dei ligandi al TSPO ma sono comunque necessari ulteriori approfondimenti. Una prima ipotesi, formulata da Marino et al.¹⁷⁹, proporrebbe il TSPO come modulatore della migrazione e della fagocitosi dei neutrofili, attraverso la regolazione dei livelli di calcio intracellulari: Diazepam e Ro5-4864 stimolerebbero i neutrofili legandosi ed attivando il TSPO, che aumenta la permeabilità al calcio; il PK11195 avrebbe effetto opposto.

Una seconda ipotesi, invece, proporrebbe la sintesi degli steroidi come meccanismo d'azione anti-infiammatorio. Lazzarini *et al.*¹⁸⁰, hanno evidenziato come il Diazepam ed il Ro5-4864 riducono l'edema da carragenina, stimolando a livello surrenale la sintesi del corticosterone, mentre il PK11195, ipotizzato antagonista del TSPO, sembra sopprimere l'azione dei due agonisti.

Torres *et al.*¹⁷⁰ hanno proposto che l'azione anti-infiammatoria di Ro5-4864 e PK11195 sia mediata non soltanto dall'attività steroidogenica, visto che si osserva anche in topi surrenalectomizzati, ma anche dall'inibizione del rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e IL-13), con la susseguente inibizione della migrazione dei neutrofili, che sono le principali cellule presenti nell'essudato formatosi dopo l'iniezione di carragenina sia nella zampa sia nella pleura di topo.

Infine è da ricordare il ruolo del TSPO nella modulazione della risposta apoptotica, la quale, nelle malattie autoimmuni, risulta essere alterata.

Sicuramente l'effetto protettivo di ligandi al TSPO può essere giustificato dall'interazione col recettore dal momento che questo è dose-dipendente e che analisi immunohistologiche hanno rivelato che la sua aumentata espressione è strettamente modulata dal trattamento.

d) TSPO e funzione mitocondriale

I mitocondri sono organuli presenti nel citoplasma di tutte le cellule. Presentano dimensioni e forme variabili specialmente in relazione ai diversi momenti funzionali della cellula. Possono allungarsi, restringersi, accorciarsi e rigonfiarsi mostrando una notevole plasticità. Al pari della forma è estremamente mutevole anche la grandezza ed il numero dei mitocondri. Esso in particolare è in relazione al fabbisogno energetico della cellula, ad esempio, nella cellula epatica, i mitocondri costituiscono il 30-35% delle proteine totali della cellula. I mitocondri sono distribuiti in modo uniforme nel citoplasma della cellula, tuttavia la loro distribuzione varia spesso in relazione alla loro

peculiare funzione che è quella di fornire l'energia nelle zone dove questa è necessaria. I mitocondri sono dotati di due tipi di movimento: movimenti passivi (i mitocondri si lasciano trasportare dalle correnti citoplasmatiche) e movimenti propri, probabilmente associati a proteine contrattili mitocondriali, che sono anche quelle implicate nelle modificazioni morfologiche che questi organuli mostrano durante i diversi periodi funzionali della cellula.

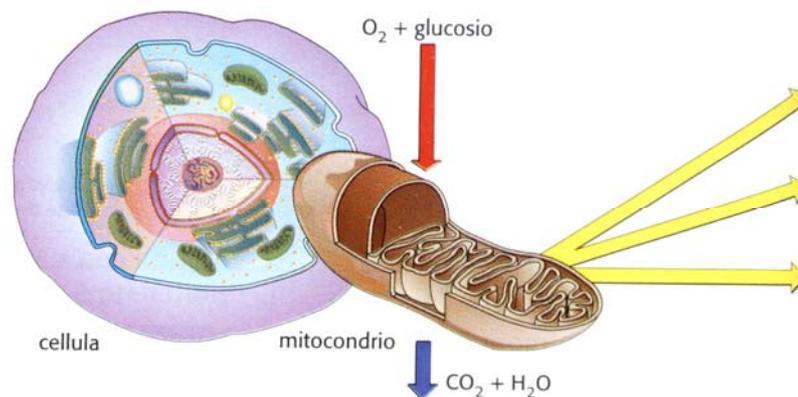


Fig. II.7- Struttura di un mitocondrio.

All'analisi microscopica i mitocondri risultano costituiti da una membrana esterna ed una membrana interna, altamente invaginata costituente le creste mitocondriali. La membrana esterna è composta per il 50% da lipidi e per l'altro 50% da proteine. La membrana interna è costituita per l'80% da proteine, che rappresentano gran parte degli enzimi della catena di trasporto degli elettroni e della fosforilazione ossidativa, varie deidrogenasi e sistemi di trasporto di intermedi metabolici al citosol dalla matrice mitocondriale. Nella matrice mitocondriale sono presenti molecole di DNA ad anello; in essa sono inoltre contenute le tre classi di RNA e gli enzimi DNA-polimerasi, aminoacil-RNA-sintetasi e RNA-polimerasi.

I mitocondri di cellule appartenenti a tessuti diversi, si riconoscono per la varietà delle creste e la forma del mitocondrio stesso. Sono caratterizzati da una età media che va da 5 giorni nelle cellule cardiache, ai 10 in quelle epatiche; i mitocondri invecchiando vanno incontro a degradazione da parte di enzimi litici lisosomiali, i nuovi si originano per divisioni di mitocondri preesistenti che, dopo una fase di accrescimento, si dividono in due unità più piccole.

La funzione principale dei mitocondri è quella di compiere le trasformazioni energetiche indispensabili per le funzioni cellulari. Questa si attua attraverso gli stadi costituenti il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa. Il ciclo di Krebs inizia con l'introduzione di acido piruvico generato durante la glicolisi, nel mitocondrio, dando come prodotti CO_2 e coenzimi ridotti ($\text{NADH}/\text{FADH}_2$). Nonostante il prodotto finale della catena respiratoria sia l'acqua, generata per riduzione (mediante quattro elettroni) dell'ossigeno molecolare e catalizzata dalla citocromo ossidasi (complesso IV), sia in

condizioni fisiologiche sia patologiche si possono formare intermedi non completamente ridotti, come l'anione superossido, il perossido di idrogeno, e il radicale idrossile chiamati Reactive Oxygen Species (ROS). Quando la produzione di ROS supera la capacità antiossidante della cellula, questi possono danneggiare macromolecole cellulari quali lipidi, proteine, DNA ed innescare gli eventi che portano alla morte programmata della cellula.

Gli organismi eucarioti hanno sviluppato sistemi per neutralizzare questi sottoprodotti estremamente reattivi: scavenger proteici che presentano gruppi sulfidrilici ad alto potere riducente, come il glutatione e la tioredoxina; sistemi enzimatici, come la superossido dismutasi, le catalasi e la glutatione perossidasi²²⁹.

I ROS sono implicati anche nella regolazione di diverse funzioni cellulari fisiologiche quali la difesa contro agenti patogeni, la trasmissione di segnale a livello intracellulare, l'attivazione della trascrizione, la proliferazione e l'apoptosi. Comunque è ormai evidente il coinvolgimento dei ROS nella patogenesi delle neoplasie, delle malattie neurodegenerative e del danno da ischemia/riperfusion.

Oltre alla funzione della respirazione, i mitocondri svolgono altre fondamentali attività:

- capacità di accumulare ioni Ca^{2+} ;
- legame con particolari proteine sulla membrana esterna che regolano la glicolisi;
- sintesi di ormoni steroidei;
- partecipazione alla gluconeogenesi;
- nelle cellule del sistema nervoso vegetativo, alla membrana esterna dei mitocondri, possono essere associate le MAO.

Data l'elevata importanza delle funzioni svolte dai mitocondri nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, non sono da sottovalutare gli eventi che seguono all'alterazione della funzionalità mitocondriale. Secondo recenti studi, modificazioni strutturali e funzionali dei mitocondri, sono alla base dei meccanismi di invecchiamento fisiologico e insorgenza di fenomeni patologici. Alcuni lavori mostrano come alcune proteine del peso molecolare di proteine recettoriali o proteine correlate alla neurotrasmissione, ai processi della fosforilazione, a canali ionici (Ca^{2+} , Na^+), sono significativamente modificati durante l'invecchiamento o dopo ipossia. Il contenuto e la composizione delle proteine della membrana mitocondriale, ottenute da diverse regioni del cervello (corteccia, cervelletto, striato, ippocampo, etc.), sono diversamente modificate durante l'invecchiamento.

È noto inoltre da tempo che la neuromiopia è una patologia genetica dovuta a modificazioni del DNA mitocondriale.

Recentemente alcuni lavori riportano che il DNA mitocondriale gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi delle cosiddette malattie comuni, come diabete, tumori e disturbi cardiaci.

Dati gli elevati livelli di espressione del TSPO nei mitocondri, gli studi iniziali su tale recettore hanno

valutato il suo ruolo nella respirazione cellulare. Si pensa che i ligandi al TSPO siano correlati ad un incremento dello stadio IV e ad una diminuzione dello stadio III della fosforilazione ossidativa. Inoltre il TSPO risulta essere coinvolto nell'attività della succinato-citocromo C-ossidoreduttasi (complesso II)²³⁰.

Il TSPO agisce anche nella protezione delle cellule ematopoietiche contro l'apoptosi che segue al trattamento con H₂O₂; l'espressione del recettore e la resistenza delle cellule ematopoietiche sono correlate alla tossicità da H₂O₂²³¹.

Sembra che il TSPO funzioni da sensore cellulare per l'ossigeno agendo da trasduttore del segnale ossigeno-indotto e portando ad un adattamento della risposta cellulare; in aggiunta il TSPO può mediare l'effetto protettivo contro il danno da radicali liberi.

Estremamente importante a livello mitocondriale è la presenza del mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) detto anche "mega-canale" o canale a conduttanza multipla, descritto per la prima volta da Haworth più di trenta anni fa. Il mPTP è un complesso multiproteico che si estende dalla membrana esterna a quella interna in un'area critica per il coordinamento metabolico tra cytosol, spazio intermembranale e matrice²³². Il mPTP regola la concentrazione del calcio nella matrice, il pH, il potenziale di membrana ed il volume del mitocondrio.

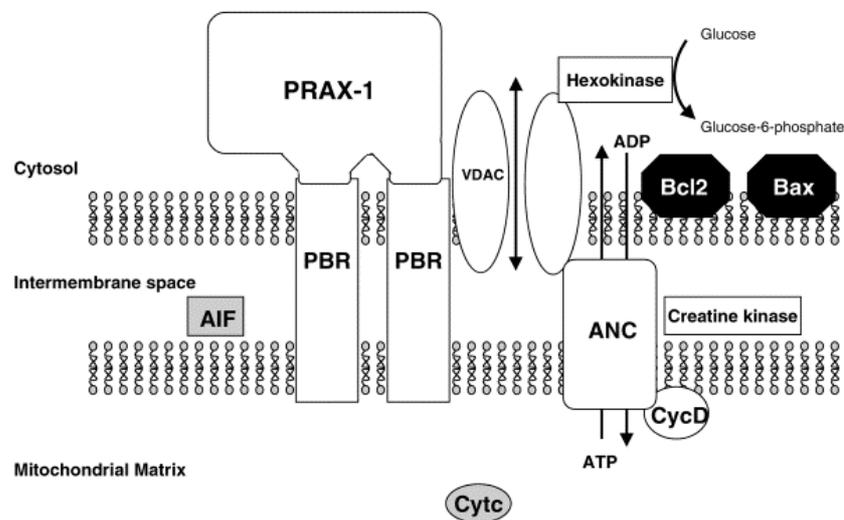


Fig. II.8- Modello strutturale di mPTP¹⁶⁵.

Le periodiche e rapide aperture del canale permettono alla catena respiratoria di creare un gradiente elettrochimico che porta alla sintesi di ATP. L'apertura del mPTP è regolata dalla variazione del potenziale e dal pH della matrice ed è significativamente inibita dalla ciclosporina A, EDTA e magnesio²³³. L'esatta composizione del mPTP non è chiara; le proteine implicate sia nella costituzione del poro che nella regolazione sono sei: una esochinasi, localizzata nel cytosol, che converte il glucosio in glucosio-6-fosfato (step iniziale nel processo glicolitico); VDAC (detta anche porina mitocondriale)

sulla membrana esterna; una creatin-chinasi nello spazio intermembrana; ANC (proteina-antiporter ATP-ADP); la ciclofilina D nella matrice (che interagisce con ANC) e il TSPO.

Poiché la membrana mitocondriale interna è impermeabile, il condotto VDAC/ANC è vitale per il trasferimento dei soluti dalla matrice mitocondriale.

L'apertura del poro sulla membrana interna avviene in due stadi:

1. la ciclofilina D si lega ad ANC, seguita da un rilascio del calcio;
2. ANC subisce una modificazione conformazionale: l'ATP passa cioè dalla matrice mitocondriale al citosol²³⁴.

Il mPTP è coinvolto non solo nel passaggio di ATP ma anche di colesterolo, fosfatidilserina e altri soluti.

Inoltre è implicato nei processi di danno e morte cellulare ed è considerato l'esecutore del destino cellulare a seguito dell'esposizione ad insulti tipo stress ossidativi, alterazione dei fattori di crescita, esposizione a citochine quali TNF- α ²³⁵.

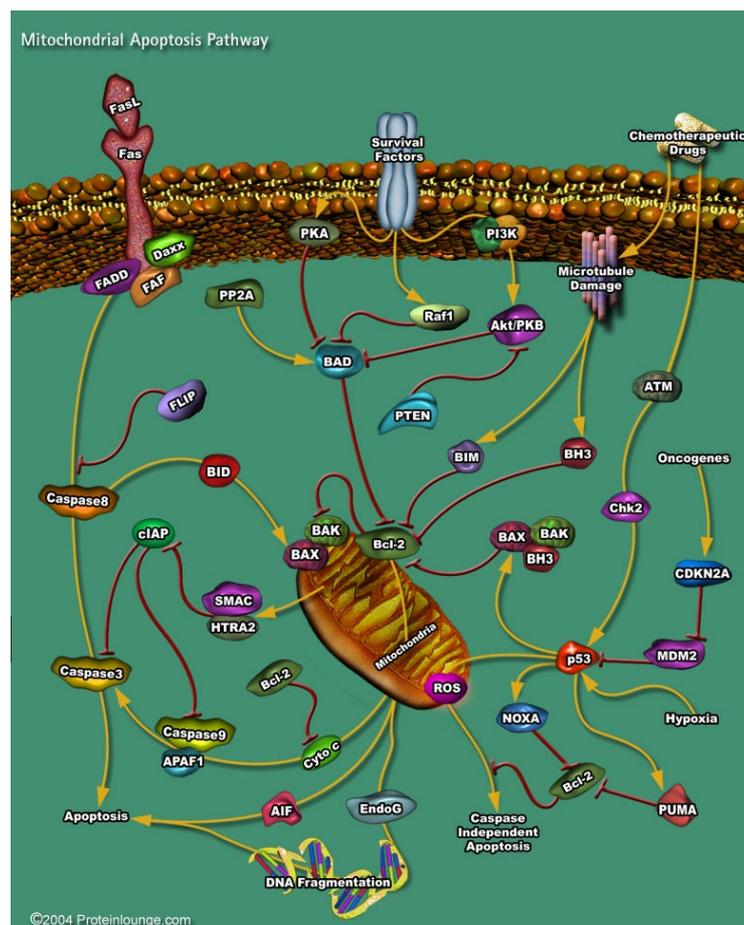


Fig. II.9- Coinvolgimento del mitocondrio nel processo apoptotico.

Con l'apertura del mPTP si ha la dissipazione del potenziale di membrana, il rigonfiamento del mitocondrio, la rottura della membrana esterna con il conseguente rilascio di proteine, incluso il

citocromo C (una piccola eme-proteina con un gruppo eme legato covalentemente a residui Cys11/17, che pare implicata nel promuovere l'aggregazione dell' α -sinucleina nel Parkinson)²³⁶ e il fattore induttore dell'apoptosi (AIF). L'AIF dal cytosol trasloca nel nucleo dove induce condensazione della cromatina e frammentazione del DNA. A livello nucleare il complesso che si forma tra il citocromo C, Apaf-1 (apoptosis activating factor 1) e pro-caspasi-9 determina una cascata proteolitica che porta alla formazione della proteina caspasi-3, inducente modificazioni al nucleo, al citoscheletro e alla membrana plasmatica, caratteristiche dell'apoptosi²³³⁻²³⁵.

Fisiologicamente i segnali critici per l'apertura di tale poro sono il calcio ed i ROS. Il calcio è un elemento chiave nella regolazione della funzionalità mitocondriale e, agendo a diversi livelli, stimola la fosforilazione ossidativa. Comunque l'alterazione dell'omeostasi del calcio è attualmente oggetto di indagini perché ritenuta responsabile di numerose patologie di origine mitocondriale. Il processo apoptotico è sempre anticipato da un incremento della concentrazione di calcio a livello mitocondriale; tale fenomeno da solo, tuttavia, non è sufficiente ad innescare gli eventi che conducono la cellula ad una morte programmata. Il fatto che, durante l'apoptosi, si abbia sempre un aumento di ROS in maniera proporzionale a quello del calcio, fa supporre un'intima correlazione tra i due fattori sia a livello fisiologico sia a livello patologico²³⁷.

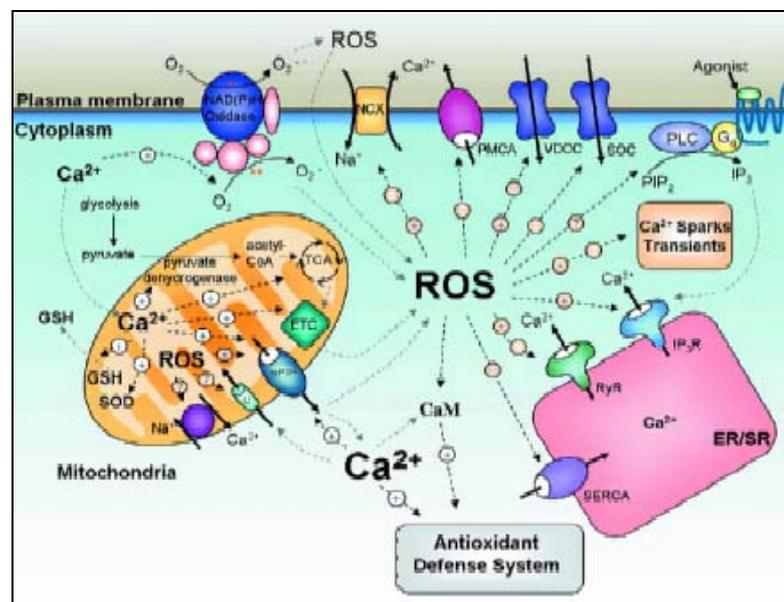


Fig. II.10- Intercorrelazione tra ROS e calcio nell'induzione apoptotica²³⁷.

Oltre allo stress ossidativo, altri fattori che, uniti al calcio, inducono la cellula alla morte programmata sono: basse concentrazioni di adenina, alte concentrazioni di fosfato, il bilancio tra proteine anti-apoptotiche, appartenenti alla famiglia Bcl-2, e pro-apoptotiche, come la Bax. La BAX che si trova nel cytosol può associarsi alla ANC del mPTP promuovendo il rilascio di citocromo C; mentre le proteine correlate alla famiglia della Bcl-2, anch'esse ancorate alla membrana mitocondriale esterna in

prossimità del mPTP, ne stabilizzano l'integrità impedendo l'apertura del poro²³⁸.

Nonostante tutti gli induttori conosciuti del mPTP richiedano un accumulo eccessivo di calcio a livello mitocondriale, i ligandi al TSPO possono attivare mPTP senza avere un'addizionale aumento dei livelli del calcio. Questo è in accordo con il fatto che essi interagiscono direttamente con uno specifico target componente del complesso mPTP. PK11195 rende più suscettibile la cellula all'induzione apoptotica di vari stimoli quali un danneggiamento del DNA sperimentalmente indotto, e può revertire l'effetto di soppressione anti-apoptotico delle proteine Bcl-2²³⁹. Al contrario altri studi evidenziano la forte azione protettiva del Ro5-4864 nelle cellule U937 di linfoblastoma verso l'apoptosi indotta da TNF- α ; tale effetto è bloccato dal PK11195²¹⁹. Il diverso comportamento pro/anti-apoptotico dei due ligandi potrebbe suggerire una diversa modulazione allosterica del recettore.

In generale si può ipotizzare che tutti gli agenti che mantengono costante il potenziale di membrana e il mPTP chiuso, possano offrire efficaci mezzi per il trattamento di processi apoptotici neurodegenerativi: oltre ad alcuni agenti che si legano al TSPO la superossido-dismutasi (SOD, una proteina scavenger) si è dimostrata efficace nel facilitare la chiusura del mPTP.

Possiamo concludere quindi che il TSPO, data la particolare localizzazione subcellulare, sia coinvolto nella regolazione di numerosi processi cellulari che hanno nel mitocondrio la principale sede effettrice, come ad esempio la fosforilazione ossidativa, la generazione di ROS, la morte cellulare programmata. Dato che negli ultimi anni prende sempre più campo l'idea che numerose patologie anche comuni derivino da disfunzioni proprio a livello mitocondriale, è auspicabile in futuro approfondire la conoscenza circa le alterazioni genetiche e biochimiche implicate ed indagare, magari con ligandi più affini e selettivi, il ruolo effettivo del TSPO in esse.

e) Ischemia - Riperfusione

La generazione indiscriminata di ROS, dovuta ad un'alterazione della fosforilazione ossidativa, e il sovraccarico mitocondriale di Ca²⁺ sono gli eventi chiave nella genesi del danno da ischemia-riperfusione che provocano l'apertura del mPTP, il rilascio di citocromo C, l'attivazione delle caspasi e l'apoptosi/necrosi della cellula²⁴⁰.

E' stata ampiamente dimostrato il coinvolgimento del TSPO nei processi fisiologici e patologici che hanno come principale sede subcellulare il mitocondrio, come appunto la fosforilazione ossidativa e l'apoptosi. Studi post mortem su patologie cerebrovascolari, usando [³H]PK11195 hanno evidenziato un incremento della densità del TSPO di circa 7 volte nel core e nella periferia della zona colpita da infarto²⁴¹. Inoltre studi su modelli mitocondriali di cardiomiociti hanno mostrato l'effettiva protezione cellulare di ligandi al TSPO, Ro5-4864 e SSR180575, verso l'inibizione della fosforilazione ossidativa e l'induzione apoptotica provocata da alte concentrazioni di H₂O₂ (modello di stress ossidativo). L'azione anti-apoptotica di tali composti è soppressa da PK11195, potente ligande al TSPO che

presenta attività pro-apoptotica.

Concludendo, il ruolo protettivo che molti ligandi al TSPO sembrano svolgere nel danno ischemico, si può almeno concettualmente estendere anche alle patologie cerebrovascolari, nelle quali l'azione anti-apoptotica può essere affiancata alla stimolazione gliale della biosintesi di neurosteroidi ed alla loro concomitante azione neuroprotettiva.

f) Implicazioni fisiologiche e patologiche del TSPO nel SNC

▪ Patologie neurodegenerative e neuroinfiammatorie

Il Sistema Nervoso Centrale (SNC) è anatomicamente costituito dall'encefalo, contenuto entro la scatola cranica, e dal midollo spinale, accolto nel canale vertebrale. La capacità di integrare le informazioni da una varietà di fonti esterne ed interne definisce il ruolo cardinale del SNC, che consiste nell'ottimizzare le necessità dell'organismo rispetto alle richieste dell'ambiente.

La principale unità funzionale del SNC è il neurone: la stima è che l'encefalo ne contenga almeno 10^{11} . I neuroni presentano forti differenze fra loro, nel ruolo funzionale, nelle interconnessioni o nei neurotrasmettitori usati. Poiché i neuroni del SNC sono cellule terminalmente differenziate, essi non vanno incontro a risposte proliferative in seguito a lesione e questo fa sì che la distruzione anche di un piccolo numero di essi provoca deficit neurologici clinici anche gravi. Tra le affezioni neurologiche di maggior rilievo troviamo: malattie cerebrovascolari (ipossia, ischemia, infarto), infezioni, malattie demielinizzanti, tumori e malattie degenerative.

La degenerazione neuronale può essere il risultato di lesioni cellulari acute o lentamente progressive oppure di morte cellulare programmata (apoptosi). Alcune malattie del SNC sono caratterizzate da depositi neuronali intracitoplasmatici come gli ammassi neurofibrillari della malattia di Alzheimer e i corpi di Lewy nella malattia di Parkinson. Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una progressiva e irreversibile perdita di neuroni in specifiche regioni del cervello. Prototipi di malattie neurodegenerative sono il morbo di Parkinson (MP), la corea di Huntington (HD), l'Alzheimer (AD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

La gliosi rappresenta l'indicatore patologico e istologico più importante di danno al SNC: gli astrociti reagiscono alla lesione mediante ipertrofia e iperplasia; la microglia costituita invece da cellule la cui funzione è quella del sistema macrofagico fisso, si ritrova sottoforma di aggregati intorno a zone di neuroni in degenerazione. La localizzazione principale del TSPO nel SNC è a livello delle cellule della glia, in particolare negli astrociti e nella microglia. Park *et al.*²⁴² hanno dimostrato che la concentrazione del TSPO può aumentare notevolmente nelle diverse situazioni che portano all'attivazione gliale. Infatti in condizioni fisiologiche normali, i livelli di TSPO nel SNC sono molto bassi e limitati alle cellule della glia (astrociti e microglia). Stress metabolici, neuroinfiammazione,

danno ischemico, lesioni tossiche, traumi, sono associati ad una sovraespressione del TSPO negli astrociti e nella microglia, in funzione del tempo trascorso dalla lesione. Simili variazioni dell'espressione recettoriale sono riportati anche nel caso di stati neurodegenerativi sia acuti che cronici.

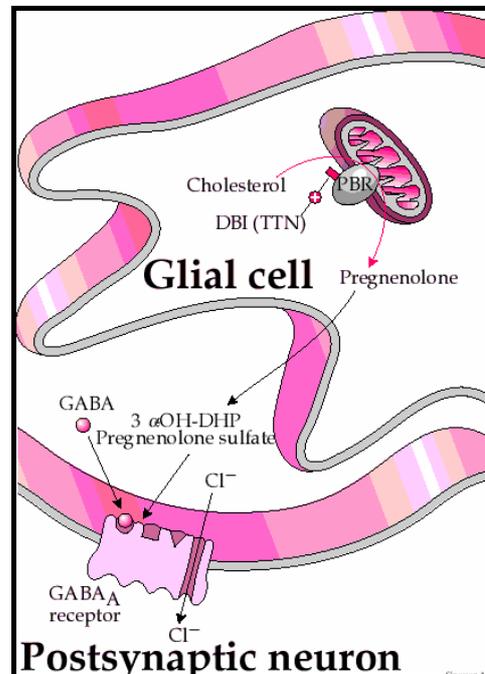


Fig. II.11- Produzione di neurosteroidi a livello gliale.

Una diminuzione della densità del recettore, correlata alla respirazione cellulare, potrebbe suggerire un indebolimento di tale funzione nelle cellule interessate. Una sottoespressione del TSPO piastrinico è stata tuttavia riscontrata anche in pazienti schizofrenici sotto trattamento antidopaminergico, per cui, in realtà la correlazione con i dati ottenuti e la sindrome extrapiramidale non è chiara. Il coinvolgimento del TSPO nell'AD è stato recentemente investigato usando un composto radiomercato DAA1106 su tessuto umano post mortem. Gulyàs *et al.*²⁴³ hanno dimostrato una significativa up-regulation del legame del DAA1106 nelle regioni parietali, temporali, nel talamo e nella sostanza bianca di pazienti affetti da AD (TABELLA 1. Kassiou *et al.*, 2009)¹⁶². Inoltre le regioni dove si osserva un incremento del legame di tale composto sono state correlate con studi di immunochimica che hanno dimostrato un incremento della microglia in queste regioni cerebrali di pazienti affetti da AD. Sempre attraverso uno studio post mortem è stato osservato un aumento del legame di [³H]PK11195 nel cervello di pazienti affetti da HD a livello del putamen e della regione corticale ma non a livello del nucleo caudato e del globus pallidus. (TABELLA 1. Kassiou *et al.*, 2009)¹⁶².

Tabella 1. Distribuzione e up-regulation del TSPO in pazienti con patologie del SNC rispetto a controlli sani^a.

Malattie del SNC	Tecnica <i>in vitro</i>	Regione interessata	Controlli B _{max} (fmol/mg)	Malati B _{max} (fmol/mg)	Riferimenti
Malattia di Alzheimer	Autoradiografia con [¹²⁵ I]desfluoro-DAA1106	lobo parietale sostanza bianca lobo temporale	0.32 ± 0.16 0.24 ± 0.02 0.22 ± 0.13	1.26 ± 0.10 1.12 ± 0.26 1.02 ± 0.29	84
Malattia di Huntington	Autoradiografia con [³ H]PK11195	corteccia frontale putamen corteccia temporale	39.5 ± 6.9 46.6 ± 8.4 ns	49.6 ± 11.8 78.9 ± 30.6 ns	113
Malattia di Huntington	Autoradiografia con [³ H]Ro5-4864	putamen nucleo caudato globus pallidus	40.71 ± 5.04 ns ns	ns 61.67 ± 4.99 ns	78

^aIl valore di B_{max} è espresso come fmol/mg e indica il potenziale massimo di legame di ciascun radioligando. "ns" indica che non ci sono significative differenze tra controlli sani e pazienti malati. (Kassiou et al., 2009)¹⁶²

Altri lavori²⁴⁴ esprimono una evidente correlazione tra l'aumento dei siti di legame per [³H]PK11195 e il processo infiammatorio sia *in vitro* che *in vivo*, nella sclerosi multipla e nella encefalomielite sperimentale.

Il preciso ruolo del TSPO nella neurodegenerazione ancora non è del tutto noto. Forse considerando la forte attività proliferativa durante la gliosi, fenomeno comune in tante patologie neuroinfiammatorie, è possibile che la sovraespressione della proteina sia imputabile ad un aumento del trasporto del colesterolo¹⁸⁷ e di altre proteine²⁴⁵ necessarie per la biogenesi della membrana mitocondriale interna.

Al di là delle implicazioni biochimiche, sono ormai molteplici i lavori²⁴⁶⁻²⁴⁸ che dimostrano come l'utilizzo di ligandi al TSPO radiomarcanti sia un ottimo strumento di imaging cerebrale non invasivo, al fine di studiare, caratterizzare, monitorare, diagnosticare, anche con largo anticipo rispetto all'insorgenza sintomatica, numerose patologie neurodegenerative su base infiammatoria.

Risulta probabile inoltre l'implicazione del TSPO nella regolazione del danno neuronale. I mitocondri sono la principale fonte di ROS (Radical Oxygen Species) e ne sono anche il target primario. Come già accennato, queste molecole ossigeno-attivate sono implicate nella regolazione di diverse funzioni cellulari come la difesa da agenti patogeni, proliferazione, apoptosi. Sono anche implicati nei processi di invecchiamento e differenziazione cellulare come nell'Alzheimer, nei tumori e nel danno ischemico. Inoltre è probabile che l'aumento dell'attività ormonale giochi un ruolo fondamentale nella sovraespressione del TSPO, poiché nella malattia di Alzheimer si ha un aumento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Infatti sono stati trovati livelli alti di pregnenolone nel liquido cerebrospinale di pazienti malati di AD e bassi livelli di 22(R)-idrossicolesterolo, intermedio steroidogenico, nell'ippocampo e nella corteccia frontale. Quest'ultimo dato è in disaccordo con l'aumentata espressione del TSPO che dovrebbe compensare questa diminuzione e mantenere i livelli di 22(R)-idrossicolesterolo costanti. Questa mancata compensazione, a dispetto della sovraespressione del TSPO, può far ipotizzare una disfunzione del TSPO o una diminuzione dei ligandi endogeni come

il DBI nelle patologie neurodegenerative come l'AD. In accordo con tali osservazioni, negli anni precedenti allo sviluppo della patologia i malati di AD presentano alti livelli plasmatici di colesterolo mentre bassi di DHEA (deidroepiandrosterone, prodotto finale della steroidogenesi), che, al di là dell'implicazione eziologica di natura cerebrovascolare, può essere sintomo di una disfunzione proprio a livello del TSPO, il cui ruolo principale ricordiamo essere il trasporto intramitocondriale del colesterolo e la biosintesi di steroidi. Tuttavia non si è ancora indagato su eventuali alterazioni genetiche, probabilmente a livello del DNA mitocondriale, che provochino una difettosa funzionalità della proteina in questione e conseguentemente una diminuzione dei livelli di neurosteroidi e una maggiore suscettibilità neuronale allo stress ossidativo. Inoltre non si sono potuti ancora realizzare esperimenti in vivo con ligandi al TSPO per riuscire a chiarire almeno in parte il ruolo patogenetico della proteina nell'AD, poiché tutto il materiale a disposizione è post mortem.

In ultima analisi sembra terapeuticamente interessante l'interazione dei neurosteroidi, quali pregnenolone, deidroepiandrosterone ed i loro solfati, con il recettore sigma di tipo 1, proteina recentemente scoperta e sequenziata che modula la mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare, le risposte NMDA-mediate, il rilascio di acetilcolina e di altre monoammine. Dal punto di vista farmacologico il recettore sigma-1 è coinvolto nei processi di memorizzazione, risposta allo stress, neuroprotezione e farmacodipendenza; una sua stimolazione può rappresentare un'ulteriore linea terapeutica verso la neuroprotezione e i disturbi cognitivi associati all'AD¹⁹⁶. Quindi, oltre all'effettiva protezione esercitata dal TSPO nell'apoptosi ROS-indotta, tutti questi dati suggeriscono che l'attivazione tramite ligandi specifici del recettore a livello gliale e la conseguente produzione di steroidi neuroprotettivi può offrire un nuovo e razionale approccio nella cura dell'AD.

▪ Neuropatia

Il dolore neuropatico è causato da un danno a carico di strutture neuronali che comporta spesso la comparsa di supersensibilità neuronale, ne sono esempi la nevralgia del trigemino e il dolore da arto fantasma. Il dolore neuropatico non risponde agli analgesici oppioidi comunemente usati per curare il dolore nocicettivo (causato dalla stimolazione dei recettori nocicettivi e trasmesso lungo vie neuronali intatte). La neuropatia è dovuta a processi degenerativi a carico dei nervi²⁴⁹. Il TSPO sembra essere implicato nella degenerazione-rigenerazione di nervi.

Peptidi derivati da DBI (Diazepam Binding Inhibitor), ligandi endogeni al TSPO, sono presenti nelle cellule di Schwann. In particolare ODN (octadecaneuropeptide) è uno dei ligandi endogeni che è stato scoperto essere coinvolto nella rigenerazione dei nervi periferici nel modello di degenerazione del nervo sciatico di ratto. Agonisti del TSPO come ODN inducono la rigenerazione del nervo per stimolazione della sintesi degli steroidi²⁵⁰⁻²⁵². Ulteriori studi hanno dimostrato che in modelli di neurodegenerazione centrale e periferica il composto SSR180575 aumenta la sopravvivenza neuronale

e migliora il recupero funzionale nella neuropatia indotta da acrilamide nel ratto. In particolare si è dimostrato in grado di promuovere la sopravvivenza e la riparazione neuronale dopo la rescissione del corpo assonico di motoneuroni facciali attraverso, non solo l'aumento di steroidi neuroattivi, ma anche di fattori neurotrofici quali NGF, LIF, IL-6 e citochine appartenenti alla famiglia CNTF. È stato visto infatti che SSR180575 determina un aumento di pregnenolone nel cervello e nel nervo sciatico, questo potrebbe essere proprio il meccanismo responsabile dell'effetto neuroprotettivo di questo composto. In un altro esperimento si è visto che Ro5-4864 stimolava la rigenerazione assonica del nervo sciatico in maniera proporzionale all'aumento della concentrazione di neurosteroidi²⁵¹.

Questi dati, oltre a dimostrare il coinvolgimento del TSPO nel processo neurotrofico, molto probabilmente steroido-mediato, suggeriscono un potenziale utilizzo dei ligandi al TSPO nel prevenire la degenerazione-demielinizzazione dei nervi periferici associata all'invecchiamento, a traumi o a patologie neuropatiche, come nel caso del diabete²⁵³.

▪ **Patologie neuropsichiatriche**

Il coinvolgimento del TSPO nella regolazione di diversi processi biologici quali la funzione immunitaria, il metabolismo cellulare e soprattutto l'attività neuroendocrina, suggerisce il potenziale ruolo della proteina nell'adattamento dell'organismo allo stress. Il TSPO può regolare numerosi sistemi coinvolti nella risposta allo stress quali l'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale, il sistema nervoso simpatico, il sistema renina-angiotensina e l'asse immunitario neuroendocrino. Infatti il TSPO è particolarmente espresso negli organi periferici come i tessuti endocrini, il cuore, il rene, che sono altamente attivati durante lo stress. Inoltre generalmente si è osservata una up-regulation del TSPO durante lo stress acuto (esperimenti di elettroshock, interventi chirurgici, forced swimming test, tail shock, noise test, etc.), ma una down-regulation durante quello cronico (privazione del cibo, etc). Nelle situazioni di forte stress, l'attivazione del TSPO può derivare da un adattamento cellulare metabolico e neuronale per farvi fronte. Nell'esposizione allo stress cronico invece si ha diminuzione della densità del TSPO, per arginare un aumento del tono simpatico, dell'asse renina-angiotensina ed una ipercolesterolemia, che può provocare danni al SNC, modificazioni metaboliche ed impoverimento della funzionalità del sistema immunitario. Ciò può riflettere un meccanismo neuroendocrino protettivo che porta ad una inibizione del trasporto del colesterolo mitocondriale e della sovrapproduzione di glucocorticoidi. È noto come lo stress cronico, in contrasto con quello acuto, porti ad una diminuzione della secrezione di cortisolo.

L'ansia è il sintomo cardine di numerose malattie neuropsichiatriche indotte dallo stress.

Una diminuzione della densità piastrinica del TSPO è stata dimostrata tramite ligandi radiomarcanti in diverse patologie psichiatriche, come il disturbo da ansia generalizzata, fobia sociale generalizzata, e stress post-traumatico²⁵⁴. Tale decremento si è osservato anche in adolescenti che hanno tentato il

suicidio²⁵⁵. La diminuzione dell'ansia dopo un trattamento con Diazepam è accompagnata da un aumento del 69% della densità piastrinica del TSPO¹²⁷. Inoltre, ad ulteriore conferma del coinvolgimento del TSPO in patologie neuropsichiatriche, è stato visto che la variazione del gene che codifica per la proteina aumenta la suscettibilità ad attacchi di panico²⁵⁶.

Al contrario, nel caso di depressione e disturbi ossessivo-compulsivi, la densità del TSPO nelle piastrine non è diversa dai controlli (soggetti sani) e non è stata trovata correlazione tra grado di depressione ed espressione di TSPO piastrinico. In accordo con ciò in tali patologie non si nota una maggiore attività elettrica dell'amigdala, che invece sembra mediare la deplezione del TSPO indotta dallo stress¹²⁷. E' stato visto che uno stabilizzante dell'umore e antiepilettico come la Carbamazepina agisce sul TSPO piastrinico determinandone un aumento, questo effetto tuttavia non ha trovato correlazione plausibile con le sue proprietà terapeutiche²⁵⁷.

E' importante ricordare, a tal proposito, che l'allopregnenolone, sintetizzato dalla riduzione del progesterone ad opera dell'attività enzimatica della 5 α -reduttasi e della 3 α -idrossisteroideidrogenasi (3 α -HSD), è un potente modulatore allosterico positivo della trasmissione GABAergica con una potenza 20 volte maggiore rispetto alle benzodiazepine e 200 volte rispetto ai barbiturici. Come quest'ultimi e a differenza della benzodiazepine, alte concentrazioni (nell'ordine delle mM) di neurosteroidi hanno presentato una certa attività intrinseca in assenza di GABA²⁵⁸.

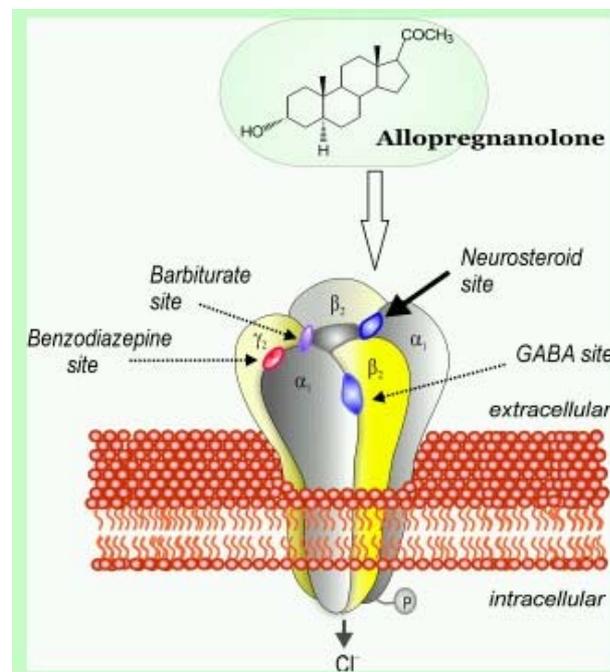


Fig. II.12 - Modulazione allosterica dei neurosteroidi sul GABA_A.

Concludendo, i neurosteroidi devono il loro effetto ansiolitico e sedativo proprio alla loro capacità di incrementare il flusso di cloro mediato dal GABA_A. Anche per quanto concerne le patologie

neuropsichiatriche direttamente associate all'ansia, si è dimostrato che nell'induzione sperimentale di attacchi di panico, mediante la colecistochinina-tetrapeptide o sodio lattato, si assiste ad un notevole decremento della concentrazione di steroidi neuroattivi 3α -ridotti, probabilmente responsabile della depressione del tono GABAergico²⁵⁹. Sono stati saggiati gli effetti sul sonno con i relativi EEG di neurosteroidi 3α -ridotti e i risultati hanno dimostrato un profilo ipnotico-sedativo del tutto simile a quello delle benzodiazepine; tuttavia la somministrazione subcronica non ha riportato fenomeni di tolleranza o sintomi di astinenza²⁶⁰.

Concludendo, sarebbe auspicabile l'utilizzo degli steroidi per il trattamento di malattie neuropsichiatriche associate allo stress come alternativa alle terapie classiche spesso limitate dalla presenza di forti effetti collaterali. Sono numerosi i gruppi di ricerca impegnati in questo senso mediante approcci chimici e farmacologici.

Tuttavia, data l'alta suscettibilità al metabolismo endogeno microsomiale, rimane il grosso ostacolo di trovare degli analoghi sintetici, che siano capaci di arrivare selettivamente e in concentrazioni efficaci a livello centrale.

Lo sviluppo di ligandi al TSPO altamente specifici e selettivi per le cellule gliali, al fine di promuovere *in situ* la sintesi di neurosteroidi, potrebbe riuscire ad ovviare indirettamente a tale problema, e rappresentare quindi una futura strategia terapeutica per il trattamento di un ampio spettro di malattie neuropsichiatriche.

II.1.2- Ligandi al TSPO

a) Ligandi endogeni

Sin dalla scoperta dell'esistenza del PBR, poi rinominato TSPO, l'interesse della comunità scientifica si è concentrato sull'individuazione di possibili ligandi endogeni, step fondamentale per caratterizzare e delucidare le sue funzioni fisiologiche *in vivo*.

Fino ad oggi sono stati proposti una serie di probabili ligandi endogeni quali il Diazepam Binding Inhibitor (DBI), alcune porfirine e l'Antralina.

Il DBI (diazepam binding inhibitor), un neuropeptide di 11 kDa costituito da 86 aminoacidi isolato inizialmente nel cervello di ratto, deve il suo nome alla capacità di spiazzare [³H]Diazepam con un'affinità nanomolare sia dai recettori benzodiazepinici centrali sia periferici; mentre per il CBR si comporta da modulatore negativo del recettore-canale GABA_A, è stato dimostrato essere altamente espresso anche nei tessuti endocrini periferici e capace a concentrazioni di circa 10^{-8} M di stimolare potentemente la produzione di steroidi. Per questa ragione il DBI e il suo prodotto post-translazionale di simile affinità 17-50 triakontatetra-neuropeptide (TTN) sono finora i maggiori candidati per il ruolo

di ligandi endogeni del TSPO. Inoltre alti livelli di DBI sono stati trovati in tumori al cervello come astrocitoma e glioblastoma, confermando la stretta associazione tra DBI e TSPO.

Una proteina di 16 kDa isolata dall'antro di stomaco di topo e chiamata appunto Antralina si è dimostrata capace di inibire specificamente il legame di [³H]Ro5-4864 al TSPO. E' interessante il fatto che, oltre ad esercitare un ruolo di antagonista per il TSPO, essa è in grado anche di inibire il legame di [³H]Nitrendipina al canale del calcio, sopprimendo quindi l'azione calcio-antagonista. Dal momento che è stato dimostrato che la sua attività intrinseca risulta essere proporzionale e dose-dipendente alle concentrazioni di calcio, si è postulato un duplice significato fisiologico dell'Antralina ed un'interconnessione ancora da approfondire tra i due sistemi recettoriali¹²⁷.

Altri importanti ligandi endogeni sono le porfirine, già note per la loro capacità di modulare l'attività di diversi enzimi e per il loro coinvolgimento con molte proteine mitocondriali. In particolare la Protoporfirina IX ha una costante di inibizione (K_i) del valore di 20-50 nM per il TSPO ed un valore 1000 volte superiore per il CBR: questa specificità recettoriale implica un ruolo fisiologico delle porfirine nell'interazione con il TSPO che probabilmente va al di là della semplice biosintesi dell'eme. Anche il colesterolo, come già evidenziato in precedenza, mostra un'affinità nanomolare per il TSPO; ciononostante il ruolo della proteina nella traslocazione della molecola all'interno del mitocondrio scongiura, almeno in parte, un possibile ruolo di modulatore fisiologico del TSPO.

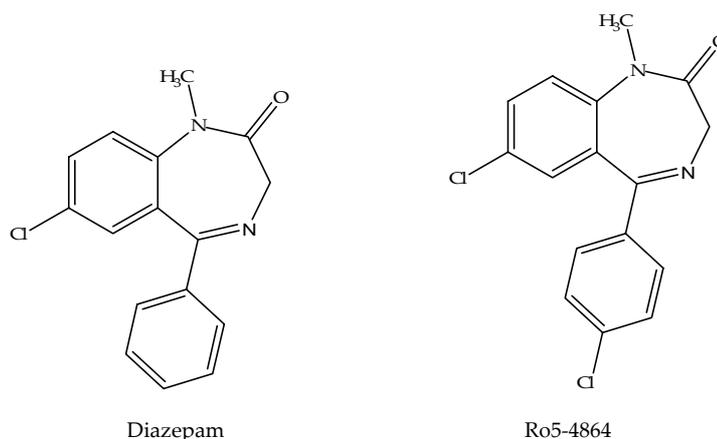
b) Ligandi di origine sintetica

Sono state individuate numerose sostanze di sintesi in grado di legarsi al TSPO con diversi gradi di affinità e selettività. Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse serie di composti, ligandi al TSPO, sperimentalmente già in uso in studi di imaging, la cui potenziale utilità terapeutica o diagnostica dovrà necessariamente essere valutata mediante studi in vivo.

La ricerca e la sintesi di nuovi ligandi sintetici al TSPO è oggetto di interesse di numerosi gruppi di ricerca. Infatti, solo attraverso la valutazione delle differenze strutturali dei vari ligandi e della loro conseguente capacità di modulare l'attività del TSPO, è possibile far luce non solo sulla struttura del sito di legame di tali molecole al TSPO, ancora poco conosciuto, ma anche sull'enigmatico ruolo fisiologico e patologico del recettore. La ricerca di nuove molecole capaci di modulare l'attività del TSPO risulta di fondamentale importanza anche al fine di investigare sulla presenza o meno di sottotipi recettoriali, la cui ipotetica esistenza è concettualmente supportata dalla diversa funzionalità tessuto-specifica della proteina. Inoltre i dati su agonisti e presunti antagonisti sembrano scongiurare una correlazione tra affinità ed attività intrinseca; lo sviluppo di molecole più specifiche e selettive è un passaggio obbligato per poter finalmente capire i diversi stati funzionali del recettore e le diverse modalità strutturali di interazione con ligandi sia esogeni/endogeni, sia agonisti/antagonisti.

- **Benzodiazepine**

La scoperta che il [³H]Diazepam si legava con un'elevata affinità non solo a livello cerebrale, ma anche in frazioni mitocondriali di rene di topo¹, mentre Ro5-4864 (4'-Clordiazepam), una benzodiazepina clinicamente inattiva, si legava solo a livello periferico, ha permesso l'identificazione e la caratterizzazione del TSPO rispetto al noto CBR. Solitamente per distinguere l'attività del recettore benzodiazepinico periferico da quello centrale viene usato come controllo il Clonazepam, potente benzodiazepina ampiamente usata in clinica, che, tra quelle conosciute, presenta l'affinità più bassa per il TSPO.

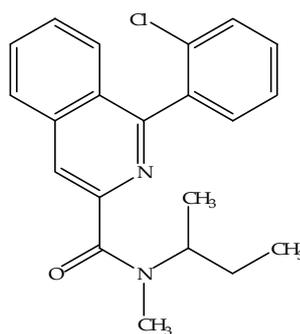


Sebbene Ro5-4864 sia stato il primo potente e selettivo ligando ed abbia permesso i primi passi della ricerca farmacologica, numerosi studi hanno tuttavia evidenziato differenze di binding specie-dipendenti; questo rende difficile l'estrapolazione dei risultati dai modelli sperimentali animali all'uomo e perciò attualmente si preferisce utilizzare altri ligandi che non presentano tale limite²⁶¹.

- **Derivati isochinolin-carbossamidici**

Il PK11195 (1-[2-clorofenil]-N-metil-N-[1-metil-propil]-3-isochinolin carbossamide) fu il primo composto a struttura non benzodiazepinica a mostrare un'alta affinità e selettività per il TSPO. In confronto con Ro5-4864 studi in vitro ed in vivo rivelano un'affinità superiore e diversi profili cinetici e farmacologici. I primi saggi di analisi termodinamica hanno evidenziato che mentre [³H]Ro5-4864 ha un legame entalpicamente guidato (termodinamicamente sensibile), [³H]PK11195 mostra un'interazione recettoriale di natura entropica²⁶². Inoltre quest'ultimo sopprime la steroidogenesi indotta da FGIN-1-27, mentre se somministrato da solo sembra stimolarla. Probabilmente quindi, PK11195 agisce sul recettore come antagonista o più probabilmente come agonista inverso. Questo composto, date le ottime caratteristiche di interazione, è ormai da anni considerato il prototipo di ligando al TSPO; lo spiazzamento recettoriale di [³H]PK11195 infatti rappresenta tutt'oggi il metodo più usato per saggiare la potenza di nuovi potenziali ligandi. Inoltre il PK11195 marcato è già stato

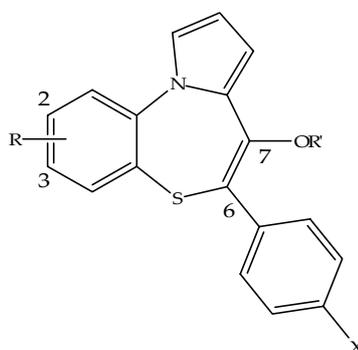
ampiamente impiegato, in tecniche micro-autoradiografiche prima, ed attualmente nella più moderna PET, come marker per la visualizzazione in vivo della sovraespressione del TSPO in numerose patologie sia neoplastiche sia neurodegenerative come l'AD²⁶³, il morbo di Parkinson e la sclerosi multipla. Tuttavia la sua bassa biodisponibilità (88% di legame con proteine plasmatiche), la scarsa permeabilità cerebrale e un comportamento farmacocinetico estremamente variabile ne precludono l'utilizzo come strumento terapeutico o diagnostico. Anche i derivati isochinolin-carbossiamidici più recenti, sebbene altamente affini, hanno mostrato in vivo tali caratteristiche sfavorevoli²⁶⁴.



PK11195

▪ Benzotiazepine

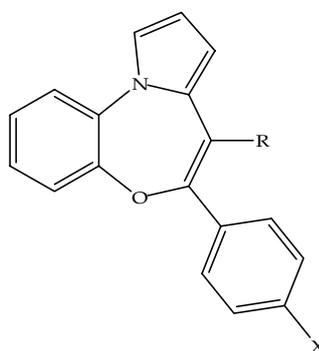
Modellati a partire dal 1990, su una struttura pirrolo[2,1-*d*][1,5]benzodiazepinica, come nuovi ligandi al GABA_A, alcuni derivati, come il THIA-68, mostrano una discreta affinità (minore comunque rispetto a PK11195) e una notevole selettività per il TSPO. Studi di SAR hanno individuato nel doppio legame 6,7, nella 6-*p*-clorofenil sostituzione e nel gruppo carbamoilossidietilico in posizione 7 gli elementi strutturali chiave nell'interazione recettoriale. Inoltre modifiche sulla struttura triciclica, come la sostituzione del pirrolo con un anello pirrolinonico, o la trasformazione del nucleo [1,5]tiazepinico in uno tiazinico, ne riduce drasticamente l'affinità²⁶⁵. Al di là delle promettenti caratteristiche che mostrano, non è ancora stata affrontata una valutazione in vivo per determinare il loro profilo farmacologico.



Struttura generale dei derivati benzotiazepinici

▪ Benzossazepine

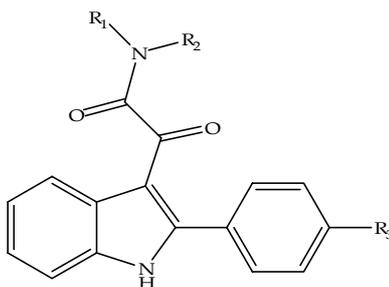
Questi composti hanno una struttura modellata su uno scheletro pirrolobenzossazepinico. I più potenti della serie, OXA-17f e OXA-17j, presentano un' affinità rispettivamente di 0.26 nM e 0.36 nM ed alta selettività verso il TSPO rispetto al CBR²⁶⁶. La stimolazione della steroidogenesi di questi ligandi risulta comparabile con quella di PK11195 e di Ro5-4864. Inoltre, a differenza di quest'ultimo, i derivati benzossazepinici non presentano un'interazione recettoriale specie-dipendente. Nuovi derivati di questa serie, NF-213 e NF-182, sono stati usati per valutare il coinvolgimento del TSPO nella crescita cellulare, anche se il loro potere antiproliferativo sembra non essere proporzionale alla potenza del ligando. Infatti la concentrazione efficace per determinare tale effetto risulta essere 1000 volte maggiore di quella necessaria a saturare i siti del TSPO²⁶⁷.



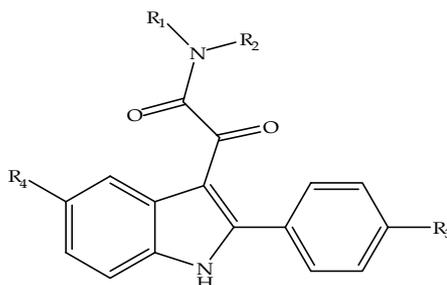
Struttura generale dei derivati benzossazepinici

▪ Derivati indolacetamidici

Composti 2-aril-3-indolacetamidici affini (nM) e selettivi al TSPO furono sviluppati più di 15 anni fa come risultato della sintesi indolica di Fischer. Il lead di questa classe, l'N,N-di-n-esil-2-(4-fluorofenil)indol-3-acetamide, o FGIN-1-27, ha mostrato in animali da esperimento proprietà anticonvulsivanti, sedative e ansiolitiche nonostante non abbia affinità per il GABA_A. Probabilmente esso attiva indirettamente il recettore GABA_A stimolando la sintesi di steroidi neuroattivi, infatti tale composto ha una grande capacità di penetrazione a livello centrale. Studi SAR hanno focalizzato l'attenzione sulla natura della dialchilazione amidica e sulla lunghezza di tali gruppi alchilici, individuando un optimum tra una sostituzione dietilica ed una n-diesilica²⁶⁸. Sono stati recentemente sintetizzati analoghi strutturali ad alta affinità per il TSPO come i derivati indolilgliossilamidici (IND-18, K_i=0.37 nM) mantenendo comunque la dialchilazione dell'amide, elemento centrale nell'interazione con le tasche lipofile del recettore²⁶⁹.



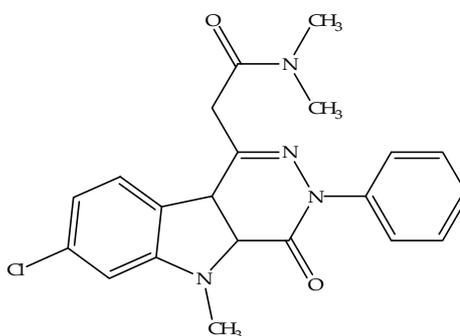
Struttura generale dei derivati 2-arylindol-3-acetamidici:
FGIN-1-27 (R1=R2= n-C6H13; R3=F)



Struttura generale dei derivati N, N-Dialchil-2-fenilindolilgliossilamidici:
IND-18 (R1=R2= n-C6H13; R3=F; R4=H)

In particolare un derivato di questa classe di composti, il 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-diidro-4H-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamide o SSR180575, si è rivelato estremamente interessante per la grande capacità di attraversare la barriera ematoencefalica; in vivo stimola la sintesi di neurosteroidi e si è mostrato capace di ridurre la neurodegenerazione e il danno da ischemia-riperfusion in numerosi modelli sperimentali²⁷⁰.

I derivati indolacetamidici sono molecole altamente lipofile e questo rende discutibile la loro idoneità come ligandi TSPO¹⁶².



SSR 180575

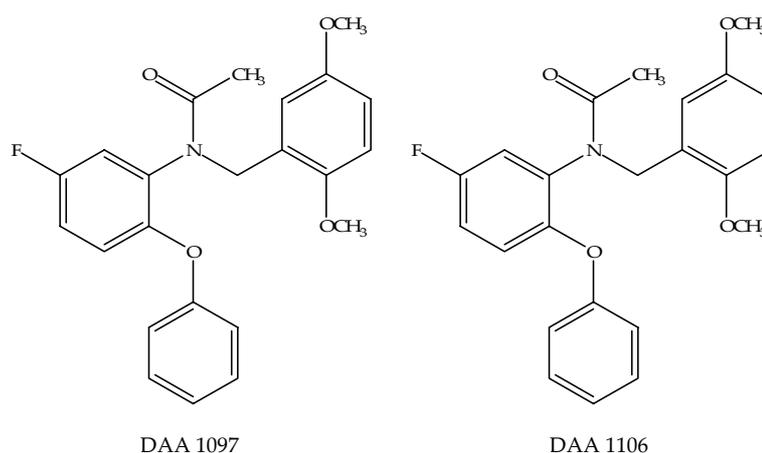
▪ Derivati fenossifenil-acetamidici

Dall'apertura dell'anello diazepinico del Ro5-4864 derivano i composti appartenenti a questa classe: l'N-(4-cloro-2-fenossifenil)-N-(2-isoprossibenzil)-acetamide (DAA1097) e l'N-(2,5-dimetossibenzil)-

N-(5-fluoro-2-fenossifenil)-acetamide (DAA1106).

Tali composti sono selettivi e potenti ligandi del TSPO, presentano un'affinità e una lipofilia maggiore rispetto a PK11195, e i loro metaboliti sono inattivi^{247,271}.

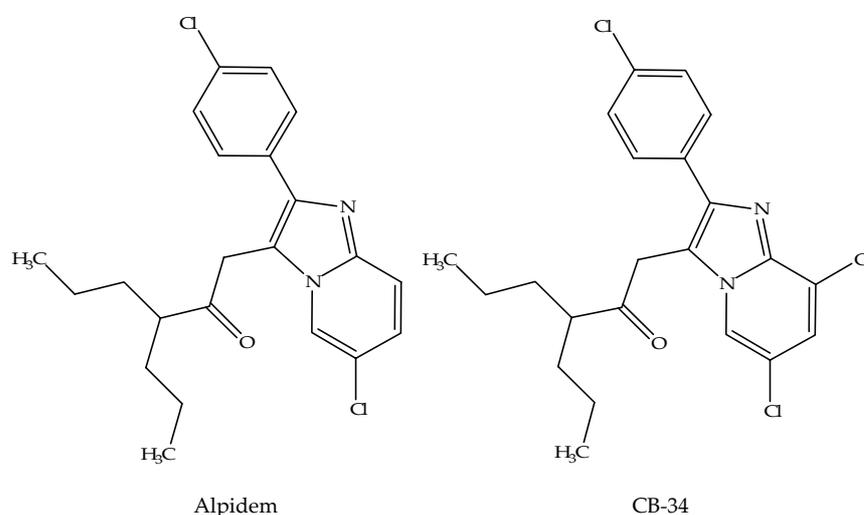
Sebbene entrambi esplicano una potente azione ansiolitica in animali da esperimento, sulla steroidogenesi mostrano effetti opposti: mentre DAA1097 promuove un aumento di pregnenolone in cellule tumorali di Leyding MA-10, DAA1106 non ha effetti e, anzi, sembra parzialmente inibire l'effetto del suo analogo. Questo potrebbe essere messo in relazione all'attività intrinseca differente tra i due, agonista e antagonista competitivo rispettivamente. Inoltre la capacità di entrambi i composti di spostare il legame del PK11195 a concentrazioni nanomolari suggerisce che queste due classi di composti hanno un dominio di legame comune, infatti confrontandoli con un modello tridimensionale del PK11195 essi, pur presentando regioni molecolari simili, sono strutturalmente diversi; da qui nasce l'ipotesi tutta da indagare di un'interazione con siti aggiuntivi del recettore. Per tali ragioni questi composti rappresentano ottimi strumenti per investigare più a fondo la struttura e l'esatto significato funzionale del TSPO²⁷²



▪ Derivati imidazopiridinici

L'Alpidem è il primo membro di questa classe a presentare un'affinità nanomolare sia per il CBR (1-28 nM) sia per il TSPO (0.5-7 nM). Tuttavia la mancanza di discriminazione ne ha fortemente limitato l'impiego per indagare le funzioni fisiologiche e farmacologiche del recettore. Nel 1997 Trapani *et al.* hanno sviluppato una serie di studi di SAR per cercare di indirizzare la selettività verso il recettore periferico. Modellati sullo scheletro 2-fenilimidazo[1,2-*a*]piridinico dell'Alpidem sono stati creati una serie di ligandi, nei quali la disostituzione delle posizioni 6 e 8 con vari gruppi funzionali (diCl, diBr, CF₃, CH₃) rappresenta l'elemento strutturale chiave nel promuovere la selettività verso il TSPO. Anche in questo caso la funzione acetamidica risulta fondamentale nell'interazione recettoriale. CB 34, CB 50 e CB 54 sono risultati i composti più attivi di questa serie. In particolare il CB 34 o N,N-di-n-propil-[2-(4-clorofenil)-6,8dicloroimidazo[1,2-*a*]-piridin-3-il]acetamide è risultato il più promettente a causa

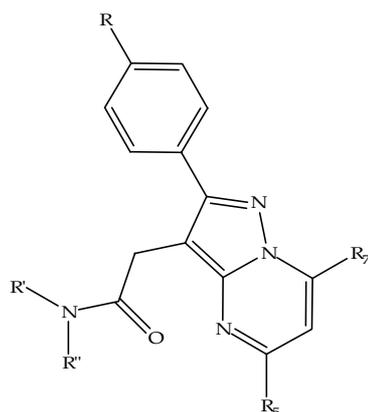
delle caratteristiche di selettività ed affinità (1.03 nM) ed è stato sottoposto ad un approfondito studio in vivo su roditori. Tale composto stimola la sintesi di neurosteroidi nel cervello di ratto e porta ad un marcato effetto anticonflitto nel Vogel test. Recenti studi che utilizzano come ligande marcato [³H]CB 34, hanno valutato lo spiazzamento di tale composto dal sito di legame usando i ligandi selettivi PK11195/Ro5-4864. Mentre PK11195 mostra un certo grado di spiazzamento per CB 34, Ro5-4864 ha evidenziato scarsa potenza nell'inibire l'interazione ligande-recettore. Ciò potrebbe avvalorare l'ipotesi di Papadopoulos *et al.* secondo cui esisterebbero almeno due diversi siti di legame o stati conformazionali diversi del recettore²⁷². Inoltre il suo derivato N,N-di-n-butilico nonostante un'alta affinità recettoriale non ha effetti sulla sintesi di steroidi, probabilmente a causa della sua natura di antagonista²⁷³.



▪ Derivati pirazolopirimidinici

Le pirazolopirimidine sono bioisosteri dei derivati imidazopiridinici che hanno nell'Alpidem il capostipite. Dato che sono le entità chimiche su cui si basa il nostro progetto di ricerca, le relazioni struttura attività di questa classe di composti saranno trattate in seguito. La loro alta affinità recettoriale (0.8-6.1 nM) e la capacità di alcuni di questi ligandi di stimolare la steroidogenesi in cellule di glioma C6 di topo con una potenza simile al PK11195, rende i derivati pirazolopirimidinici interessanti oggetti di indagine chimica e biologica.

Un potente ligande facente parte di questa serie, l'N,N-dietil-2-[2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-acetamide (DPA-713), mostra non avere effetti sulla steroidogenesi, evidenziando ancora una volta che per i ligandi al TSPO non c'è relazione diretta tra l'attività intrinseca e l'affinità recettoriale²⁷⁴.

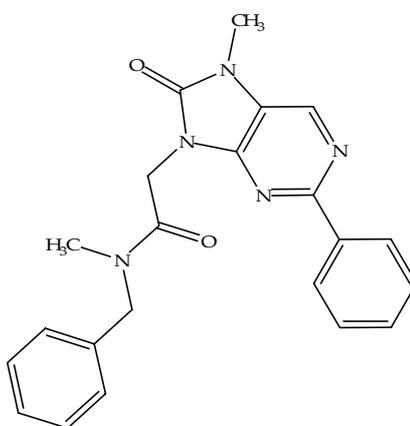


Struttura generale dei derivati pirazolopirimidinici

▪ Derivati 8-oxopurinici

Recentemente è stata sintetizzata una nuova molecola AC-5216 a struttura 8-oxopurinica che mostra elevata affinità e selettività per TSPO.

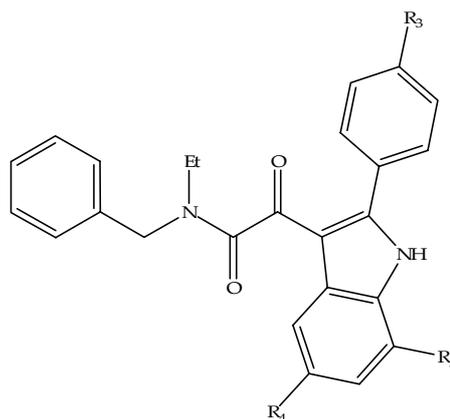
Su tale molecola è stato intrapreso uno studio *in vivo* e la sperimentazione su ratti mostra elevato effetto ansiolitico ed antidepressivo nel Vogel test, light/dark box test, e nel forced swimming test, antagonizzato da PK11195.



AC-5216

▪ Derivati N,N-Dialchil-2-fenilindol-3-il-gliossilamidici

Sono una nuova classe di ligandi del TSPO di cui l'N,N-Dialchil-fenilindol-3-il-gliossilamide rappresenta la struttura di base con possibili sostituzioni a R₃, R₄ e R₅. In uno studio recente, condotto da Da Settimo et al. (2008)²⁷⁵, tali composti si sono mostrati capaci di spiazzare [³H]PK11195 da membrane di rene di ratto con affinità nanomolare o subnanomolare. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che composti appartenenti a questa classe sono in grado di stimolare la steroidogenesi in modo simile o maggiore a PK11195 in cellule di glioma C6 di topo²⁷⁵.

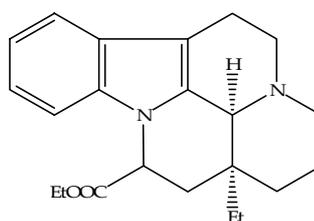


Struttura di base delle N,N-Dialchil-2-fenilindol-3-il-gliossilamide (il composto della serie con $R_3 = R_4 = \text{Cl}$; $R_5 = \text{H}$ presenta un profilo ansiolitico).

Il composto più attivo ($R_3, R_4 = \text{Cl}$) è capace di incrementare la sintesi di pregnenolone in maniera molto maggiore rispetto a PK11195 e presenta chiari effetti ansiolitici in studi su topi²⁷⁵. Studi di SAR condotti da Da Settimo *et al.* (2008)²⁷⁵ hanno mostrato un aumento di affinità per il TSPO quando R_3 è un sostituito elettron-attrattore, R_4 è un sostituito elettron-attrattore e di piccole dimensioni, mentre il sostituito R_5 modifica poco l'affinità al TSPO²⁷⁵. In generale, però, il farmacoforo proposto per questa classe di composti non differisce significativamente dal modello proposto da Sella *et al.*²⁷⁶ per il legame delle pirazolopirimidine al TSPO. A ciò si aggiunge il fatto che questa classe di composti ha intrinseche difficoltà farmacocinetiche e farmacodinamiche che rendono tali composti difficilmente utilizzabili come diagnostici PET.

▪ Alcaloidi della vinca

La Vinpocetina, identificata alla fine degli anni '60 ed introdotta in commercio nel 1978, è stata usata per lungo tempo nella prevenzione e nel trattamento di numerose patologie cerebrovascolari, come l'infarto acuto e cronico. Nonostante si sia rivelato un potente inibitore dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti e della fosfodiesterasi di tipo1 Ca^{2+} /calmodulina-dipendente (PDE-1), l'esatto meccanismo dell'azione neuroprotettiva è ancora oscuro. La Vinpocetina ha dimostrato una moderata affinità (0.2 μM) per il TSPO; tuttavia, a causa del grande numero di altri siti di legame cerebrali (recettori adrenergici α_{2B} e α_{2A} , canali del Na^+ e canali L del Ca^{2+}) non pare uno strumento ideale nello studio del TSPO²⁷⁷.



Vinpocetina

II.1.4- Modelli di interazione Ligande-Recettore

Non essendo nota la struttura del TSPO, sono state proposte alcune preliminari ipotesi di interazione tra i ligandi e la proteina recettrice e sono stati anche realizzati studi di modellistica molecolare al fine di valutare le possibili conformazioni attive nell'interazione recettoriale^{200,265,277-282}.

I modelli descritti prevedono la conoscenza degli elementi farmacoforici determinanti per il legame al sito recettoriale: infatti viene spesso evidenziata la formazione di un legame ad idrogeno tra il gruppo carbonilico, frequentemente appartenente ad un'amide terziaria, ed un residuo aminoacidico, accettore di elettroni, della proteina recettrice; inoltre risulta importante anche l'occupazione di più aree lipofile diverse per dimensione e disposizione spaziale.

Un interessante modello farmacoforico proposto da Bourguignon e Wermuth suggerisce per l'Alpidem, ligande non selettivo per il TSPO, la possibilità di interagire con i recettori benzodiazepinico periferico (TSPO) e centrale attraverso due differenti conformazioni risultanti rispettivamente dalla posizione planare e fuori dal piano del gruppo carbonilico. In questo modello si individuano come essenziali per l'interazione recettoriale un'area lipofila planare (PAR) e un'area lipofila a libera rotazione (FRA), dove si posizionerebbero rispettivamente il nucleo imidazopiridinico e l'anello fenilico dell'Alpidem, un donatore di legame ad idrogeno ($\delta 1$), che interagirebbe con il carbonile ed un'ulteriore area lipofila lineare (LA), dove si posizionerebbero i sostituenti della amide terziaria.

Anzini *et al.*²⁸¹ confermerebbero tale ipotesi attraverso l'irrigidimento, introdotto mediante un doppio legame tra il nucleo biciclico ed il raggruppamento amidico, che favorirebbe l'interazione soltanto con il TSPO.

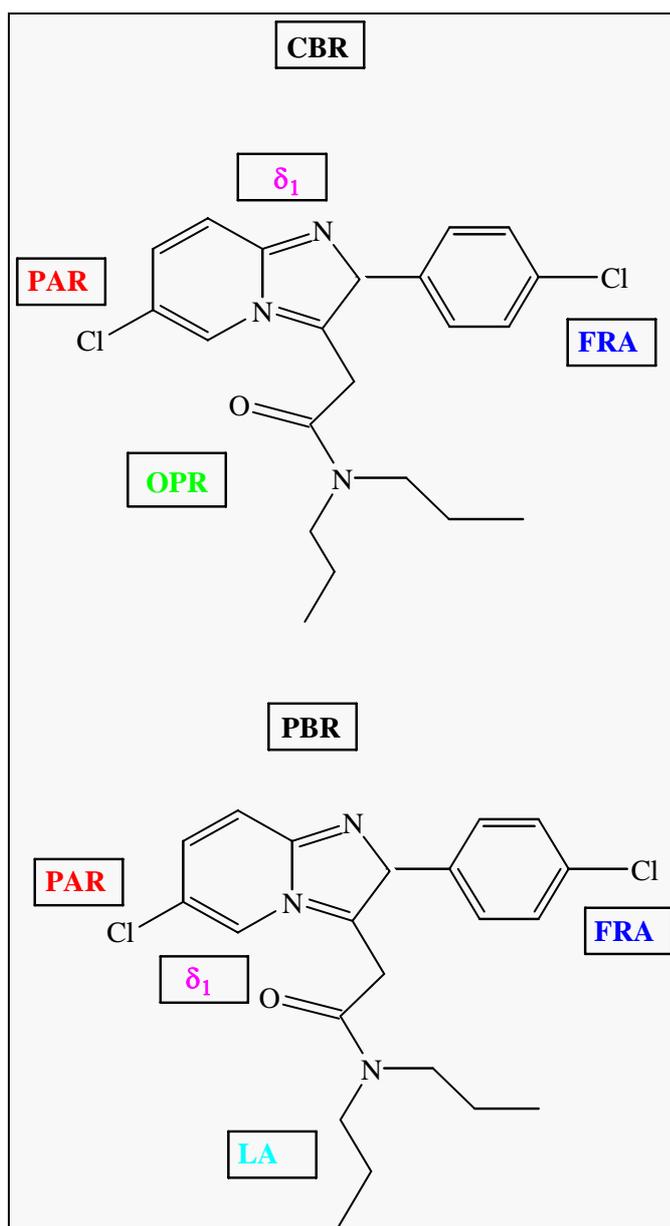


Fig. II.13 - Rappresentazione schematica del modello di interazione dell'Alpidem con CBR e PBR(TSPO); (FRA=freely rotating aromatic ring region, δ_1 =electron-rich zone, OPR=out-of-plane region, PAR=planar aromatic region, LA=lipophilic area)²⁸¹.

Nello stesso periodo Campiani *et al.*²⁰⁰ hanno approfondito lo studio del sito recettoriale rinominando gli elementi farmacoforici (PAR/FRA=L1/L3; δ_1 =H1; LA=L4) e proponendo delle possibili distanze tra loro: il sito H1 risulterebbe localizzato a circa 2 Å rispetto all'ossigeno coinvolto nell'interazione, a 6.0-6.5 Å dall'area lipofila L1 ed a 7.8-8.2 Å dall'area lipofila L3.

Attraverso uno studio di modellistica molecolare (MOPAC AM1), Cappelli *et al.*²⁸² hanno osservato che ligandi affini e selettivi al TSPO, analoghi del PK11195, presentano un angolo ϕ (angolo diedro tra il piano individuato dal nucleo ed il piano del gruppo carbonilico) compreso in un intervallo tra 80° e 110°, quindi il gruppo carbonilico e la struttura biciclica risulterebbero quasi perpendicolari.

Recentemente un modello unico di interazione 3D è stato proposto per ligandi endogeni ed esogeni da Cinone *et al.*²⁸³: in questo modello si conferma la presenza di due regioni lipofile (L1 e L3), un gruppo polare (H2), che sarebbero elementi essenziali per l'interazione con il TSPO, e una regione lipofila (L4), contenente H2, che svolgerebbe un'azione modulatrice per il binding al recettore.

Infine in un lavoro piuttosto recente Anzini *et al.*²⁸⁴, studiando analoghi del PK11195 in particolare a struttura chinolinica, propongono alcune considerazioni di carattere generale sugli elementi farmacoforici essenziali per l'interazione con il TSPO. Risulterebbero importanti:

- 1) un carbonile o un dipolo posizionato e orientato opportunamente (posizione 2);
- 2) sostituenti lipofili inseriti direttamente o con interposizione di un legame amidico in posizione 2;
- 3) un sistema biciclico aromatico od eteroaromatico recante un anello fenilico a libera rotazione.

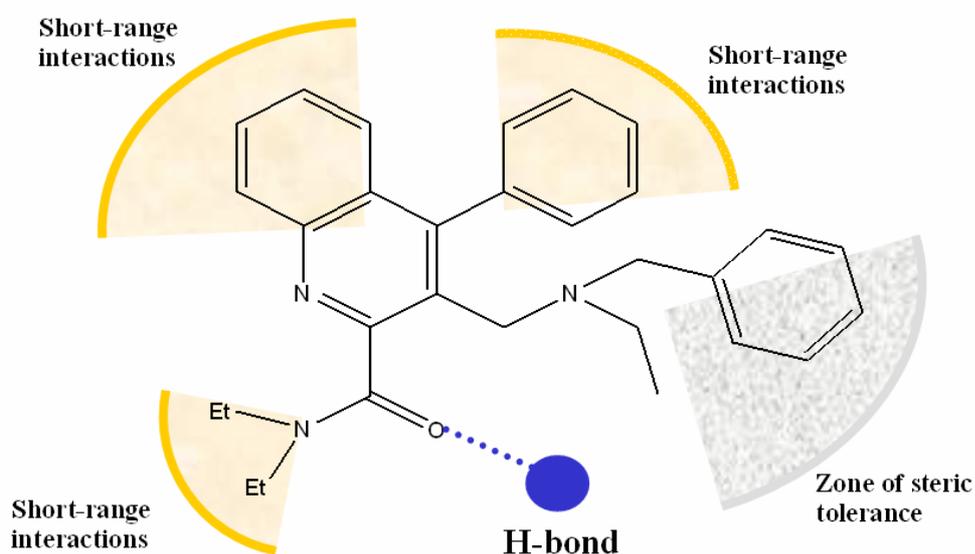


Fig. II.14- Modello di interazione recettoriale proposto da Anzini²⁸⁴.

Inoltre, indagando la posizione 3 del nucleo chinolinico, viene evidenziata l'esistenza di una nuova area di tolleranza sterica nel TSPO capace di accettare sostituenti anche molto ingombranti. In particolare sono state introdotte in tale posizione amine terziarie asimmetricamente sostituite e la possibilità di protonazione a pH fisiologico dell'azoto suggerisce l'ipotesi che tale cavità recettoriale possa tollerare sostituenti di grandi dimensioni ed anche carichi positivamente.

I derivati chinolinici, sintetizzati da Anzini *et al.*²⁸⁴ e recanti in posizione 3 una funzione aminica, costituiscono un'importante serie di ligandi per il TSPO in considerazione della loro solubilità in acqua, che può permettere nuovi approcci farmacocinetici.

Sulla base dei risultati ottenuti tramite gli studi di mappatura recettoriale condotti da Anzini, sono stati inoltre identificati alcuni aminoacidi costituenti il sito di legame del TSPO: la Ser 41 potrebbe interagire con il gruppo carbonilico in posizione 2, comportandosi da donatore di legame ad idrogeno,

il Trp 42 e la Leu 31 interagirebbero rispettivamente con l'anello fenilico ed il nucleo chinolinico; infine il Trp 107 e il Trp 161 sembrano essere coinvolti nell'interazione con i gruppi idrofobici presenti in posizione 2 e 3.

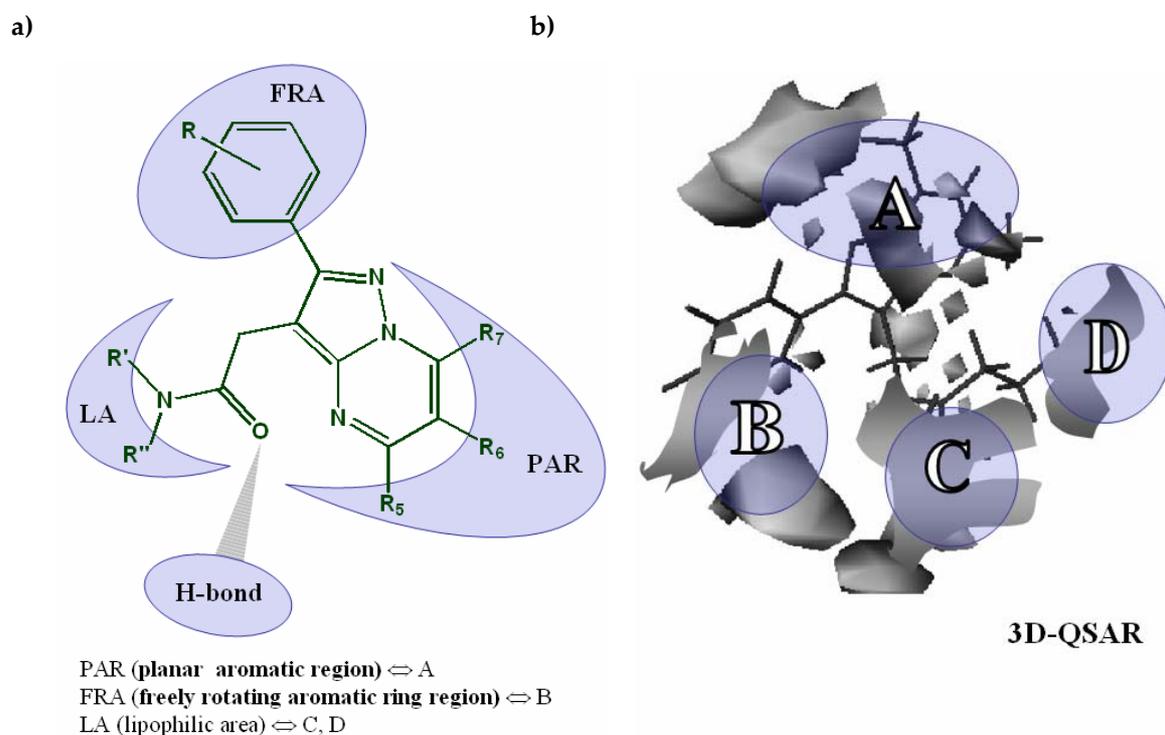


Fig. II.15- (a) Modello farmacoforico di interazione per i derivati pirazolo[1,5-a]pirimidinici adattato al modello proposto da Anzini²⁸⁴; (b) modello 3D-QSAR proposto da Sellerie *et al*²⁷⁶.

II.1.4- Positron Emission Tomography: nuova tecnica di imaging per diagnosi e prognosi di numerose patologie

La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una nuova tecnica di imaging che sta assumendo un'importanza sempre maggiore sia nell'ambito clinico che in quello sperimentale. A differenza di altre metodologie diagnostiche tradizionali, come la tomografia assiale computerizzata a raggi X (TAC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN), le quali forniscono immagini principalmente "morfologiche", con la PET si ottengono immagini "funzionali", che permettono cioè di evidenziare alterazioni a livello biologico molecolare. Poiché i cambiamenti funzionali si manifestano prima delle alterazioni della struttura, la PET ha il vantaggio di consentire una diagnosi più veloce, in particolare per alcune forme di tumore.

La PET si basa sulla ricezione di positroni emessi durante il decadimento di un radionuclide iniettato nel paziente.

La procedura inizia con l'iniezione (generalmente per via endovenosa) nel soggetto da esaminare, di un isotopo tracciante di breve vita media, legato chimicamente ad una molecola attiva a livello metabolico (spesso uno zucchero). Dopo un intervallo di tempo necessario alla sostanza per raggiungere concentrazioni efficaci all'interno dei tessuti da analizzare, il soggetto viene posizionato nello scanner. L'isotopo decade, emettendo un positrone (antimateria dell'elettrone, avente la stessa massa di $511 \text{ keV}/c^2$, ma carica positiva) che, dopo un percorso che può raggiungere al massimo un paio di millimetri, durante il quale dissipa la maggior parte della sua energia cinetica, si annichila con un elettrone, producendo una coppia di fotoni (di energia paragonabile a quella dei raggi γ), emessi in direzione opposta tra loro. Queste annichilazioni si producono diverse migliaia di volte al secondo nel corso dell'esame.

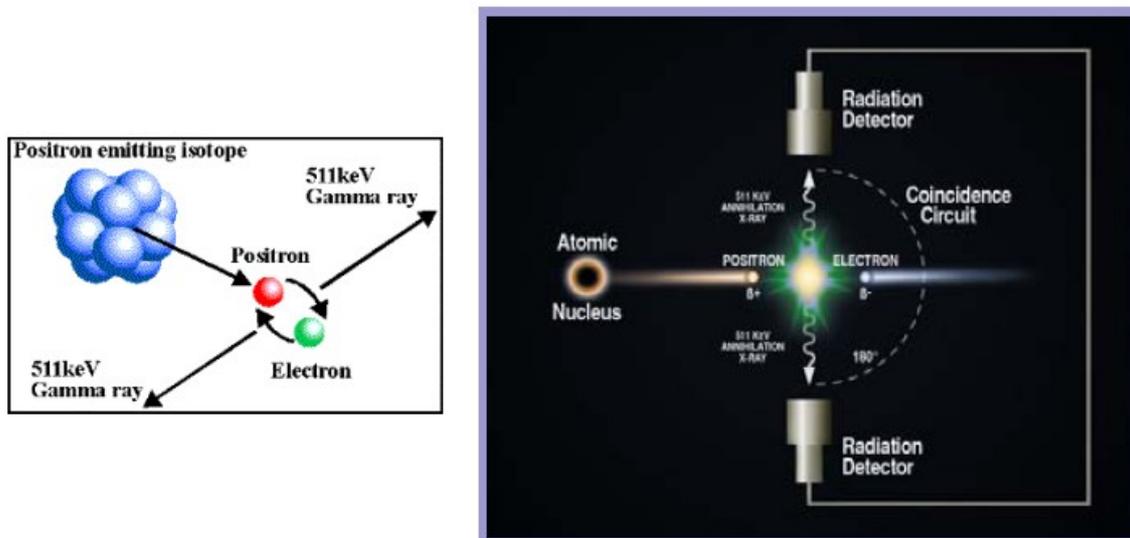


Fig. II.16- Reazione di annichilazione ed emissione di positroni

Una serie di rivelatori disposti a corona intorno al paziente, sono in grado di registrare questi impatti catturando i fotoni opposti emessi durante le annichilazioni e trasformandoli in segnali elettrici. Un calcolatore riceve queste informazioni e calcola la posizione dell'impatto. Con questi dati ricostruisce poi delle immagini in due o tre dimensioni della zona analizzata. Il detector è costituito da una serie di cristalli curvi costituiti da materiale scintillante (il più comune è NaI), giustapposti a formare un cilindro (scintillatore), e una serie di tubi fotomoltiplicatori, atti ad amplificare i segnali luminosi i quali verranno poi processati tramite un'analisi statistica computerizzata. Punto cruciale di tale tecnica è la rivelazione simultanea di una coppia di fotoni: i fotoni che non raggiungono il rivelatore in coppia, entro un intervallo di tempo di pochi nanosecondi, non sono presi in considerazione. Dalla misurazione della posizione in cui i fotoni colpiscono il rivelatore, si può ricostruire la posizione del corpo da cui sono stati emessi. Lo scanner utilizza la rilevazione delle coppie di fotoni per mappare la

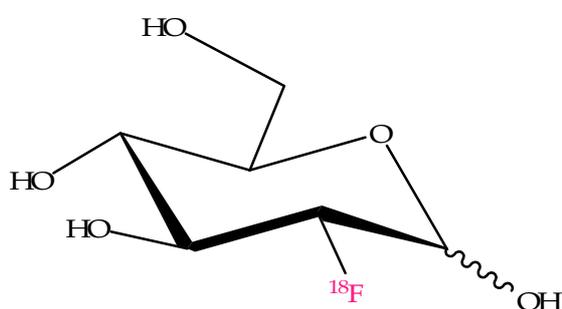
densità dell'isotopo nel corpo, e la mappatura risultante rappresenta tridimensionalmente i tessuti in cui la molecola campione si è concentrata maggiormente e viene letta ed interpretata da uno specialista in medicina nucleare²⁸⁵. Frequentemente le scansioni PET sono integrate con quelle RMN fornendo informazioni sia metaboliche sia anatomiche. Recentemente nuovi apparecchi all'avanguardia effettuano la cosiddetta TAC-PET, che permette di sovrapporre i risultati riguardanti la forma e l'anatomia degli organi forniti dalla TAC con quelli sul funzionamento delle cellule provenienti dalla PET.

I radionuclidi utilizzati nella scansione PET sono generalmente isotopi con breve tempo di emivita, come ^{11}C (20 minuti), ^{13}N (10 minuti) e ^{18}F (120 min), i quali vengono incorporati in molecole biologicamente attive.

La sostanza radiomarcata di maggiore impiego è il 2-deossi-2-[^{18}F]-fluoro-D-glucosio (FDG), un analogo del glucosio che viene assunto dalle cellule in maniera competitiva rispetto al 2-deossiglucosio.

Tale composto, per la prima volta descritto nel 1978²⁸⁶, una volta entrato nella cellula, viene fosforilato dall'enzima esochinasi presente sulla membrana mitocondriale esterna. Inoltre, essendo un analogo del glucosio con un fluoro al posto di un ossigeno, tale molecola non può essere metabolicamente trasformata dalla cellula ed è quindi "intrappolata" all'interno di essa (con l'eccezione di quei tessuti, come il fegato e il rene, in grado di defosforilare gli zuccheri, grazie a specifiche fosfatasi).

Altri radiotraccianti utilizzati nella PET sono, ad esempio, $^{15}\text{O}_2$ (utilizzato nella neuroinfiammazione), ^{11}C -metionina (utilizzabile nei tumori cerebrali ma non nelle infiammazioni), aminoacidi sintetici marcati con ^{11}C e ^{18}F (si sfrutta l'aumentata velocità di trasporto transmembrana degli aminoacidi nelle cellule tumorali), ^{18}F -estradiolo (nei tumori endocrini), ^{18}F -Timidina, ^{18}F e ^{11}C -colina. Tali radiotraccianti, tuttavia, non presentano grossi vantaggi rispetto all'FDG.



2-[^{18}F]fluoro-2-deossi-D-glucosio ([^{18}F] FDG)

Fig. II.17- Radiotracciante comunemente usato per la scansione PET.

I radioisotopi vengono prodotti da un ciclotrone, una macchina che, utilizzando una corrente alternata ad alta frequenza ed alta tensione, in associazione con un campo magnetico perpendicolare, è in grado di accelerare fasci di particelle elettricamente cariche le quali vengono poi inviate su un bersaglio che, a causa dell'urto, produce atomi radioattivi poi utilizzati per la sintesi di radiofarmaci ad uso clinico.

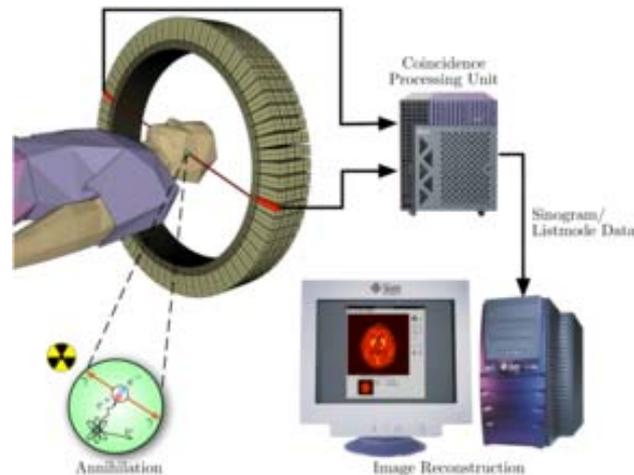


Fig. II.18- Schema di un processo di acquisizione PET.

Sebbene la PET rappresenti una tecnica di imaging estremamente efficace ad altissima risoluzione e sensibilità, i principali limiti consistono nel costo dell'apparecchiatura e nella possibile pericolosità associata all'uso di materiale comunque radioattivo.

Ciononostante la PET ad oggi sembra rappresentare il futuro della diagnostica e, grazie alla grande versatilità, la sua applicazione si sta estendendo in vari settori medico-scientifici sia nella ricerca che nella clinica:

- **Oncologia**

Quello oncologico è sicuramente l'ambito in cui tale tecnica è ad oggi maggiormente impiegata (74% delle applicazioni). Il tracciante ^{18}F -FDG viene utilizzato nella rivelazione e nella precisa localizzazione di numerosi tumori e metastasi, soprattutto in considerazione del fatto che le cellule neoplastiche hanno una maggiore richiesta di glucosio rispetto a quelle sane, portando quindi ad una concentrazione selettiva del composto nelle aree interessate²⁴⁶. Tale tecnica, in molti casi, è capace di caratterizzare il tipo di neoplasia, in base alle richieste metaboliche delle cellule trasformate, e discriminare tra tumori benigni e maligni, più o meno aggressivi, proponendosi come alternativa non invasiva alla biopsia²⁸⁷. Inoltre la PET è impiegata per monitorare la risposta del paziente ad una determinata chemioterapia ed ultimamente anche per incrementare la selettività della terapia radiante²⁸⁸. Come detto in precedenza, sono numerosi i lavori in cui viene studiato l'utilizzo di ligandi

al TSPO radiomarcato per permettere la ritenzione selettiva del radioisotopo nelle cellule tumorali in cui la proteina è sovraespressa. E' auspicabile quindi in futuro l'impiego di radiotraccianti affini al TSPO per scansioni PET al fine di ricavare maggiori informazioni rispetto al noto ^{18}F -FDG.

▪ Neurodegenerazione

La neuroimaging mediante scansione PET si basa sull'assunzione che molte patologie neurodegenerative come l'Alzheimer sono associate ad una minore funzionalità metabolica (in termini di ossigeno e glucosio) dell'area interessata²⁸⁹. Per tale ragione vengono impiegati $^{15}\text{O}_2$, che però presenta il limite di una brevissima emivita (2 minuti), per valutare il flusso sanguigno nelle varie aree cerebrali, o ^{18}F -FDG, per ricavare informazioni metaboliche e funzionali. Vari studi hanno dimostrato la capacità della PET di discriminare in maniera precoce tra i vari sottotipi di demenza, correlati o meno allo sviluppo dell'AD²⁹⁰. Inoltre sono riportati studi di scansione PET integrata con le tradizionali tecniche diagnostiche (TAC e NMR) per individuare, sia da un punto di vista anatomico che fisiologico, il focus epilettogenico nei casi di epilessia refrattaria²⁹¹.

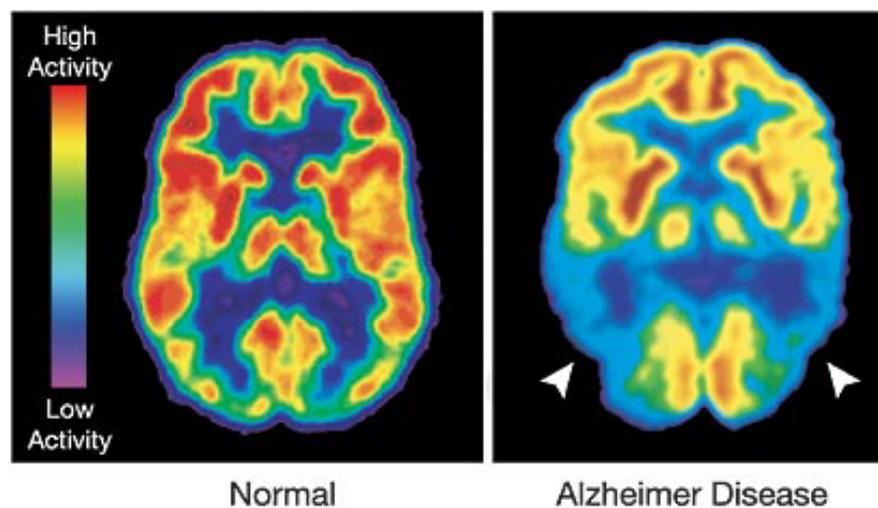


Fig. II.19- Neuroimaging PET mediante ^{18}F -FDG di un paziente affetto da AD.

Poiché il TSPO è solo modestamente espresso nel parenchima cerebrale sano ma risulta drammaticamente sovraespresso in caso di neuroinfiammazione come conseguenza dell'attivazione della microglia, l'utilizzo di ligandi TSPO radiomarcato può essere utile nella localizzazione selettiva e nella caratterizzazione funzionale, sia in termini diagnostici sia prognostici, delle zone cerebrali colpite dal processo neurodegenerativo. Il ligando al TSPO radiomarcato ^{11}C -PK11195 è stato ampiamente usato per la neuroimaging PET in caso di patologie neuroinfiammatorie. L'utilizzo di ^{11}C -PK11195 per la PET ha però mostrato dei limiti legati alle inadeguate proprietà farmacocinetiche del ligando, alla sua scarsa capacità di penetrazione nel tessuto nervoso e alla presenza di un elevato numero di siti di

legame aspecifici. In aggiunta a questi inconvenienti la breve vita media del ^{11}C (20.4 min) rende il ^{11}C -PK11195 poco adeguato all'utilizzo clinico, infatti per la più lunga vita media si preferisce usare il ^{18}F (109.8 min). Negli ultimi anni la ricerca di ligandi alternativi al ^{11}C -PK11195 ha avuto una grande espansione e più di 40 nuovi composti sono stati valutati in studi sperimentali di imaging. Tuttavia, però, la variabilità dei protocolli sperimentali e dei modelli animali di neuroinfiammazione impedisce un confronto obiettivo di questi radioligandi alternativi. I nuovi radioligandi vengono confrontati con ^{11}C -PK11195 in modelli animali simili.

Recentemente studi di radiomarcatura dei ligandi e sperimentazione in vivo su ratti, babuini e umani (sperimentazione in fase clinica) sono condotti presso il dipartimento di Farmacologia dell'Università di Sidney dal gruppo di ricerca del Prof. Kassiou²⁹². Due nuovi radioligandi [^{11}C]DPA-713 ($k_i = 4.7\text{nm}$) e [^{18}F]DPA-714 ($k_i = 7\text{nm}$), entrambi appartenenti alla classe delle pirazolopirimidine, sono stati comparati con ^{11}C -PK11195 *in vitro* (autoradiografia) e *in vivo* (imaging) in un modello di neuroinfiammazione di roditore e babuino. Da tale studio è emerso che [^{18}F]DPA-714 rappresenta un'ottima alternativa a ^{11}C -PK11195 per la sua maggiore capacità di penetrazione nel tessuto nervoso, per la sua specificità per il TSPO ma anche per le sue interessanti proprietà di biodistribuzione nei primati²⁹². Oggi soltanto il 9% delle applicazioni della PET riguarda la neurologia, campo in cui i radiotraccianti potrebbero trovare, in futuro, ampio spazio d'impiego se ben progettati.

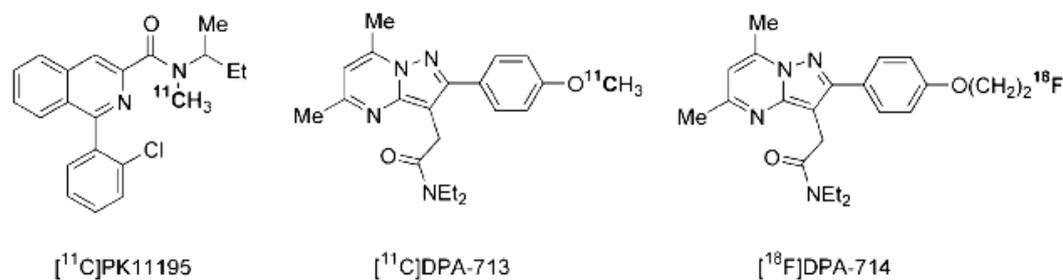


Fig. II.20- Struttura chimica di radioligandi al TSPO valutati in neuroimaging PET²⁹².

▪ Neuropsicofarmacologia

In tale settore l'applicazione della PET riveste attualmente solo un'importanza sperimentale. Infatti sono stati sviluppati neurotrasmettitori (dopamina, serotonina, acetilcolina) e farmaci radiomarcati, per specifici sottotipi recettoriali o substrati proteici, al fine di indagare le implicazioni biochimiche che stanno alla base di numerosi processi sia fisiologici che patologici. Sono stati condotti numerosi studi in cui, mediante scansione PET, veniva esaminato lo stato funzionale dei più comuni sistemi recettoriali in pazienti affetti da schizofrenia, depressione e disturbo bipolare rispetto a controlli sani, al fine di approfondire la conoscenza circa le alterazioni, al giorno d'oggi non completamente chiare, coinvolte in queste patologie²⁹³.

- **Farmacologia**

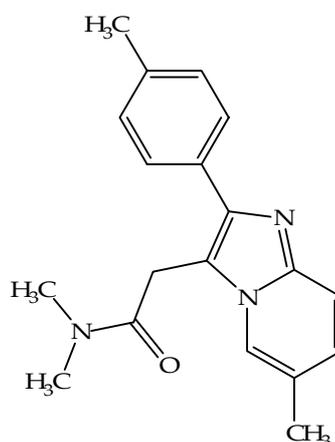
La PET è potenzialmente un ottimo strumento per visualizzare con estrema accuratezza e rapidità le caratteristiche farmacocinetiche (assorbimento, distribuzione, eliminazione) di un farmaco in fase di sperimentazione. Inoltre, dal punto di vista farmacodinamico, si possono analizzare anche i vari siti di azione del farmaco, utilizzando indirettamente studi di competizione con agenti radiomarcanti dal meccanismo d'azione noto e valutarne lo spiazzamento con il composto non marcato da studiare²⁹³.

Concludendo, i vantaggi nell'impiego di ligandi TSPO nella PET rispetto al FDG sono legati al fatto che il principale limite all'utilizzo della FDG-PET è rappresentato dal numero non trascurabile di falsi positivi²⁹⁴, soprattutto nella diagnosi di patologie oncologiche, dovuto alla non specificità dell' FDG. Infatti oltre agli organi e ai tessuti in cui l'up-take di glucosio è fisiologico (il glucosio tende ad accumularsi nel cervello, fegato, muscoli e tessuto adiposo) ci sono diverse cause che possono portare a falsi positivi. L'up-take di glucosio, infatti, aumenta in caso di malattie infettive; per esempio, un incremento dell'up-take di FDG nel polmone e nel mediastino potrebbe essere dovuto a tubercolosi o sarcoidosi e non necessariamente a neoplasia. Inoltre l'intenso up-take in alcuni muscoli o a livello delle inserzioni del muscolo potrebbe mimare metastasi ossee o dei tessuti molli. L'accumulo di FDG è frequentemente osservato nella vescica, nei muscoli della testa e del collo e, a volte, anche nel diaframma e ciò può essere causa di falsi positivi²⁹⁴. Un ulteriore limite è rappresentato dalla scarsa visualizzazione dei tumori cerebrali e dal fatto che l'up-take di ¹⁸F-FDG non presenta correlazioni con la velocità di crescita tumorale. Alla luce di tali limiti nella diagnosi attraverso FDG-PET è auspicabile l'utilizzo di ligandi al TSPO per le indagini PET considerando la grande specificità della sua sovraespressione in caso di neoplasie e malattie neuroinfiammatorie.

II.2- Progetto della Ricerca

Il progetto di ricerca oggetto della seconda parte di questa tesi, ossia la sintesi di nuovi ligandi al TSPO, si inserisce in un ampio studio, da tempo intrapreso dal gruppo del Prof. Bruni, sulle relazioni struttura-attività di ligandi al recettore benzodiazepinico periferico (PBR o TSPO)*. La sintesi di nuovi ligandi al TSPO ha avuto inizio dall'Alpidem (ansiolitico ma non sedativo) e, dall'attenta analisi delle variazioni apportate alla sua struttura, è stata progettata la realizzazione di derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici come nuovi ligandi a tale recettore. La formulazione di questo progetto di ricerca è sorta da un'accurato studio delle relazioni struttura-attività, non solo dei ligandi selettivi al PBR, ma anche di quelli non selettivi ed affini anche al CBR. Sono state quindi apportate modifiche alle strutture imidazopiridiniche dell'Alpidem e dello Zolpidem. L'Alpidem ha elevata affinità per il PBR ($K_i=0,5-7nM$), ma anche per il CBR ($K_i=1-28nM$); lo Zolpidem, usato in terapia come ipnotico-sedativo, è un ligande selettivo per il sottotipo recettoriale contenente la subunità α_1 ($\alpha_1\beta_2\gamma_2/GABA_A$); anche lo Zaleplon è un ipnotico-sedativo che presenta struttura pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica ed è selettivo per la subunità α_1 .

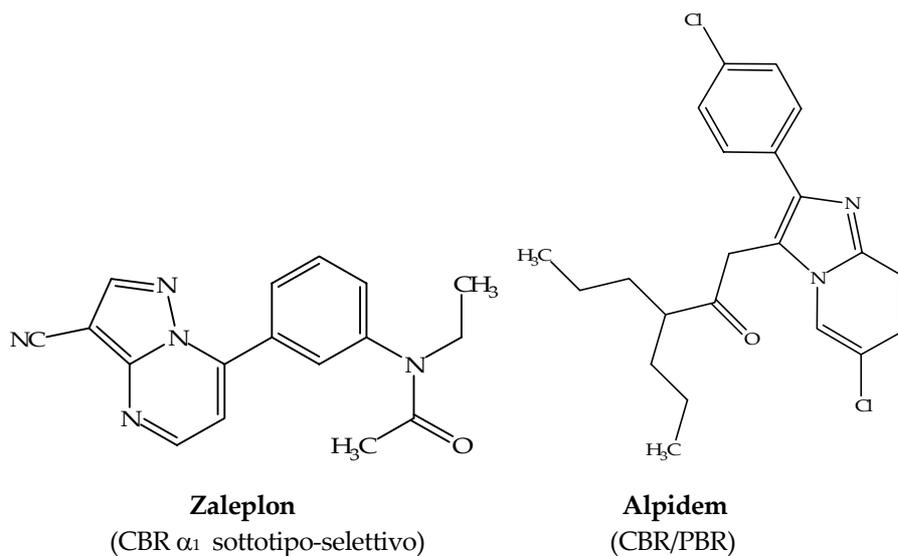
Le tre molecole sono caratterizzate dalla presenza di un nucleo biciclico azotato su cui è inserito un anello aromatico a libera rotazione ed un raggruppamento amidico terziario.



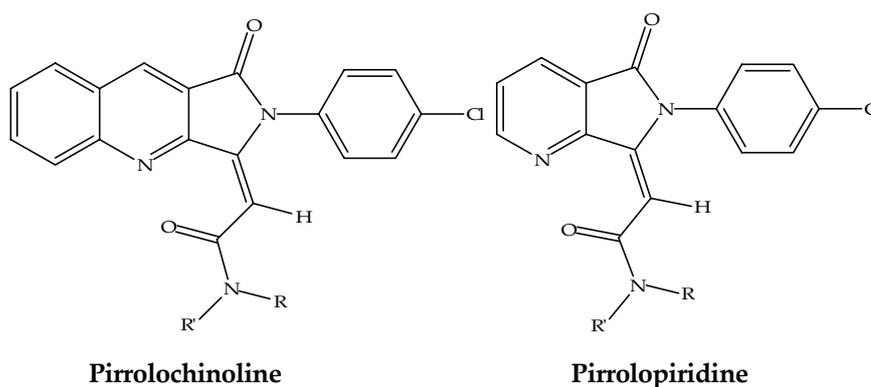
Zolpidem

(CBR α_1 sottotipo selettivo)

*La dizione "PBR" può intendersi anche "TSPO", non risultando, allo stato attuale delle conoscenze, differenze strutturali tra le due accezioni del recettore ed essendo l'ultima più recente e approvata dal HUGO Gene Nomenclature Committee¹³³.

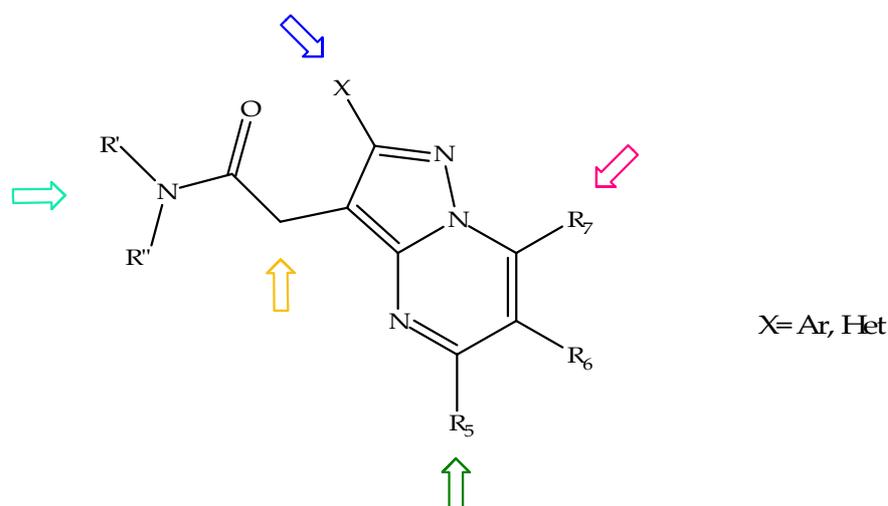


Negli anni '90 numerosi lavori hanno contribuito, usando l'Alpidem come "lead compound", alla sintesi di nuovi ligandi selettivi per il PBR. Kozikowski *et al.* hanno realizzato la sintesi della serie FGIN-1 (derivati indolacetamidici)^{128,295}, Anzini *et al.* quella di derivati pirrolopiridinici e pirrolochinolinici²⁸¹.



Trapani *et al.*^{273,296} hanno apportato modifiche al nucleo imidazo[1,2-*a*]piridinico dell'Alpidem dimostrando che l'introduzione di opportuni sostituenti sulla porzione pirimidinica sposta la selettività a favore del PBR, rispetto al CBR.

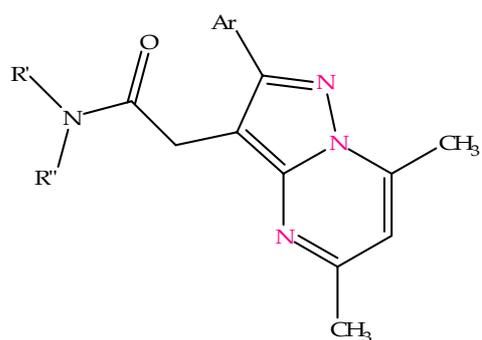
Da qui l'idea di introdurre opportuni sostituenti sul nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico, scaffold già noto per ligandi CBR α_1 selettivi, per la sintesi di nuovi ligandi selettivi per il PBR a struttura N,N-dialchil (2-arilpirazolo[1,5-*a*]pirimidinico-3-il) acetamidica.



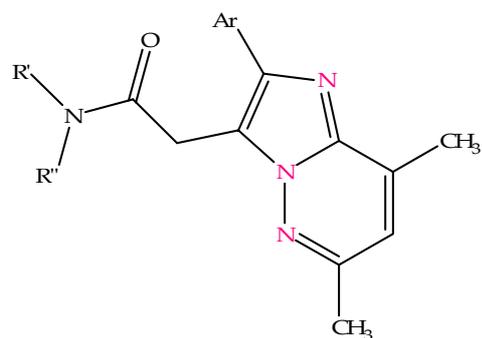
Su questa struttura di base sono state realizzate varie modifiche al fine di indagare sui requisiti strutturali favorevoli per l'interazione recettoriale. Il progetto che costituisce l'argomento della tesi riguarda l'introduzione di modifiche alla struttura N,N-dialchil (2-arilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il) acetamidica rispettivamente a livello dell'arile in posizione 2 e della catena acetamidica in posizione 3. Si è inoltre pensato che le strutture recanti un doppio legame in 3 potessero presentare maggiore selettività rispetto a quelle sintetizzate precedentemente con la semplice catena acetamidica.

Poiché è stato visto che opportuni sostituenti sulle posizioni 5,7 sembrano essere determinanti nell'indirizzare la selettività TSPO (PBR) *vs* CBR, sono state apportate nuove modifiche in questa porzione del nucleo pirazolopirimidinico, sintetizzando ligandi che presentano gruppi metilici o trifluorometilici nelle posizioni 5 e 7, al fine di chiarire i requisiti necessari ad incrementare l'affinità e la selettività verso il TSPO. In particolare si è cercato di investigare sul ruolo del fluoro, introdotto in posizioni chiave dello scaffold molecolare, per quanto riguarda sia l'affinità ligande-recettore che la putativa attività intrinseca dei ligandi.

Infine, il lavoro realizzato nel laboratorio del Prof. Kassiou presso la School of Chemistry (University of Sydney, Australia), si colloca nello specifico progetto di ricerca di ligandi PBR, fluorurati e non a nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il-acetamidico e analoghi azotati (imidazo[1,2-*b*]piridazinico), con l'intento di essere marcati successivamente (¹¹C, ¹⁸F, ¹³N) ed impiegati come biomarkers in scansioni di Positron Emission Tomography (PET)^{292,297-300}. Infatti il PBR risulta essere sovraespresso in modo quantitativo rispetto alla stadiazione di numerose patologie tumorali, neurodegenerative e infiammatorie croniche (lupus eritematosus, artrite reumatoide); i recenti studi sull'applicazione della PET mediante ligandi PBR[¹¹C]radiomarcanti hanno mostrato una estrema sensibilità e risoluzione nell'individuare le aree patologiche interessate^{289,291,301,302}. L'unica limitazione appare essere il breve tempo di emivita del radioisotopo ¹¹C e quindi a tale proposito la nostra ricerca si è diretta alla sintesi di ligandi PBR marcati con ¹⁸F, che presenta un maggiore tempo di dimezzamento utile a scansioni PET più accurate²⁸⁸.



Ligandi a nucleo
pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il-acetamidico



Ligandi a nucleo
imidazo[1,2-*b*]piridazinico-3-il-acetamidico

II.3- Parte Chimica

La sequenza sintetica per la realizzazione dei derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici recanti in 3 la catena N,N-dietilacetamidica ha previsto 5 passaggi:

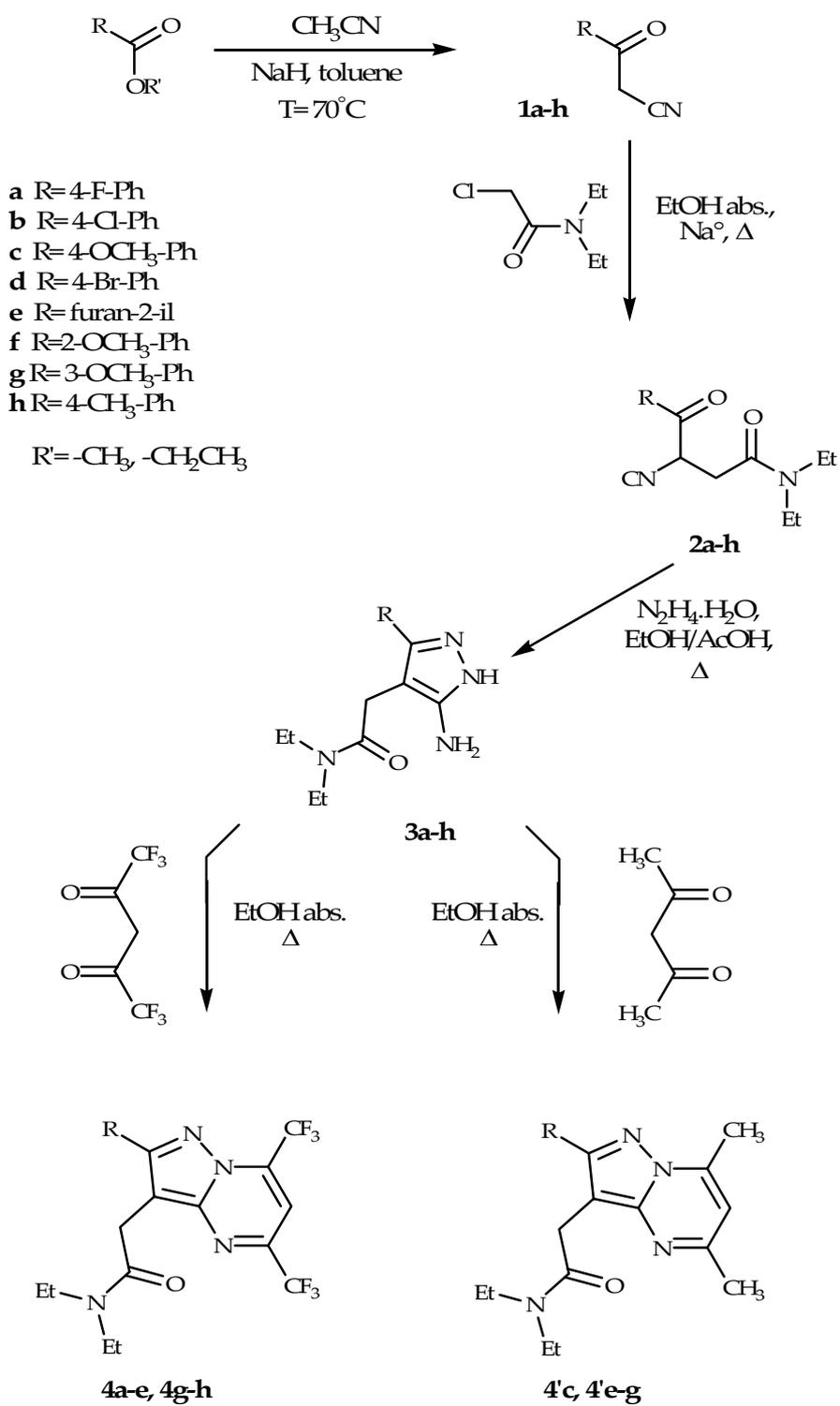
1. l'ottenimento dei derivati aroilacetoneitrilici mediante una condensazione di Claisen;
2. l'inserimento della catena acetamidica sugli opportuni aroilacetoneitrili;
3. la chiusura con idrazina monoidrata ad aminopirazoli;
4. la condensazione in etanolo con gli opportuni reagenti per la realizzazione del bicyclo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico.

Il primo step di questa sequenza sintetica prevede l'attacco nucleofilo dell'acetonitrile, opportunamente attivato da una base forte, sul carbonile estereo dei relativi metil- ed etil-benzoati, opportunamente sostituiti con formazione degli aroilacetoneitrili **1a-h** (Schema 1).

Successivamente si ottengono i composti **2a-h** da un ulteriore attacco nucleofilo degli aroil/eteroaroilacetoneitrili (**1a-h**) sul metilene elettrofilo della N,N-dietilcloroacetamide in ambiente basico (Schema 1). Le migliori condizioni di reazione per la sintesi di tali composti sono state ottenute utilizzando una soluzione alcolica di etilato sodico in quantità stechiometrica rispetto all'aroil/eteroaroilacetoneitrile di partenza e successivamente aggiungendo N,N-dietilcloroacetamide, anch'essa in rapporto stechiometrico. La reazione, step critico dell'intero procedimento sintetico, va avanti per molte ore e fornisce i prodotti attesi con scarse rese, sottoforma di oli in presenza di un elevato numero di impurezze. Successivamente i composti **2a-h** vengono fatti reagire con idrazina monoidrata in etanolo, in presenza di una quantità catalitica di acido acetico, con la conseguente chiusura a relativi aminopirazoli **3a-h**. I prodotti attesi sono ottenuti con buone rese ma richiedono, tuttavia, un'accurata purificazione tramite colonna cromatografica (Schema 1).

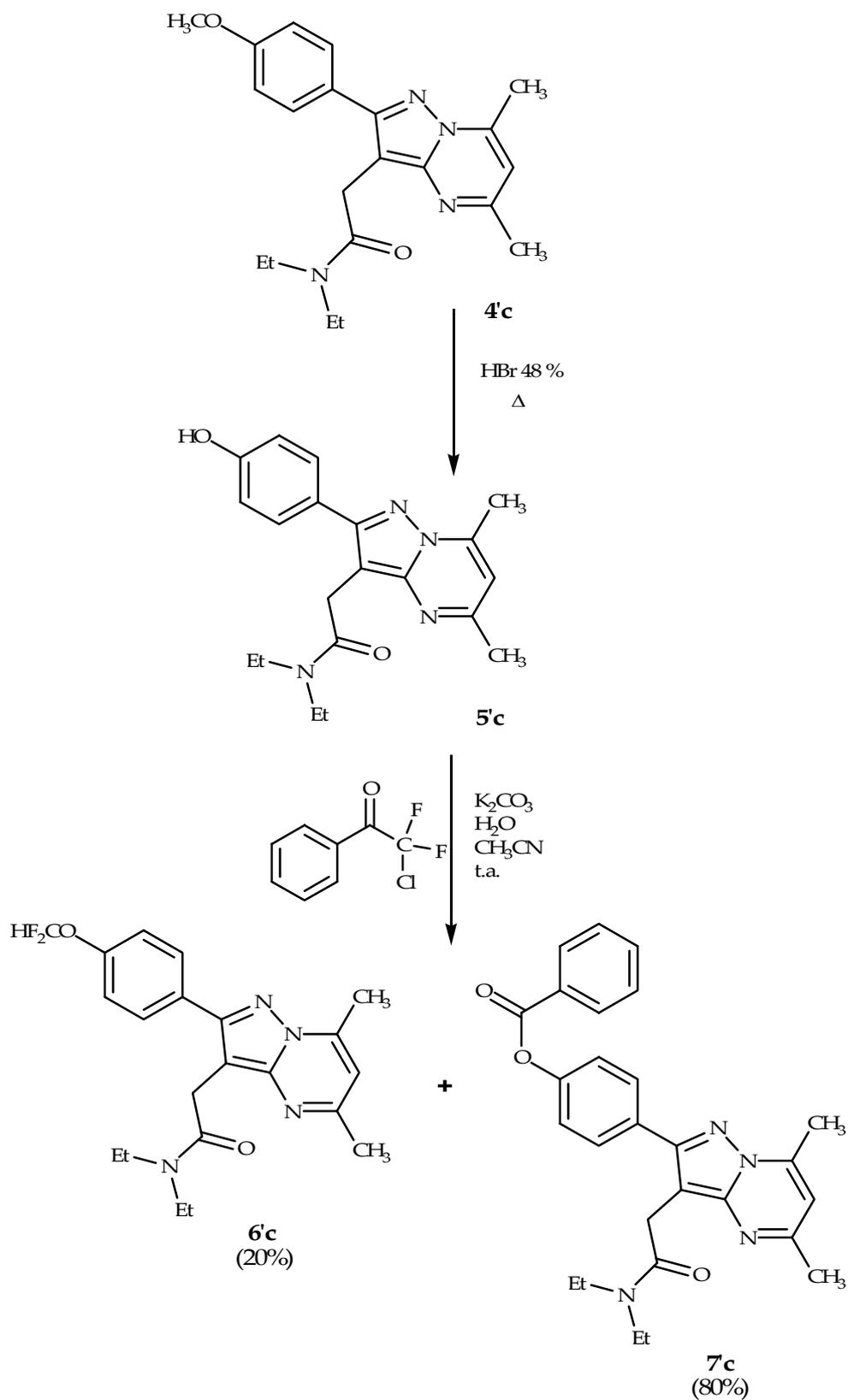
L'ultimo step del ciclo sintetico, infine, prevede la condensazione degli aminopirazoli ottenuti con derivati β -dichetonici in etanolo assoluto: in particolare i composti **3a-e** e **3g-h** vengono condensati con 1,1,1,5,5,5-esafuoropentan-2,4-dione per dare i derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidinici 5,7-ditri fluorometilati (**4a-e** e **4g-h**). Dagli aminopirazoli **3c**, **3e-g** si ottengono, invece, i prodotti **4'c**, **4'e-g** mediante condensazione con 2,4-pentandione. Entrambe le condensazioni procedono in tempi molto brevi e con buone rese; i prodotti finali solidi vengono isolati dall'ambiente di reazione e purificati tramite cromatografia su colonna (Schema 1).

Schema 1



Il composto **4c** è stato sottoposto ad una reazione di demetilazione condotta in ambiente acido (HBr 48%) a refluxo, ottenendo così il composto **5c** con una resa stechiometrica (Schema 2).

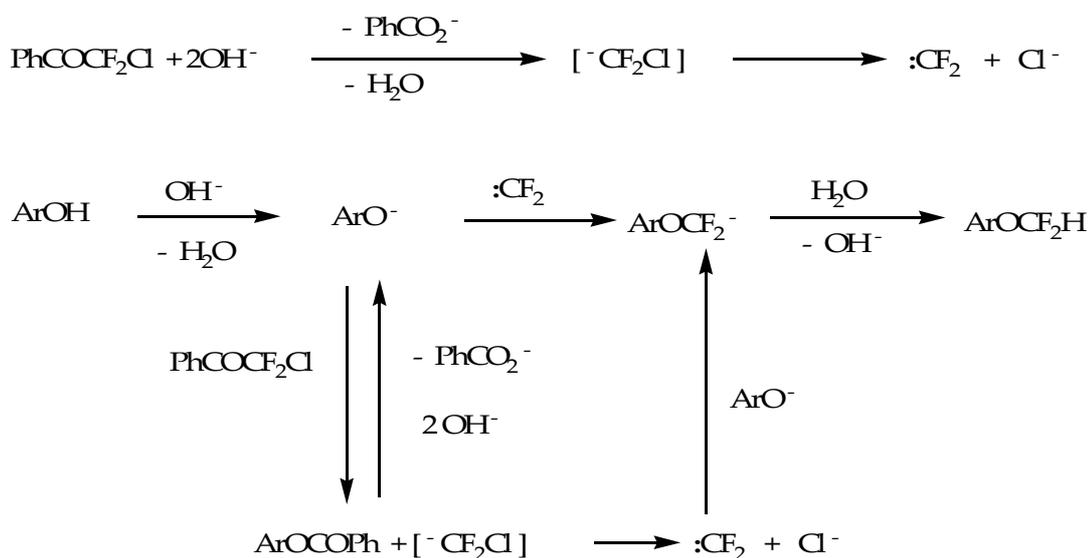
Schema 2



Successivamente il composto **5'c** è stato fatto reagire con il 2-Cl-2,2-difluoroacetofenone in rapporto stechiometrico 1:5 in presenza di un eccesso di carbonato di potassio (1:36), usando come solventi acqua ed acetonitrile (1:4)³⁰³.

La reazione, fatta allo scopo di introdurre un gruppo -CF₂H sull'ossidrilico fenolico della 2-fenilpirazolopirimidina, ha portato oltre che alla sintesi del prodotto atteso **6'c**, anche a quella del prodotto secondario **7'c** che reca nella stessa posizione un raggruppamento benzoilico. Addirittura quest'ultimo (**7'c**) risulta essere il prodotto principale della reazione, formandosi preferenzialmente rispetto al prodotto **6'c** (**7'c**: resa 80%, **6'c**: resa 20%). Il meccanismo di reazione proposto (vedi schema di seguito riportato) prevede la reazione del 2-Cl-2,2-difluoroacetofenone con l'ossidrile (OH⁻), con formazione della specie anionica clorodifluorometilica (CF₂Cl⁻), da cui, per α-eliminazione di uno ione cloruro (Cl⁻), si forma rapidamente un difluorocarbene intermedio (:CF₂) estremamente reattivo. L'anione fenossido (ArO⁻), formatosi in ambiente basico, compie un attacco nucleofilo sul difluorocarbene, portando alla formazione del composto **6'c**. D'altra parte lo stesso anione fenossido (ArO⁻) può compiere un attacco nucleofilo sul carbonile del 2-Cl-2,2-difluoroacetofenone con formazione del prodotto **7'c** e dell'anione clorodifluorometile che, a sua volta, si decompone a difluorocarbene e ione cloruro.

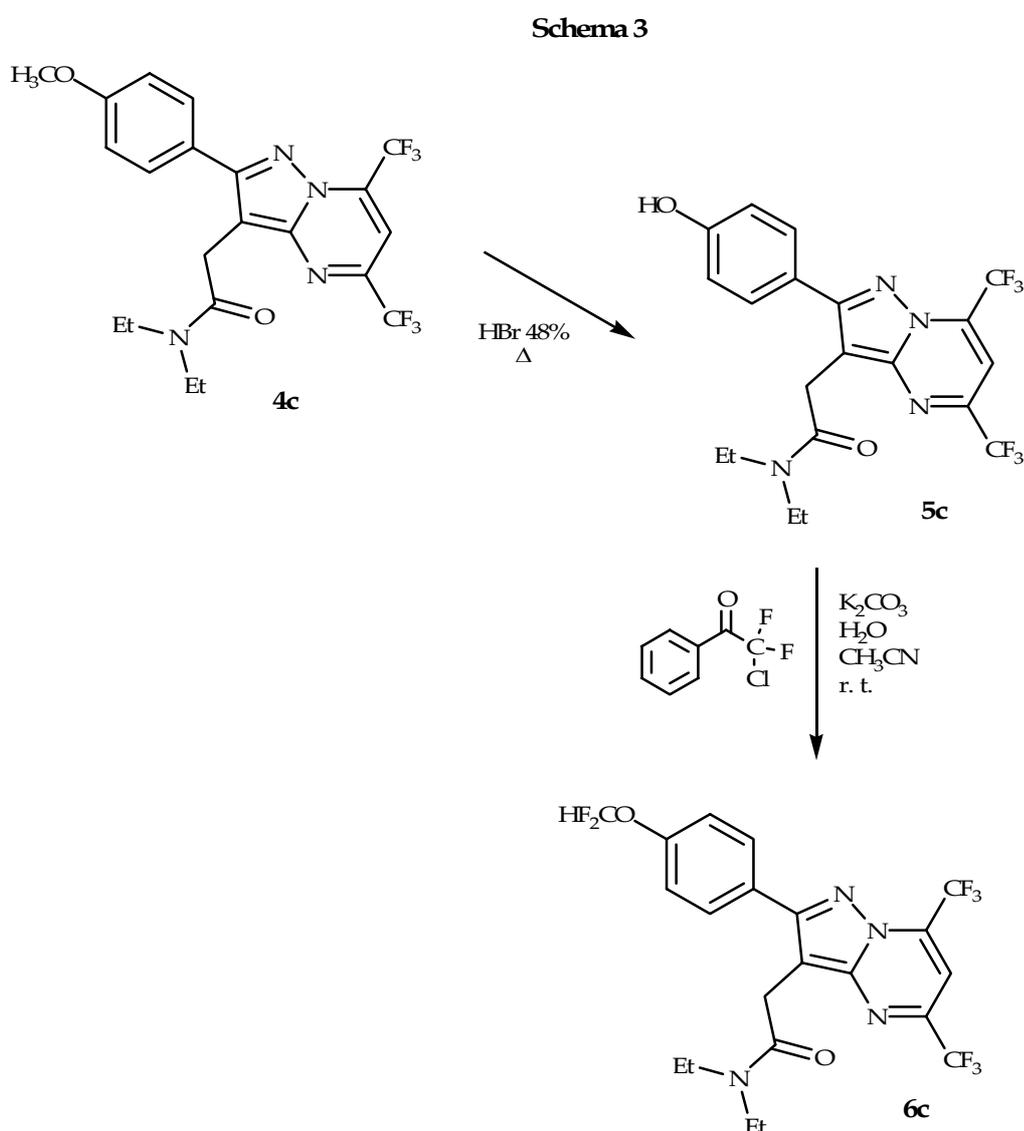
Meccanismo della reazione



E' stato visto che, le migliori condizioni di reazione, per favorire la formazione dell'atteso composto **6'c** prevedono l'utilizzo dei solventi acqua ed acetonitrile in rapporto 1:4, a temperatura ambiente con l'impiego di un forte eccesso di carbonato di potassio, cosicchè l'estere **7'c** possa subire l'attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile con formazione dell'anione fenossido e dell'anione benzoato³⁰³. La

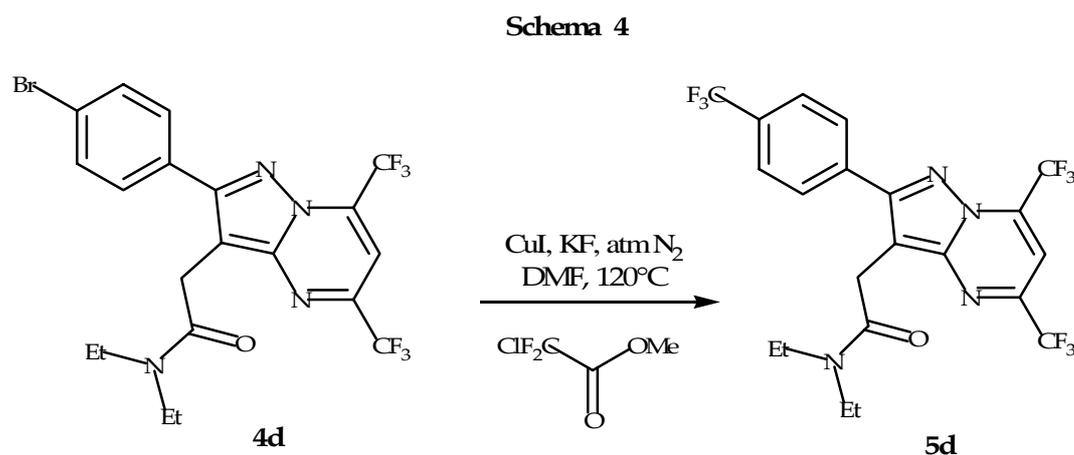
reazione procede per molte ore con resa bassa e i prodotti di reazione vengono isolati e purificati mediante cromatografia su colonna (Schema 2).

Anche il composto **4c** è stato sottoposto alla reazione di demetilazione in ambiente acido (HBr 48%) a refluxo ottenendo, il corrispondente prodotto demetilato **5c** (Schema 3). Successivamente **5c** è stato sottoposto alla reazione con il 2-cloro-2,2-difluoroacetofenone. Tale reazione è condotta in condizioni tali da favorire la formazione quasi esclusiva del prodotto **6c**, ossia utilizzando un forte eccesso di carbonato di potassio (1:50 rispetto a **5c**), i solventi acqua ed acetonitrile in rapporto 1:4 rispettivamente e lavorando a temperatura ambiente. La reazione procede per molte ore con bassa resa (15%). Il prodotto **6c** viene purificato mediante cromatografia su colonna (Schema 3).

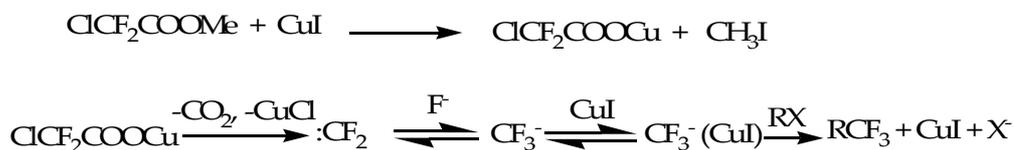


Proseguendo nella sintesi di 2-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidine recanti raggruppamenti contenenti il fluoro sull'arile in posizione 2, sul derivato **4d** è stata effettuata una sostituzione dell'alogeno³⁰⁴ in presenza di un agente trifluorometilante (clorodifluoroacetato di metile), KF, CuI in DMF a refluxo e

in atmosfera di N_2 , allo scopo di ottenere il composto **5d** (Schema 4). Il meccanismo di reazione proposto può essere così razionalizzato: si ha la formazione del sale (o del complesso) rameoso del clorodifluoroacetato di metile (agente trifluorometilante) con sviluppo di ioduro di metile, poi si ha la sua decarbossilazione e la conseguente formazione del radicale carbenico $:CF_2$ (non isolabile) in equilibrio con CF_3^- . In presenza di CuI l'equilibrio è rapidamente spostato verso la formazione di CF_3CuI , che reagisce con l'alogeno fenilico per dare il prodotto trifluorometilato (Schema 4). Studi precedenti hanno dimostrato che tale reazione non avviene mediante un meccanismo di tipo radicalico, ma sembra invece avvenire per semplice sostituzione nucleofila; infatti è stato visto che all'interno della stessa serie di derivati alogenati (RX) le rese sono sempre $RI > RBr > RCl$ in relazione alle caratteristiche di miglior gruppo uscente dell'alogeno. Inoltre, ad ulteriore conferma della mancata implicazione di specie radicaliche, in studi successivi si è evidenziato che, l'aggiunta alla reazione di 2,3-dimetilbut-2-ene, un agente "intrappolante" il $:CF_2$, non porta alla formazione di alcun derivato ciclopropanico³⁰⁴. Il prodotto finale **5d** si ottiene puro tramite cromatografia su colonna e con buona resa.



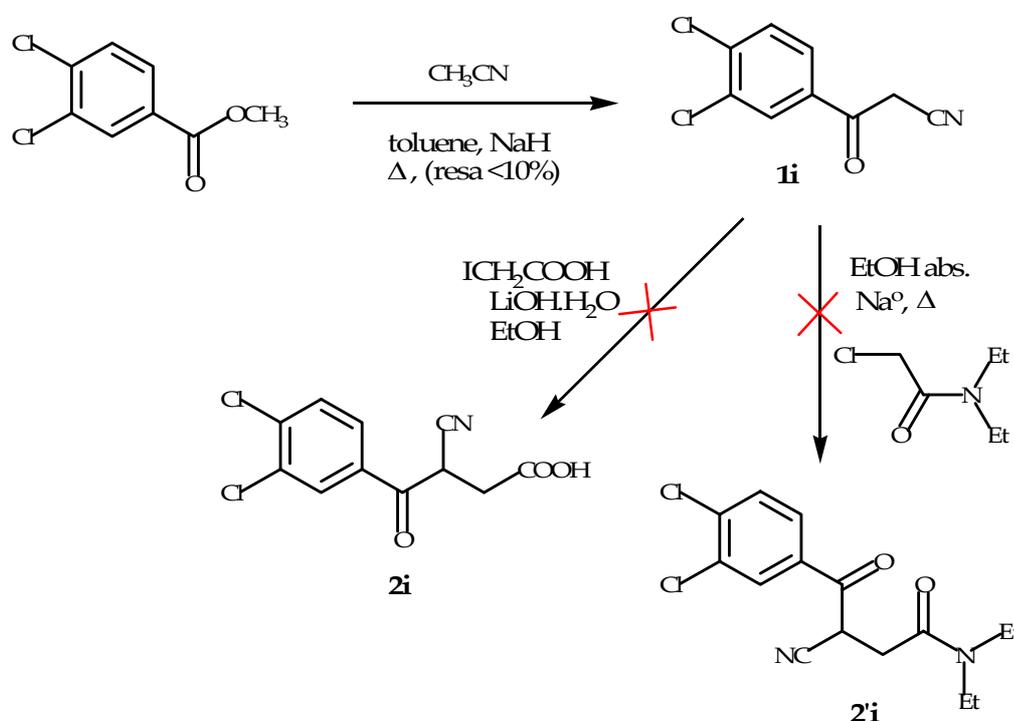
Meccanismo di reazione



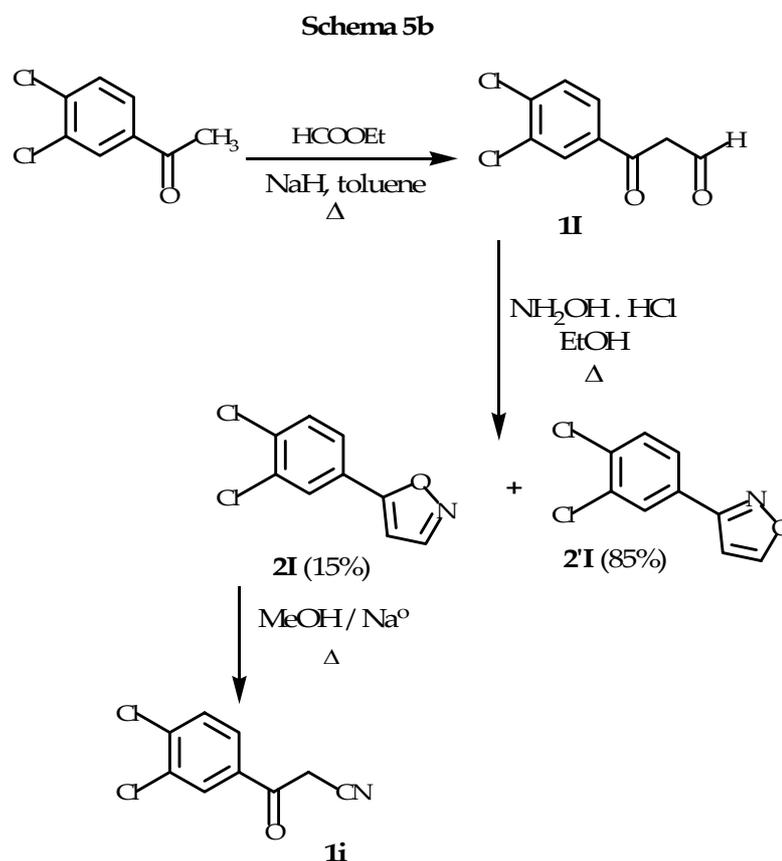
Per quanto riguarda la sintesi del composto **1i**, intermedio di reazione per l'ottenimento della 3,4-diclorofenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidina, la sua realizzazione attraverso la via sintetica utilizzata per

L'ottenimento dei composti analoghi (**2a-h**; Schema 1), ossia per attacco nucleofilo dell'acetonitrile, opportunamente attivato in ambiente basico, sul carbonile estereo del 3,4-diclorometilbenzoato, si è dimostrata non utile alla formazione del prodotto desiderato in quanto la reazione ha una resa molto bassa (<10%). Sul derivato aroilacetonitrilico **1i** si è tentato di introdurre la catena acetica e ottenere, quindi, il composto **2i**, da chiudere successivamente ad aminopirazolo con idrazina monoidrata (Schema 5a). Il primo passaggio della reazione prevede l'attacco nucleofilo del metilene (δ^-) dell'aroilacetonitrile, opportunamente attivato in ambiente alcalino, sul metilene (δ^+) elettrofilo dell'acido iodoacetico. Per questa reazione di sostituzione nucleofila, in presenza di un anione bidentato, è stata fatta particolare attenzione alle condizioni di reazione, al fine di favorire la formazione del prodotto di C-alcilazione. E' stato visto che i migliori risultati si ottengono usando idrossido di litio come base/controione ed etanolo, un solvente protico che permette la solvatazione dell'atomo di ossigeno più elettronegativo, mediante formazione di legame ad idrogeno, rispetto al carbonio meno elettronegativo. La reazione non ha portato alla formazione del prodotto atteso. In alternativa, l'aroilacetonitrile **1i** viene fatto reagire con la N,N-dietilcloroacetamide secondo la via classica già utilizzata per la sintesi dei derivati **2a-h**. Purtroppo anche in questo caso non siamo riusciti ad ottenere il composto desiderato **3i** (Schema 5a).

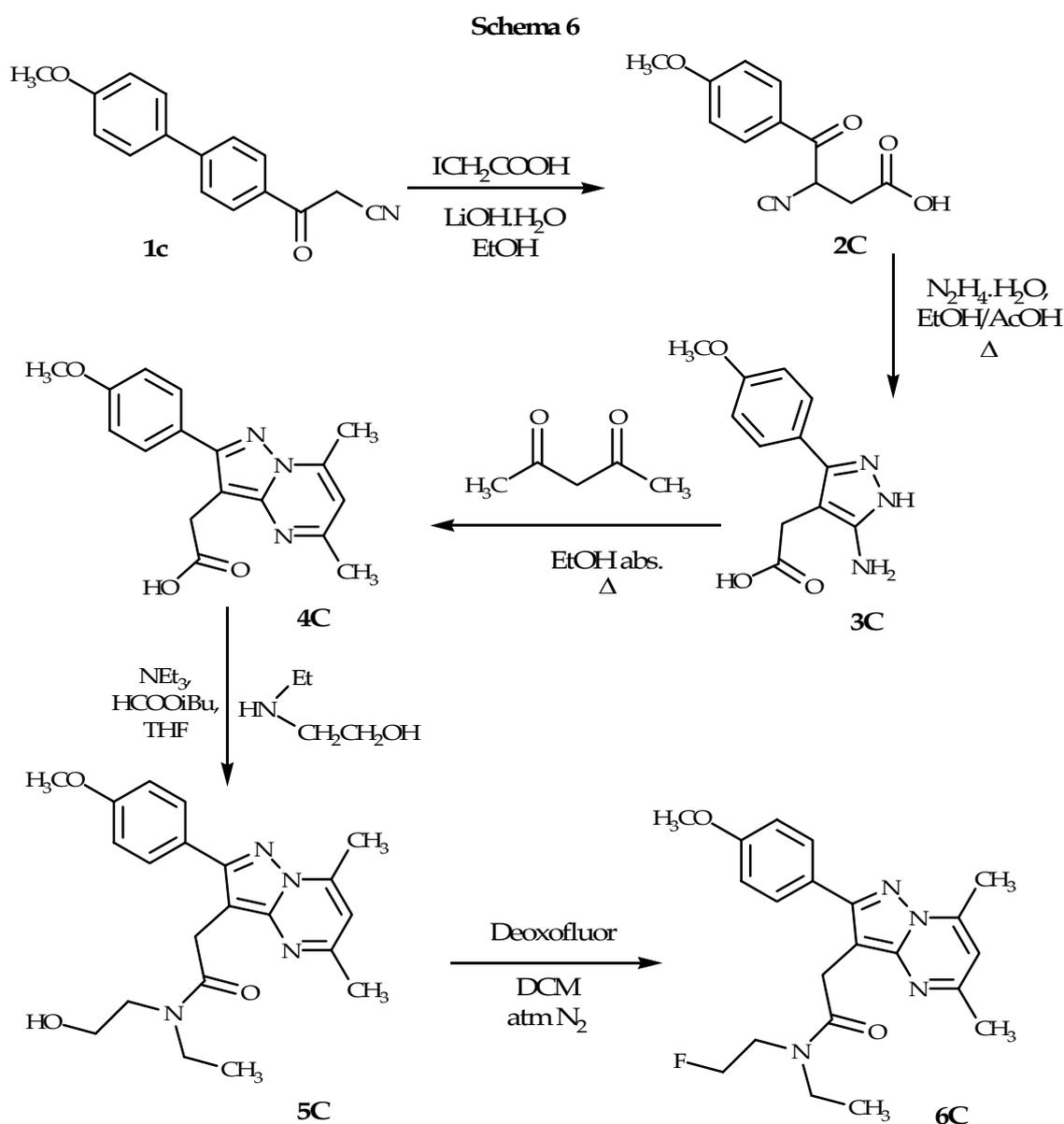
Schema 5a



Al fine di poter effettuare ulteriori tentativi per la sintesi della 3,4-diclorofenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidina, si è tentato di percorrere una via alternativa per ottenere l'aroilacetonitrile **1i** con rese migliori. Tale via ha previsto l'ottenimento del composto **1I**, per attacco nucleofilo del 3,4-dicloroacetofenone, prodotto commerciale opportunamente attivato in ambiente basico, sul carbonile estereo del formiato di etile (Schema 5b). Lo scopo di tale reazione è quello di ottenere poi, dalla condensazione del composto **1I** con idrossilamina cloridrata, il 5-(3,4-diclorofenil)isossazolo (**2I**), da cui per successiva idrolisi in ambiente basico si ottiene il desiderato aroilacetonitrile **1i**. La reazione di condensazione, riportata in letteratura da Sarti Fantoni *et al.*³⁰⁵, ha portato alla sintesi, oltre che dell'atteso 5-(3,4-diclorofenil)isossazolo (**2I**), anche del corrispondente 3-(3,4-diclorofenil)isossazolo (**2'I**) che risulta essere il prodotto principale (85:15). La formazione preponderante del 3-(3,4-diclorofenil)isossazolo (**2'I**) è imputabile alla presenza sul fenile del composto **1I** di due atomi di Cl, elettronattrattori, che indirizzano l'attacco nucleofilo dell'azoto dell'idrossilamina cloridrata sul carbonile più elettron-povero, ossia quello in α all'anello aromatico. Infatti la condensazione porta alla formazione preferenziale del prodotto **2'I** non idrolizzabile. In conclusione nemmeno questa via è risultata utile alla sintesi del composto **1f**, infatti, il suo precursore 5-(3,4-diclorofenil)isossazolo (**2I**) è ottenuto solo in minima quantità e pertanto la via dell'isossazolo non porta ad alcun miglioramento in termini di resa per l'ottenimento dell'atteso aroilacetonitrile **1i** e quindi per i successivi passaggi sintetici progettati.



Per la sintesi dei composti **5C** e **6C**, che presentano in posizione 3 una catena N-etil,N-2-idrossi etilacetamidica (Schema 6) si è intrapresa una via sintetica alternativa che prevede l'introduzione della catena acetica sul derivato aroilacetonitrilico (**1c**); si tratta di un attacco nucleofilo del metilene dell'aroilacetonitrile, opportunamente attivato in ambiente basico, su quello elettrofilo dell'acido iodoacetico. Per favorire la formazione del prodotto di C-alcilazione rispetto a quello di O-alcilazione è stata fatta particolare attenzione alle condizioni di reazione e si è visto che i migliori risultati si hanno usando idrossido di litio (più "hard" del sodio) come base/controione ed etanolo come solvente. La reazione procede lentamente, con rese molto basse e accompagnata dalla formazione di numerose impurezze.



Il secondo passaggio prevede la chiusura del prodotto **2C** ad aminopirazolo (**3C**) sempre con idrazina monoidrata in alcool etilico con catalisi acida. Quindi si effettua la condensazione in etanolo assoluto con 2,4-pentandione che porta alla formazione del sistema biciclico pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico (**4C**).

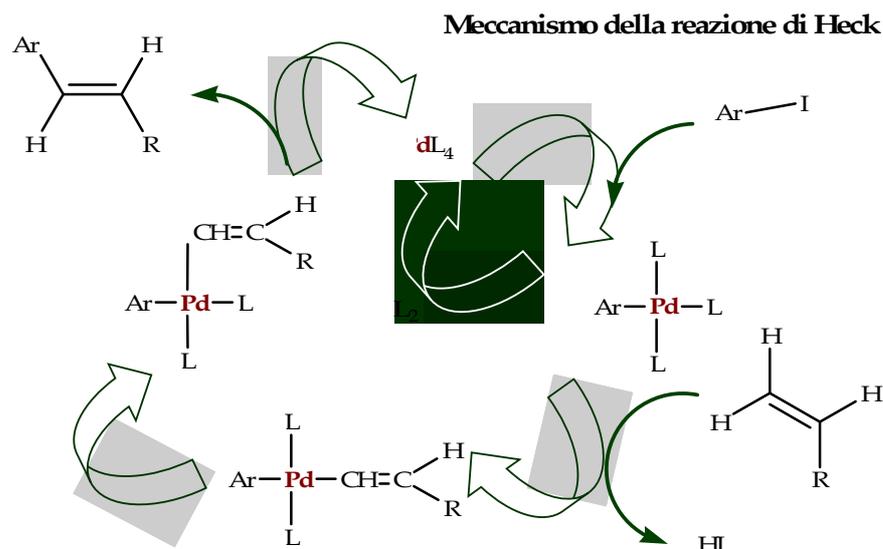
Il prodotto amidico finale **5C** si ottiene con il metodo dell'anidride mista in THF anidro a -10°C con isobutil-cloroformiato e trietilammina e successiva aggiunta dell'amina corrispondente.

Infine il prodotto **6C** si ottiene per inserimento di un atomo di fluoro attraverso la reazione con l'agente deoxo-fluorurante Deoxofluor (bis(2-metossi-etilamino)trifluoro-solfuro)³⁰⁶, condotta in diclorometano anidro a temperatura ambiente. Il prodotto finale è ottenuto puro tramite cromatografia su colonna e con buona resa.

La seconda parte del progetto ha previsto la realizzazione di ligandi che presentano modifiche a livello della catena acetamidica in posizione 3 dello scaffold pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il acetamidico. Sono stati mantenuti il sostituito arilico in posizione 2 e due gruppi metilici in posizione 5,7; infatti tali sostituzioni si sono rivelate favorevoli per l'interazione recettoriale^{92,276}. Le variazioni effettuate riguardano l'allungamento della catena in posizione 3, per aggiunta di un atomo di carbonio, e l'introduzione di una insaturazione, che conferisce parziale rigidità alla catena stessa. Nuovi ligandi recanti la catena N,N-dietilpropenamidica in posizione 3, caratterizzati dalla presenza di differenti sostituenti sul fenile in posizione 2 e nelle posizioni 5,7, sono attualmente oggetto di studio del gruppo di ricerca del Prof. Bruni.

Il primo step della sequenza sintetica per la realizzazione del derivato pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico recante in 3 la catena propenamidica prevede l'attacco nucleofilo dell'acetonitrile, opportunamente attivato in ambiente basico, sul carbonile estereo del metilbenzoato (Schema 7). Successivamente l'aroilacetonitrile **1j** viene fatto reagire con idrazina monoidrata in etanolo in presenza di quantità catalitiche di acido acetico, con la conseguente chiusura ad aminopirazolo **2j**. Il composto **3j** con nucleo pirazolopirimidinico 5,7-dimetilico è stato ottenuto per condensazione dell'aminopirazolo **2j** con 2,4-pentandione. La pirazolopirimidina **3g** è stata sottoposta poi a reazione di iodurazione elettrofila con N-Iodiosuccinimide (NIS) in THF a riflusso. La reazione va avanti per molte ore e porta alla formazione del composto **4j**, recante in 3 un atomo di iodio, con una resa dell'80%.

Successivamente dal composto **4j** tramite reazione di Heck³⁰⁷ con acrilato di metile, in presenza di Pd come catalizzatore e trietilammina, in acetonitrile a riflusso, si ottiene il composto **5j**, ovvero l'estere metilico dell'acido 2-fenil-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-acrilico. La reazione va a compimento con rese molto alte e il prodotto finale solido viene facilmente isolato dall'ambiente di reazione e purificato per cristallizzazione in MeCN (Schema 7).

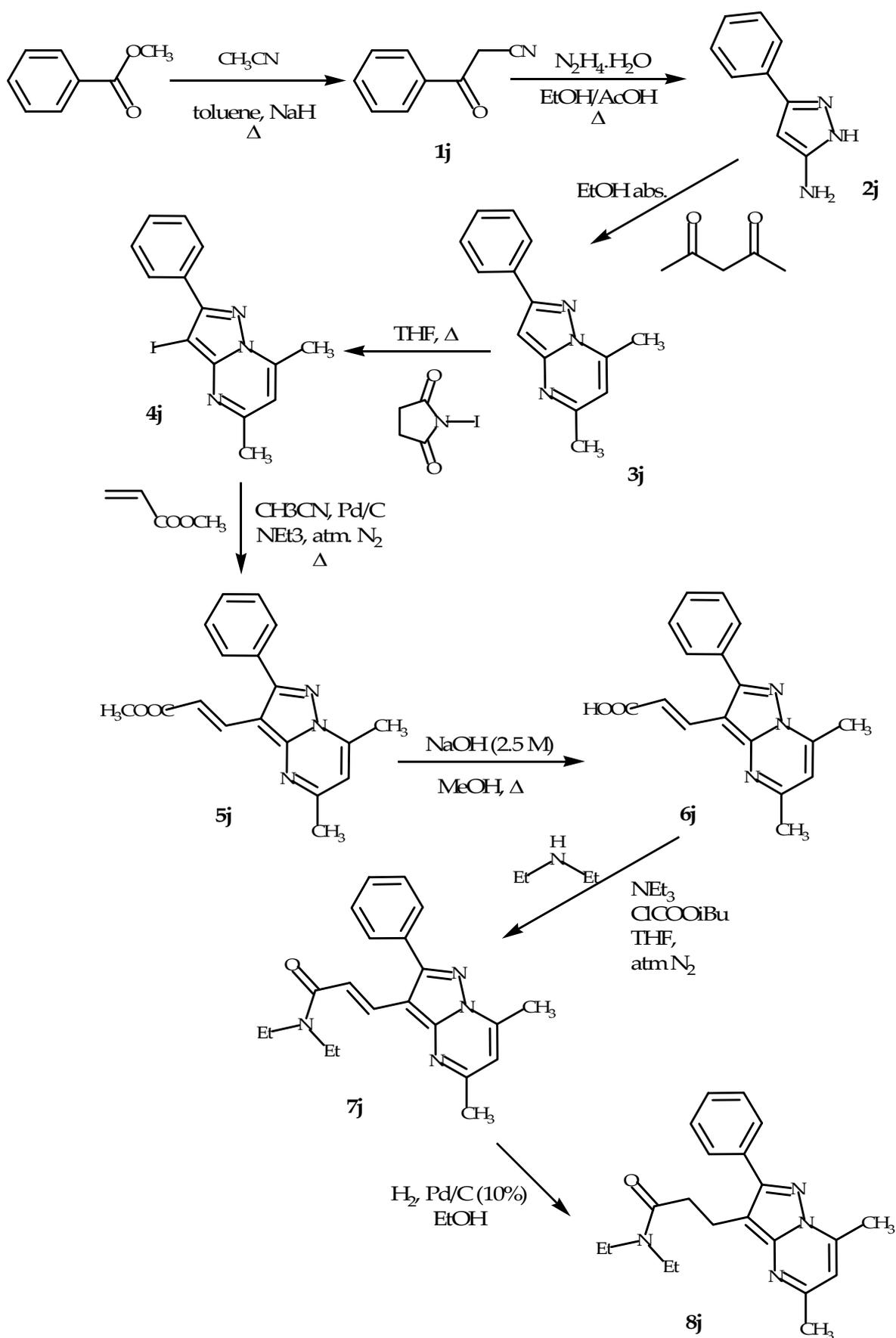


Il meccanismo proposto per la reazione di Heck prevede il legame del metallo (Pd) allo ioduro di arile, l'inserimento sul metallo del sistema insaturo con eliminazione dello ione ioduro (I⁻), isomerizzazione trans-cis per favorire la formazione del legame tra l'arile e l'allile in posizione adiacente, ed infine il ripristino del catalizzatore.

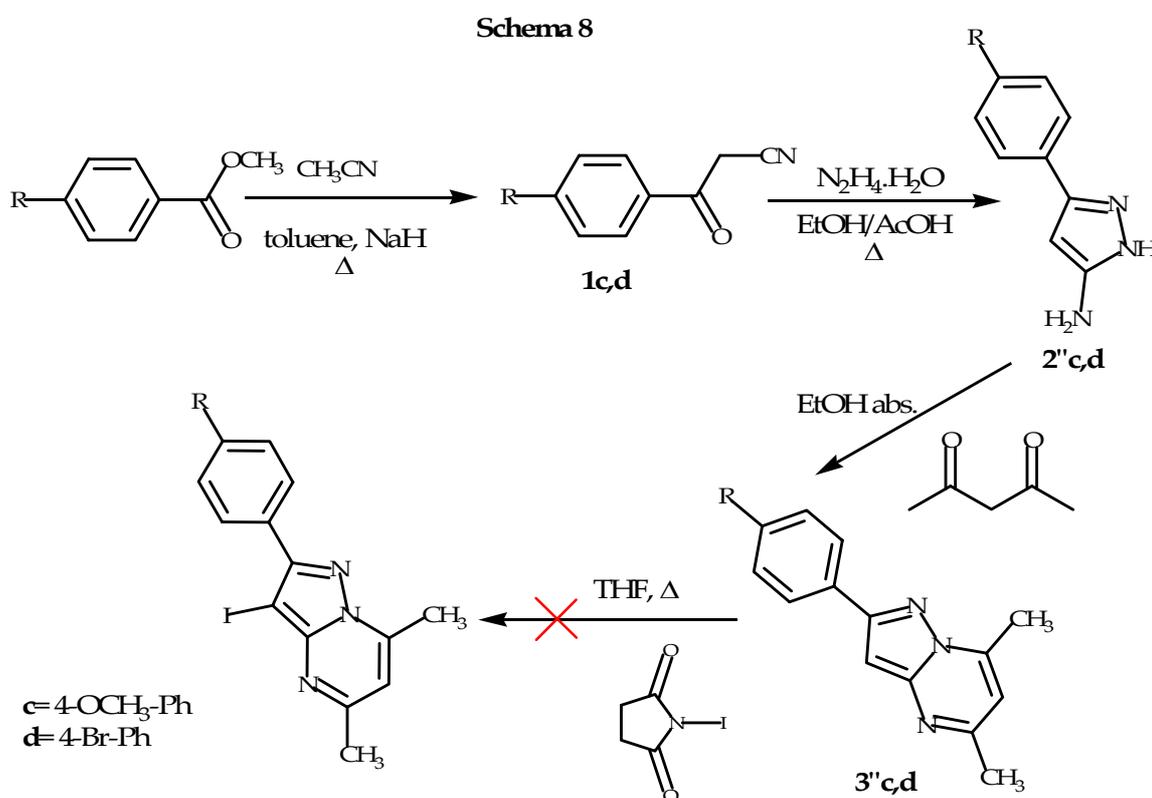
Il passaggio successivo, porta all'ottenimento del composto **6j**, per idrolisi dell'estere metilico dell'acido acrilico **5j**, in ambiente basico (NaOH 2,5 N) a refluxo per qualche ora (Schema 7). Nell'ultimo passaggio della sequenza sintetica il composto **6j**, dopo essere stato purificato per cristallizzazione in EtOH, viene fatto reagire con trietilamina (NEt₃), isobutilcloroformiato (ClCOOiBu) con successiva aggiunta di dietilamina (HNEt₂) in THF anidro, in corrente di N₂ a T = -5 °C, ottenendo così il composto **7j** che porta in posizione 3 la desiderata catena N,N-dietilpropenamidica. In precedenza, per la stessa reazione, era stato usato l'etilcloroformiato (ClCOOEt) che tuttavia presentava l'inconveniente di portare alla formazione dell'estere etilico dell'acido di partenza per decarbossilazione dell'anidride mista. Tale limite è stato superato usando ClCOOiBu, estere stericamente più ingombrato dell'etilcloroformiato, che non risulta capace di dare la reazione di attacco nucleofilo intramolecolare. La reazione di amidificazione del composto **6j** mediante metodo dell'anidride mista, procede in tempi lunghi, con basse rese e porta alla formazione di una miscela oleosa. Il prodotto di reazione viene recuperato puro, tramite purificazione cromatografica su colonna (Schema 7).

Infine il doppio legame della catena N,N-dietilpropenamidica in posizione 3 del composto **7j** è stato ridotto mediante idrogenazione catalitica. La reazione è stata effettuata aggiungendo l'opportuno catalizzatore Pd (10%) ad una soluzione del composto **7j** in EtOH, sotto agitazione magnetica. L'idrogenazione catalitica porta alla formazione, con rese elevate, del composto **8j** che viene purificato mediante cromatografia su colonna (Schema 7).

Schema 7



Una volta ottenuto il primo prodotto della nuova serie con catena propenamidica in posizione 3 (**7j**), si tenta di effettuare la reazione di Heck anche su composti che presentano in posizione 2 dei sostituenti arilici diversi. La reazione sui composti **3''c** e **3''d** non avviene e si recupera in entrambi i casi solo prodotto di partenza.



La sequenza sintetica che è stata messa a punto per la realizzazione di questi composti ha previsto 4 passaggi a partire dagli intermedi **3''c** e **3''d**:

- l'introduzione di un gruppo dimetilaminoclorometanico in posizione 3;
- idrolisi del gruppo dimetilaminoclorometanico ad aldeide;
- formazione del corrispondente acido acrilico a partire dall'aldeide;
- la trasformazione dell'acido acrilico nella corrispondente amide.

Le pirazolopirimidine **3''c** e **3''d** sono state sottoposte ad una reazione consistente nell'introduzione del gruppo aldeidico in posizione 3; tale reazione viene effettuata per azione dell'ossicloruro di fosforo secondo la reazione di Vilsmeier (Schema 8a).

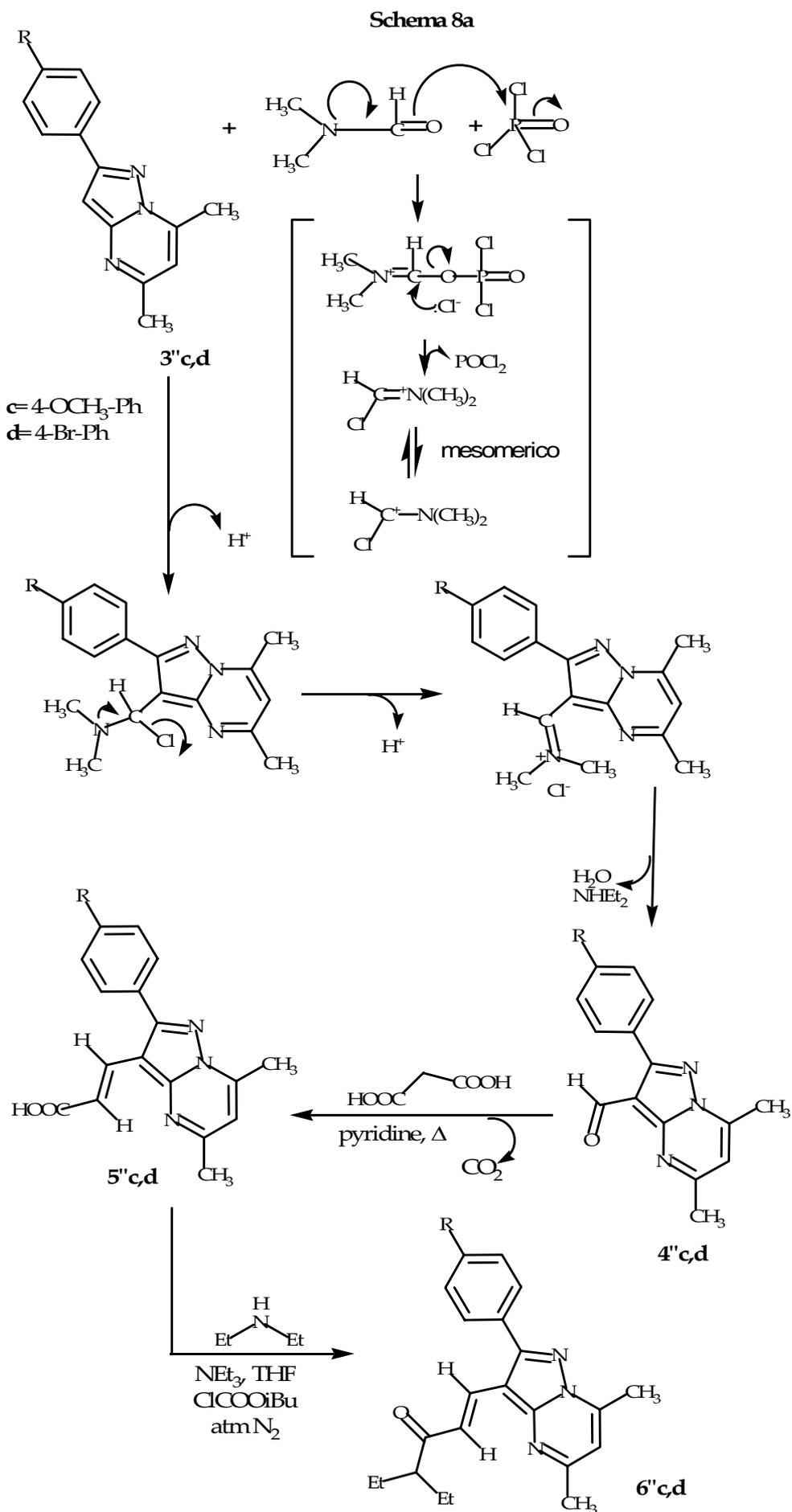
Infatti il sistema pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico, che possiede una struttura planare, presenta un massimo di densità elettronica sulla posizione 3. Tale posizione può subire vari tipi di attacchi elettrofilici, tra cui

la reazione di formilazione secondo Vilsmeier. L'intermedio che si forma in questa reazione è facilmente idrolizzato, con formazione della corrispondente aldeide.

I prodotti **4''c** e **4''d** sono ottenuti tramite reazione di idrolisi a temperatura ambiente dagli intermedi di Vilsmeier; la reazione va avanti a seconda dei sostituenti da 3 a 6 ore, fornendo prodotti solidi di colore rosso, con rese mediamente alte. Questa reazione, il cui meccanismo è abbastanza complesso, va effettuata ad una temperatura di 0°C. È stato visto che, le migliori condizioni di reazione, per favorire la formazione degli attesi composti **4''c** e **4''d** prevedono l'utilizzo di DMF anidra ad una temperatura non superiore a 85°C e l'impiego di acqua in quantità stechiometrica. I prodotti ottenuti non necessitano generalmente di alcun processo di purificazione.

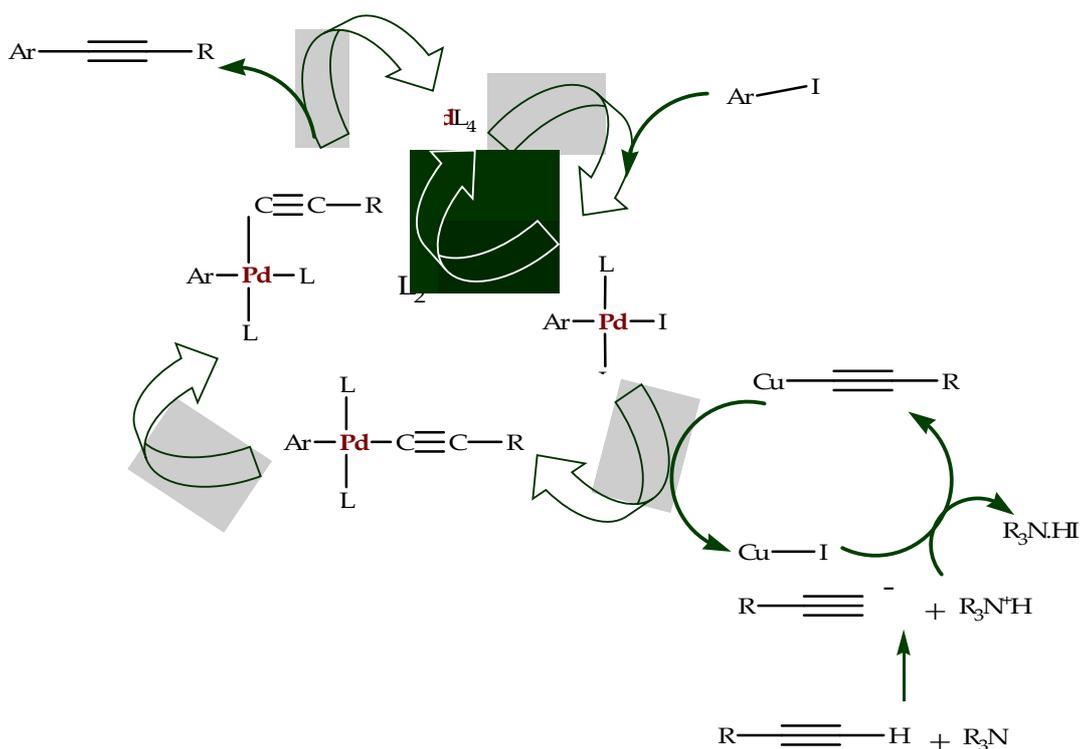
Su tali prodotti, tramite la reazione di Knoevenagel, è stata inserita una catena acrilica allo scopo di ottenere i composti **5''c** e **5''d**. Infatti per reazione nucleofila da parte del carbanione dell'acido malonico in presenza di piridina, si formano i suddetti acidi acrilici (Schema 8a); la reazione va a compimento con rese elevate e i prodotti finali vengono facilmente purificati tramite cromatografia su colonna.

La successiva reazione di amidificazione dei composti **5''c** e **5''d** mediante il metodo dell'anidride mista (Schema 8a), procede in tempi lunghi, con basse rese e porta alla formazione di una miscela oleosa. I prodotti di reazione (**6''c** e **6''d**) vengono purificati tramite cromatografia su colonna.



Inoltre sull'intermedio iododerivato **4j** viene effettuata la reazione di Sonogashira³⁰⁸: in presenza di Pd come catalizzatore e trifenilfosfina, carbonato di potassio e ioduro di rame in dimetossietano a refluxo, si introduce la catena laterale in posizione 3 tramite alcool propargilico precedentemente protetto e si ottiene il composto **5'j**, ovvero l'etere tetraidropiranicolo del 2-fenil-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-propinolo. La reazione va a compimento con resa abbastanza buona ed il prodotto si recupera per cristallizzazione (Schema 9).

Meccanismo della reazione di Sonogashira



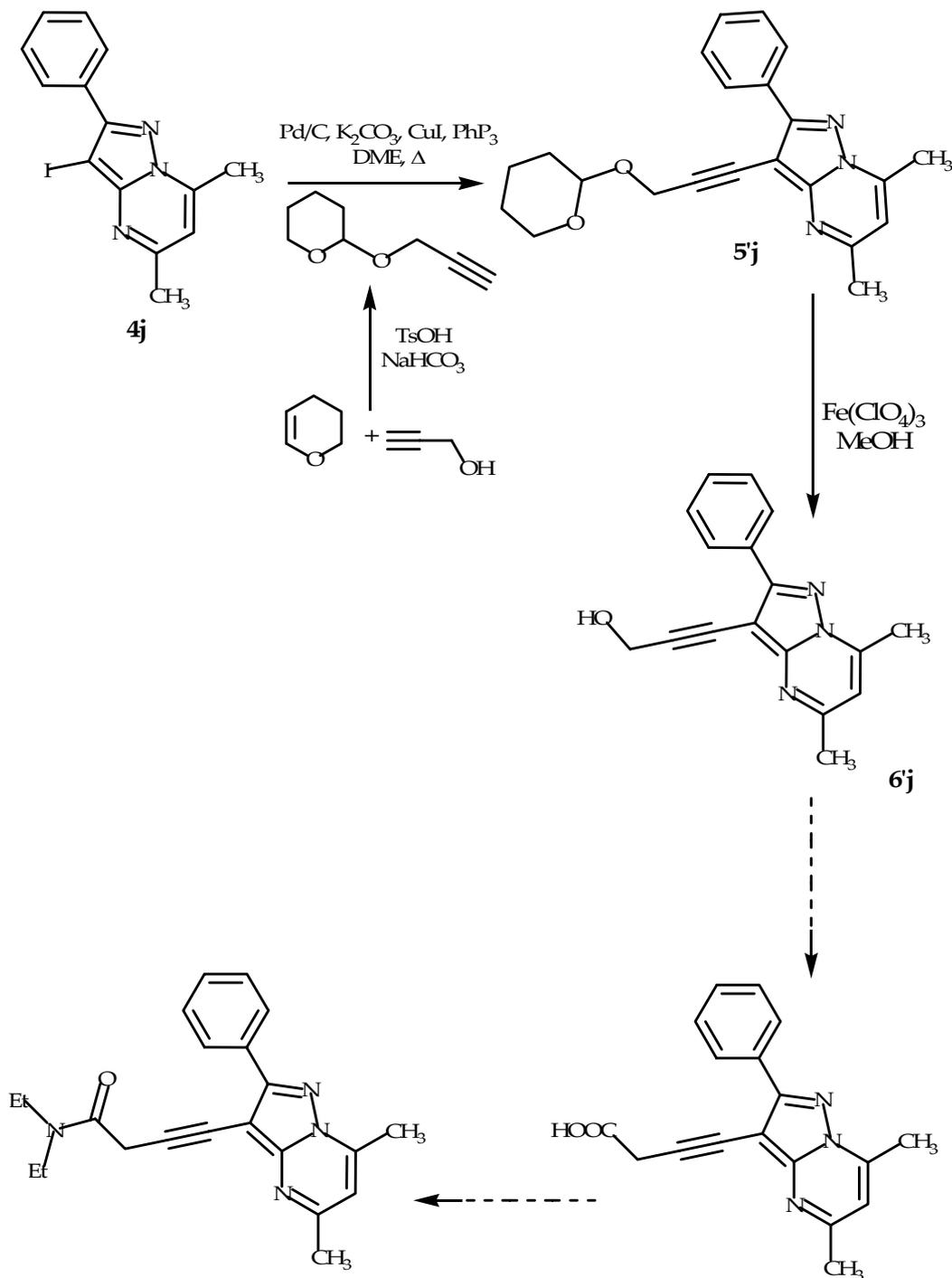
Successivamente si effettuano vari tentativi di deprotezione dell'etere tetraidropiranicolo ottenuto (**5'j**):

1. deprotezione catalizzata da Selectfluor (1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]ottano bis(tetrafluorobrato)³⁰⁹;
2. deprotezione catalizzata da Fe(ClO₄)₃³¹⁰;
3. deprotezione catalizzata da β-ciclodestrina in H₂O³¹¹;
4. deprotezione catalizzata da Amberlist H-15 (resina a scambio ionico contenente residui acidi di SO₃H)³¹².

Soltanto una di queste reazioni permette di ottenere l'alcol deprotetto desiderato (**6'j**), mentre da tutti gli altri tentativi si recupera esclusivamente il prodotto di partenza tal quale (Schema 9).

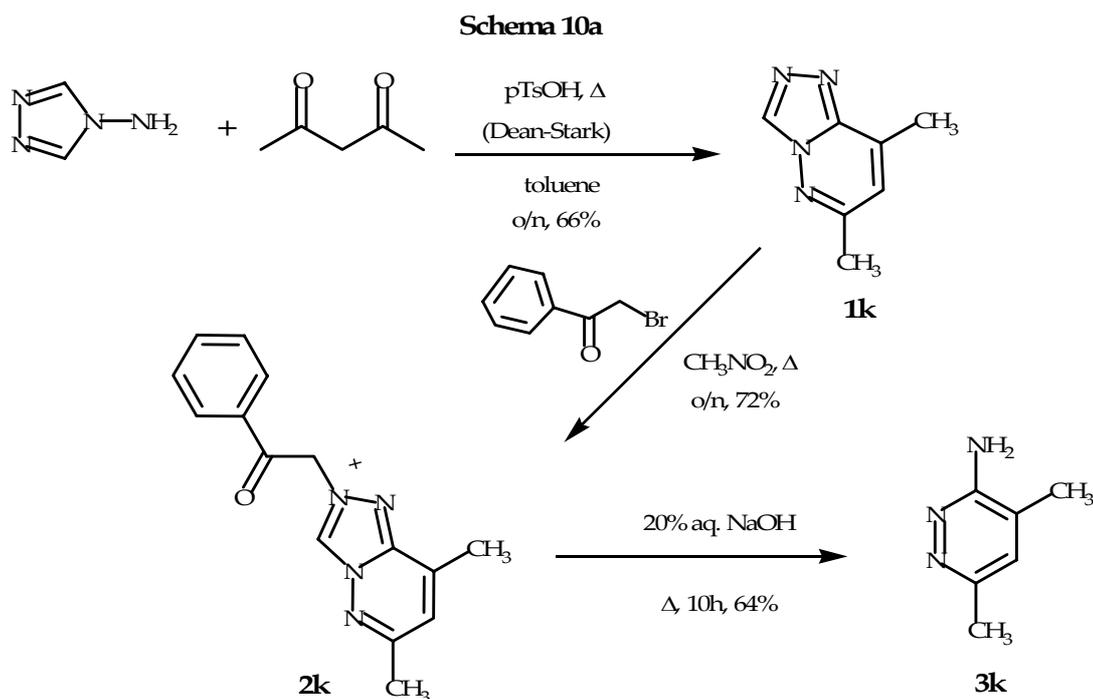
Il prodotto **6'j** viene purificato tramite cromatografia su colonna e sarà in futuro sottoposto ad una reazione di ossidazione del gruppo alcolico a gruppo acido e successiva ammidificazione di questo (Schema 9).

Schema 9



Infine viene riportata qui di seguito la parte chimica relativa al progetto di ricerca effettuato presso la University of Sydney in collaborazione con il Prof. M. Kassiou.

Durante il trimestre trascorso presso tale università sono stati realizzati due composti della serie imidazo[1,2-*b*]piridazinica (**6k** e **6l**), che pur essendo aza-analoghi della serie pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica, presentano una realizzazione sintetica completamente diversa da quelle viste sopra per gli altri composti.

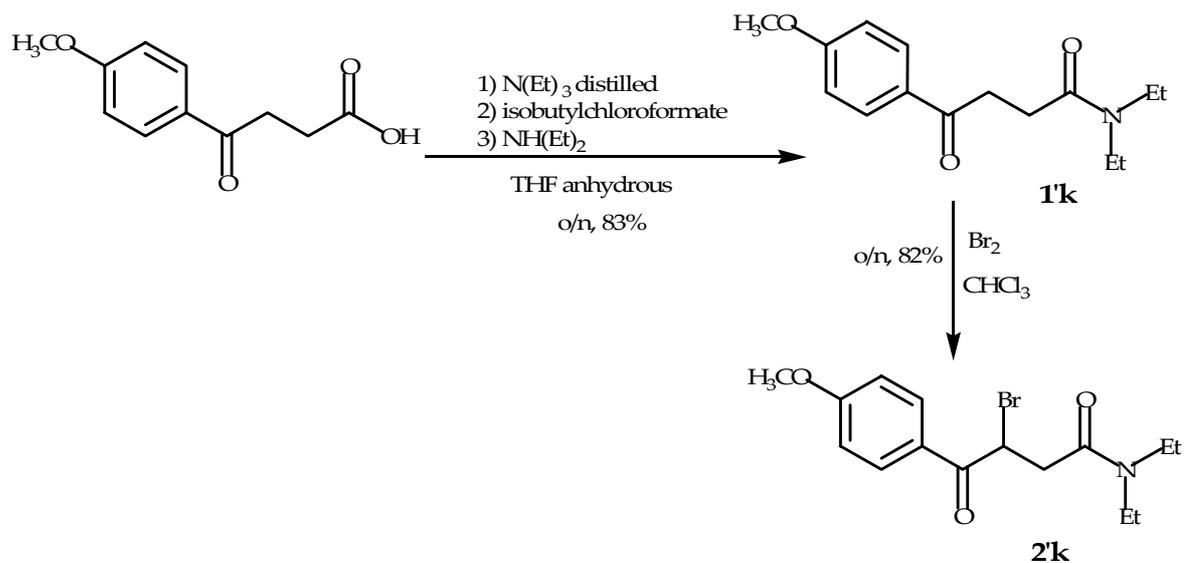


Nel primo passaggio (Schema 10a) è riportata la sintesi della triazolo-piridazina **1k** attraverso la condensazione tra 4-amino-1,2,4-triazolo, disponibile in commercio, con 2,4-pentandione in presenza di acido p-Toluensolfonico e apparecchio di Dean-Stark, necessario per allontanare l'acqua che si forma dall'ambiente di reazione e spostare così l'equilibrio verso la formazione del prodotto **1k**. Il prodotto si forma con una resa abbastanza buona e non è necessaria alcuna purificazione per passare allo step successivo. Il passaggio successivo prevede la reazione del prodotto **1k** con broacetofenone in nitrometano a dare con buona resa il sale alchilato **2k** che, per idrolisi alcalina, dà la piridazina **3k**.

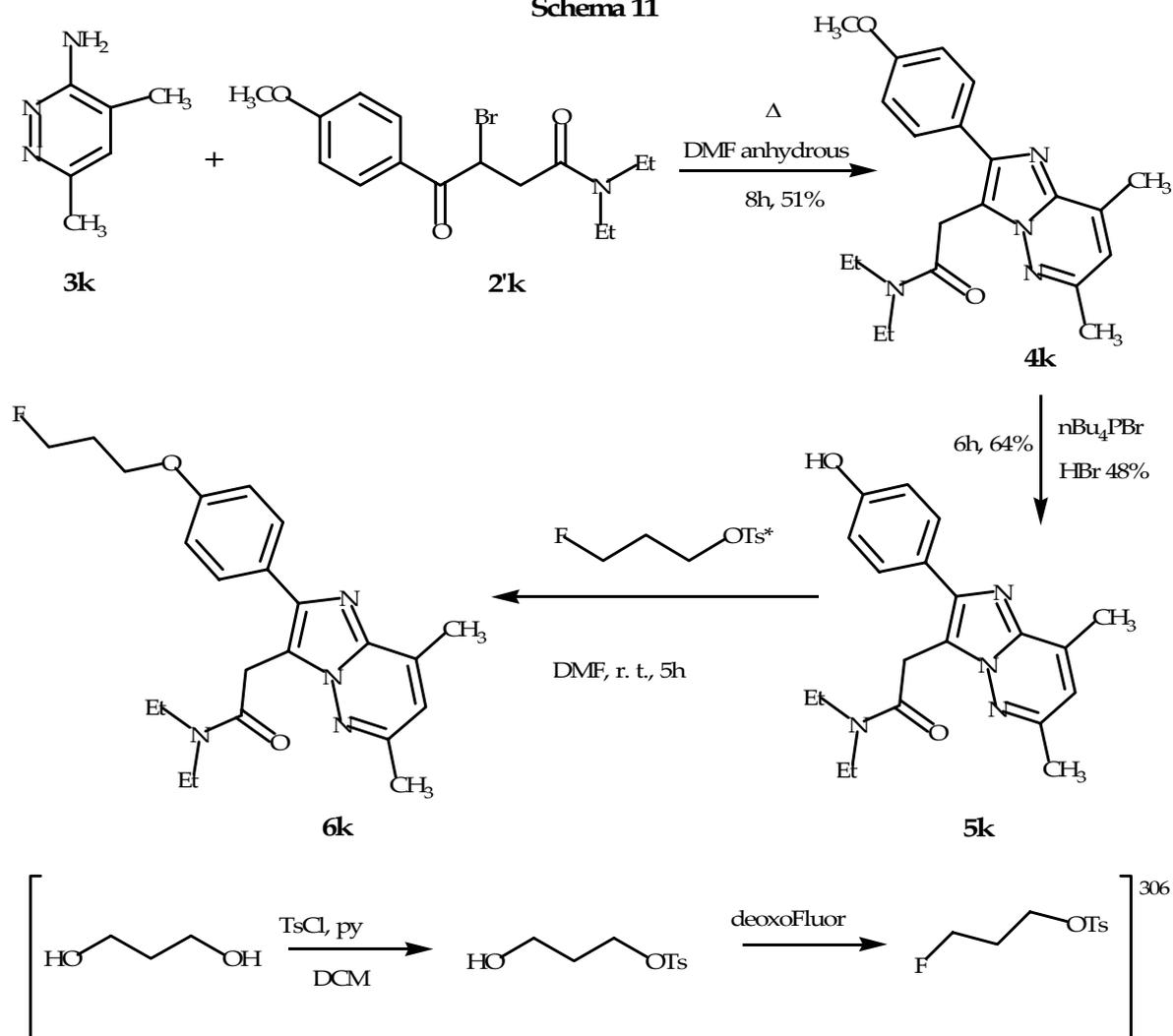
Nello Schema 10b sono riportati i passaggi che permettono di ottenere l'amide **2'k** che sarà a sua volta fatta reagire con la piridazina **3k** (Schema 11).

Il composto **2'k** si ottiene con buona resa con il metodo dell'anidride mista, già visto in precedenza, dall'acido (4-metossi-benzoil)-propionico, quindi si effettua una bromurazione e l' α -bromochetone **2'k** derivante viene fatto reagire con la piridazina **3k**, precedentemente sintetizzata (Schema 11).

Schema 10b



Schema 11



La reazione è condotta in DMF anidra e porta alla imidazopiridazina **4k** con resa modesta.

Il passaggio successivo prevede una demetilazione in acido bromidrico in presenza di tetrabuttilfosfonio di bromuro come catalizzatore.

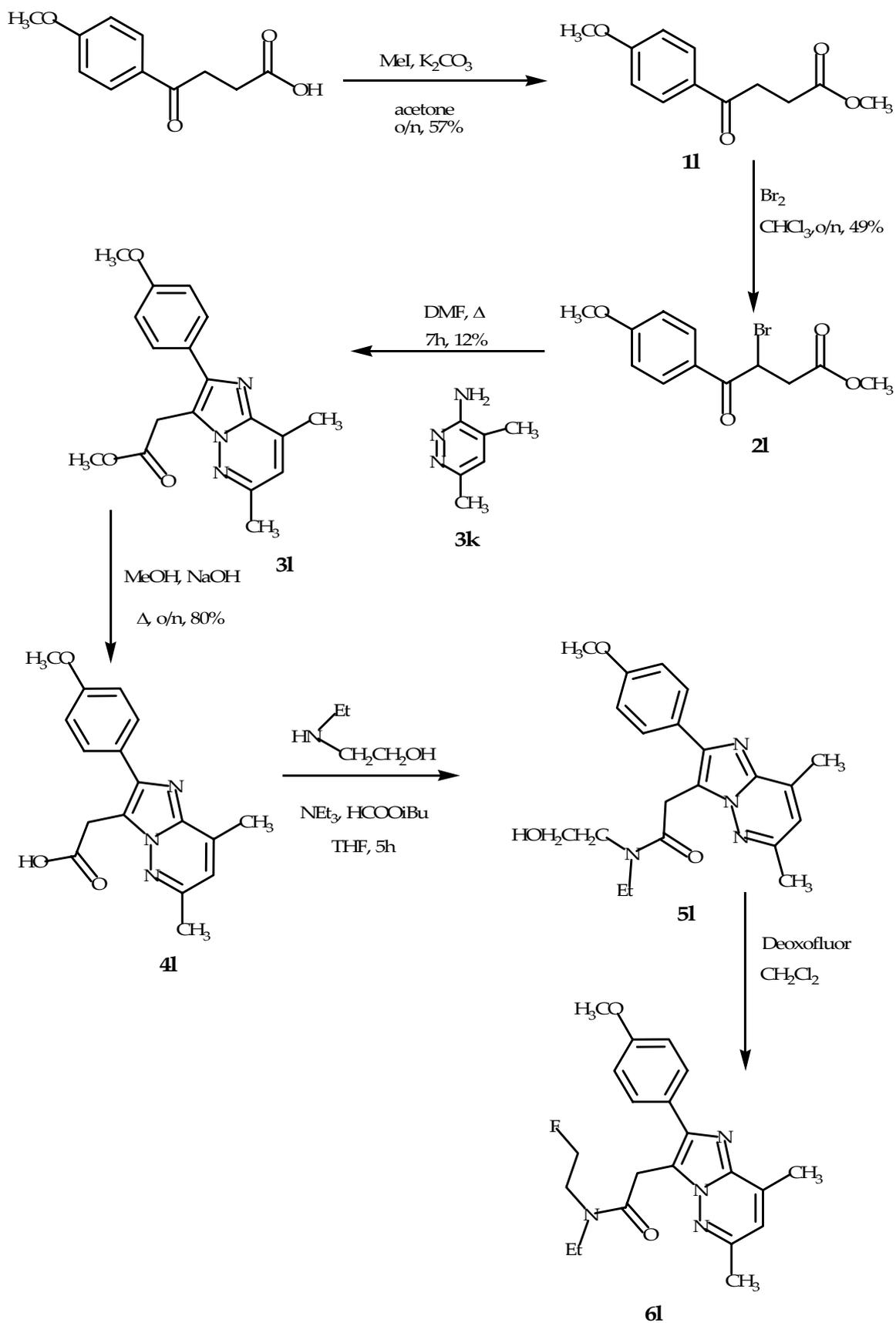
Infine viene introdotta la catena fluoro-propilica sull'ossidrile dell'intermedio **5k** facendolo reagire con il 3-fluoro-propil-4-metil-benzene-solfonato, precedentemente sintetizzato³⁰⁶, in DMF a temperatura ambiente. Si ottiene con resa piuttosto scarsa il prodotto finale **6k** che viene purificato tramite cromatografia su colonna.

L'ultimo schema di reazione (Schema 12) descrive la sintesi che porta all'ottenimento del prodotto finale **6l**. Il primo step consiste nell'esterificazione dell'acido 3-(4-metossi-benzoil)propionico allo scopo di proteggere il gruppo acido dalla successiva bromurazione, che serve a sintetizzare l' α -bromo-chetone **2l**. Quest'ultimo viene fatto reagire con la piridazina **3k**, vista negli schemi precedenti, per dare la corrispondente imidazopiridazina **3l**.

Dopo idrolisi basica, il composto **4l** così ottenuto viene sottoposto a reazione di amidificazione con 2-etilamino-etanolo secondo il metodo dell'anidride mista. Il composto **5l**, ottenuto con resa abbastanza buona, viene purificato tramite cromatografia su colonna.

L'ultimo step prevede l'introduzione di un atomo di fluoro con Deoxofluor in DCM anidro a temperatura ambiente³⁰⁶. Il prodotto finale **6l**, ottenuto con buone rese, viene purificato tramite cromatografia su colonna.

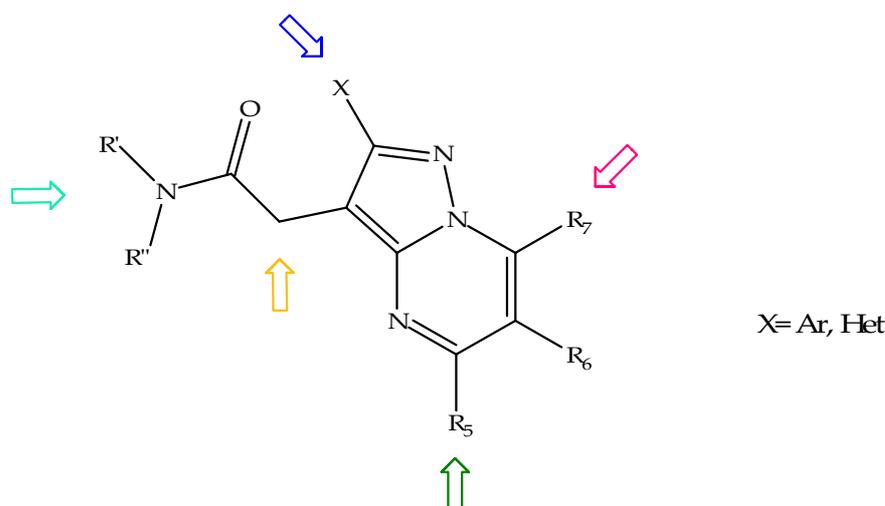
Schema 12



II.4- Relazioni Struttura-Affinità/ Attività

La capacità dei nuovi composti sintetizzati di interagire con il TSPO, meglio conosciuto come recettore benzodiazepinico periferico (PBR), è stata valutata tramite studi di binding su membrane mitocondriali di rene di ratto, utilizzando $[^3\text{H}]$ PK11195, come ligande marcato. Inoltre, per valutare la selettività dei composti sintetizzati nei confronti del PBR rispetto al CBR, sono stati eseguiti saggi di binding su omogenati di membrane corticali bovine e di ratto, usando come ligande marcato $[^3\text{H}]$ Ro15-1788; tutti i composti sono risultati selettivi al PBR. I valori di affinità dei ligandi saggiati, relativi alle percentuali di inibizione del binding dei ligandi triziati suddetti, vengono espressi come K_i (costante di inibizione). Gli studi di binding sono stati realizzati presso il Dipartimento di Psichiatria, Neurologia, Farmacologia e Biotecnologie dell'Università di Pisa, nel laboratorio della Prof.ssa Martini.

In letteratura sono riportate alcune proposte d'interazione ligande-recettore, che suggeriscono l'importanza di un sito accettore di legame ad idrogeno e alcuni gruppi lipofili quali elementi farmacoforici essenziali per l'interazione²⁸¹⁻²⁸⁴. Sulla base di queste informazioni, per quanto riguarda la serie dei derivati pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il acetamidici, sono state realizzate variazioni nelle posizioni 2, 3, e 5,7.



In analogia a quanto riportato in alcuni lavori presenti in letteratura⁹¹, in uno studio precedente sono stati variati i gruppi alchilici sull'azoto amidico, introducendo catene lineari e ramificate ed anche raggruppamenti aromatici. E' stato così possibile evidenziare un miglioramento dell'affinità per il sito di legame nell'allungamento delle catene da metilica, a *n*-butilica e *n*-pentilica, mentre l'introduzione

di due catene a sei atomi di carbonio aveva evidenziato un leggero decremento nei valori di affinità²³⁷. Per avere quindi un'ulteriore conferma di questo andamento ed individuare eventuali limiti delle cavità lipofile, dove tali sostituenti si collocano, è stato sintetizzato un composto recante sull'azoto amidico due catene lineari di otto atomi di carbonio, che mostra una completa perdita di riconoscimento recettoriale ($K_i = 1470 \pm 138$). Si nota perciò che la lunghezza ottimale risulta compresa fra catene a due e cinque termini.

L'introduzione di una catena alchilica ramificata sull'azoto amidico non era risultata una modifica vantaggiosa per l'affinità recettoriale, mentre l'inserimento di un anello fenilico si era dimostrata una sostituzione estremamente favorevole.

Questo risultato sembrava suggerire che, nella cavità lipofila alloggiante tale sostituente, vi fossero aminoacidi capaci di stabilizzare, tramite interazione di tipo π - π , il legame del ligande al recettore.

Questo fatto confermava alcuni dati presenti in letteratura, secondo i quali è essenziale l'occupazione di aree lipofile della proteina recettrice da parte di opportuni sostituenti, inseriti sull'azoto amidico, distanti dal carbonile che permette l'interazione elettrostatica necessaria per l'ancoraggio al recettore. E' infatti noto che la sostituzione di amidi terziarie con amidi secondarie e primarie risulta una modifica assolutamente sfavorevole, così come l'inserimento di amidi cicliche, in cui l'irrigidimento strutturale determina una completa perdita di riconoscimento recettoriale, probabilmente imputabile alla mancanza di flessibilità, necessaria per l'adattamento alla cavità del sito di legame²⁷³. Sempre per quanto riguarda la posizione 3, era stato eliminato, in precedenza, l'elemento spaziatore fra la funzione amidica ed il nucleo biciclico pirazolopirimidinico con il risultato di una forte riduzione della potenza di binding della carbossiamide derivante. Erano state introdotte inoltre, altre modifiche dirette alla sostituzione della funzione amidica, reputata elemento farmacoforico determinante per l'interazione recettoriale. Per esempio, la sostituzione del raggruppamento N,N-dietilamidico con una funzione esterea, aveva determinato un sostanziale decremento di affinità, anche se non completa perdita di riconoscimento recettoriale. A tale proposito Trapani *et al.*²⁷³ avevano ipotizzato che la maggiore libertà di rotazione del legame amidico, rispetto a quello estereo, poteva permettere a tali derivati di assumere più facilmente la conformazione ottimale richiesta per l'interazione elettrostatica (legame H) del gruppo carbonilico con la proteina recettoriale. Inoltre l'introduzione di un gruppo metilico sul metilene della catena acetamidica aveva portato ad una conseguente perdita di attività e selettività, probabilmente dovuta alla sfavorevole orientazione spaziale del carbonile per l'interazione con il recettore.

Come proseguimento dell'indagine sul ruolo della funzione amidica nell'interazione recettoriale, era stato realizzato un derivato recante in posizione 3 un raggruppamento N,N-dietiltioacetamidico²⁷⁶. Il composto aveva mantenuto affinità e selettività al TSPO, anche se è stato riscontrato un leggero decremento nella potenza di binding rispetto al corrispondente derivato 3-acetamidico⁹². Attraverso le

informazioni raccolte, si è perciò potuto ipotizzare che la catena acetamidica in posizione 3 abbia una funzione importante, ma non indispensabile per la formazione del legame ad idrogeno e che rappresenti una struttura ottimale, per direzionalità e lunghezza, necessaria per il fitting degli essenziali raggruppamenti lipofili con le cavità recettoriali. Per confermare tale ipotesi, oggetto di questa tesi è stata la sintesi di ligandi in cui è stata variata la lunghezza della catena laterale in posizione 3, per aggiunta di un atomo di carbonio, ed è stata introdotta un'insaturazione che conferisce parziale rigidità alla catena stessa. Sono stati mantenuti un sostituito arilico in posizione 2 e due gruppi metilici in posizione 5,7. E' stato visto che il composto **7j**, recante un'insaturazione nella catena laterale in posizione 3, mostra una buona affinità recettoriale ($K_i = 45,999 \pm 3 \text{ nM}$), mentre per il composto **8j**, analogo ridotto del **7j**, si osserva una drastica riduzione dell'affinità ($K_i = 0.855 \text{ }\mu\text{M}$).

Da ciò si può dedurre che, a livello della catena in 3, la minore lunghezza del doppio legame C=C (1,34 Å, sp^2) nel **7j** rispetto a quella del legame singolo C-C (1,54 Å, sp^3) nell'**8j**, sia un elemento determinante per il mantenimento del riconoscimento recettoriale, mentre appare favorevole all'interazione recettoriale l'irrigidimento realizzato. Infatti la distanza di legame fra la PAR e il carbonile del raggruppamento amidico presente nella LA (vedi figura II.21) risulta conservata nel composto **7j** rispetto al lead compound (analogo con catena acetamidica in 3), diversamente il caso del composto **8j** in cui la presenza di un metilene in più e la perdita dell'irrigidimento tra i due atomi di carbonio che precedono il carbonile fa cadere pesantemente il grado di affinità del ligande, pur mantenendo il riconoscimento recettoriale.

Il risultato incoraggiante, in termini di affinità recettoriale, del ligando **7j** ha portato a progettare la sintesi di una sottoclasse di composti recanti in 3 la catena propenamidica, con l'intenzione di variare il sostituito 2-arilico e con la prospettiva futura di realizzare analoghi di trifluorometilici in posizione 5,7.

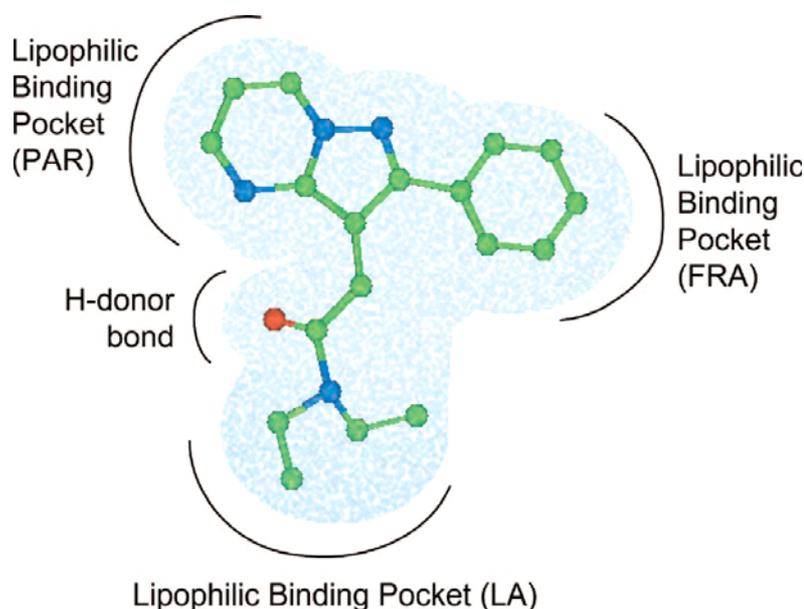


Fig. II.21- Ipotesi di legame al TSPO di una pirazolo[1,5-a]pirimidina¹⁶².

Tutte le modifiche realizzate in posizione 3 hanno permesso la creazione di un modello 3D-QSAR che è stato oggetto di una pubblicazione²⁷⁶ in cui è proposta l'interazione ligande-recettore per la serie pirazolopirimidinica, successivamente confermata da altri autori in una recentissima review¹⁶².

E' noto infatti che la funzione acetamidica nei ligandi PBR a struttura pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica è una prerogativa essenziale per l'interazione recettoriale, sebbene non influenzi in alcun modo la selettività PBR *vs* CBR.

Per quanto riguarda le sostituzioni sulla porzione pirimidinica è noto che opportuni sostituenti sono in grado di promuovere la selettività di questi ligandi per il PBR *vs* CBR. Studi precedenti hanno dimostrato che i composti privi di sostituenti nelle posizioni 5, 7 risultavano essere più affini al CBR *vs* PBR, mentre quelli che avevano almeno una di queste due posizioni occupate mostravano una discreta, ma simile affinità per entrambi i recettori. Invece i derivati contemporaneamente sostituiti nelle posizioni 5, 7 presentano i migliori valori di affinità e selettività per il PBR. I risultati ottenuti da questi studi confermano quelli osservati per i congeneri dell'Alpidem a struttura imidazo[1,2-*b*]piridinica dove le sostituzioni in 6 e 8, corrispondenti alle posizioni 5 e 7 della serie pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica, portano a composti 1000 volte più selettivi per il PBR *vs* CBR. Infatti ricordiamo che la sostituzione del nucleo imidazopiridinico dell'Alpidem con quello pirazolopirimidinico dei nostri derivati è una modifica bioisosterica⁹¹.

Allo scopo di indagare le caratteristiche delle cavità lipofile che alloggiavano i sostituenti in 5 e 7 in passato sono stati realizzati una serie di composti variamente disostituiti sull'anello pirimidinico con gruppi fenilici, metilici e trifluorometilici. In particolare è stato osservato che la disostituzione fenile/metile (5/7 e 7/5), così come quella CH₃/CF₃ (5/7 e 7/5), hanno portato a buoni valori di affinità. Tuttavia i risultati migliori a livello di affinità e selettività sono stati raggiunti con ligandi 5,7-disostituiti con gruppi metilici o trifluorometilici.

D'altra parte anche l'inserimento di un solo anello fenilico nella posizione 6 o 7 aveva portato a ligandi PBR selettivi, anche se con valori di affinità non troppo soddisfacenti (6-fenil derivato $K_i = 45.0 \pm 3.0$; 7-fenil derivato $K_i = 160.0 \pm 10.0$)⁹². Infine, l'inserimento contemporaneo di raggruppamenti fenilici nelle posizioni 5 e 7 si è dimostrato una sostituzione assolutamente sfavorevole, rivelando pertanto limiti spaziali della cavità lipofila, prossima alla PAR, che alloggia il sostituente. Inoltre è stata posta l'attenzione sull'effetto di sostituenti in posizione 6 corrispondente alla posizione 7 del nucleo imidazopiridinico dell'Alpidem, con la contemporanea presenza o assenza di sostituenti in 5 e 7. E' stato visto che l'introduzione di un ulteriore raggruppamento metilico od estereo in derivati 5,7-dimetil sostituiti non diminuiva i valori di affinità e selettività per il PBR; invece il composto 6-tossicarbonilico privo del metile in posizione 5 ha mostrato una notevole perdita di affinità recettoriale forse dovuta alla sfavorevole orientazione che tale gruppo funzionale assume nello spazio della cavità recettoriale. Comunque possiamo affermare che, a differenza del recettore

benzodiazepinico centrale, quello periferico presenta cavità lipofile di maggiori dimensioni capaci di ospitare selettivamente i sostituenti nelle posizioni 5 e 7, mentre la sostituzione in 6 può agire da discriminante tra i due recettori, probabilmente a causa di una zona di repulsione elettrostatica e/o sterica presente solo a livello del CBR⁹².

Sempre allo scopo di indagare i requisiti per il mantenimento della selettività al PBR e tentare di dimensionare le cavità lipofile, che alloggiavano i sostituenti della porzione pirimidinica, sono stati realizzati alcuni irrigidimenti strutturali coinvolgenti le posizioni 6 e 7. In precedenza sono state realizzate condensazioni con anelli alchilici a cinque e sei termini; tali modifiche non si sono dimostrate particolarmente vantaggiose.

Infine per quanto riguarda la posizione 2, in analogia alla porzione p-clorofenilica della struttura imidazopiridinica dell'Alpidem, è stato mantenuto un sostituito di natura aromatica, a libera rotazione, variamente funzionalizzato in para, meta ed orto. Generalmente la sostituzione sul fenile porta ad un incremento lieve, ma significativo, dei valori di affinità, tuttavia non sembra influenzare la selettività PBR *vs* CBR come nel caso delle sostituzioni in 5 e 7 sull'anello pirimidinico⁹². Per quanto concerne la natura del sostituito è stato già condotto un ampio screening per valutare le caratteristiche elettroniche (σ), di lipofilia (π) e di ingombro sterico (E_s) che garantiscano una migliore interazione recettoriale. All'interno della stessa serie di composti a struttura N,N-dietil(2-aril-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il) acetamidica la para- e la meta- sostituzione si sono rivelate assolutamente vantaggiose in termini di affinità per una vasta gamma di sostituenti anche molto diversi tra loro come gli alogeni (cloro, bromo, fluoro), il nitro, il metile ed il metossile i quali hanno mostrato valori di affinità sempre superiori di almeno 20-30 volte l'analogo non sostituito. Anche la sostituzione in posizione 2 con un anello α -tienilico è apparsa interessante, mentre quella con un β -tienilico sembra peggiorare l'affinità recettoriale.

Visti pertanto gli ottimi valori di binding che i ligandi 3-N,N-dietilacetamidici 2-aril o eteroaril sostituiti hanno mostrato finora, si è deciso inizialmente di conservare tali sostituzioni nella nostra linea sintetica, occupandosi prevalentemente del ruolo del fluoro, elemento risultato non solo vantaggioso nell'economia di uno sviluppo di radioligandi per la PET, se presente sul fenile in posizione 2, ma anche valido per un incremento di idrofilia e affinità per i ligandi pirazolo-pirimidinici, se presente nelle posizioni 5 e 7 del nucleo biciclico. Sono stati sintetizzati i composti **4a**, **4b**, **5d**, **6c**, **6'c** accomunati dalla sostituzione con atomi di fluoro sugli idrogeni del raggruppamento metilico in posizione 5,7 (**4a**, **4b**), ed anche sul sostituito 2(4-metossi)fenilico (**5d**, **6c**) o del solo sostituito 2(4-metossi)fenilico (**6'c**). I risultati di binding finora pervenuti mostrano un mantenimento dell'affinità (**4a** con $K_i = 9,69$ nM rispetto al corrispondente 5,7 dimetil derivato con $K_i = 8,78$ nM) o addirittura un miglioramento dell'affinità recettoriale (**4b** con $K_i = 0,79$ rispetto al corrispondente 5,7 dimetil derivato con $K_i = 1,4$ nM; **6c** con $K_i = 0,87$ rispetto al corrispondente 5,7 dimetil derivato con $K_i =$

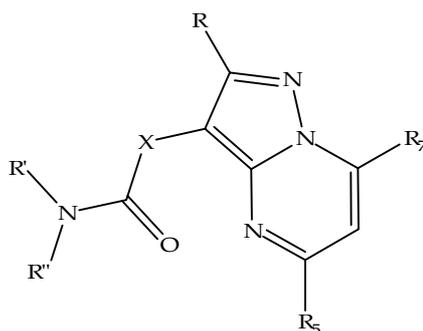
1.86 nM) dei derivati fluorometilici sintetizzati che incoraggiano a proseguire la linea sintetica in tale direzione favorevole all'ottenimento di ligandi al TSPO utili alla scansione PET.

Inoltre il risultato di binding riferibile al composto **7c** in cui il raggruppamento 2-fenilico è stato stericamente raddoppiato con l'introduzione di un raggruppamento 4-benzoilico, presenta un incremento sostanziale dell'affinità recettoriale fino a valori dell'ordine di 200 pM ($K_i = 0.2$ nM), incoraggiando la realizzazione di derivati che presentano nella 2-sostituzione raggruppamenti lipofili, aromatici e stericamente ingombrati.

Per l'estensione dello studio della posizione 2 è stato introdotto un eteroarile, il furan-2-il, per ottenere i composti **4e** e **4'e** recanti rispettivamente in posizione 5,7 raggruppamenti trifluorometilici e metilici.

I valori di binding relativi a questi due composti, riportati nella **tabella II.4.1** non presentano miglioramenti rispetto ai composti con sostituenti arilici pur conservando una buona affinità.

Tabella II.4.1



Composti	R	R'	R''	X	R ₅	R ₇	K _i (nM) ^a
4a	4-F-Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	9.69 ± 0.4
4b	4-Cl-Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	0.7 ± 0.01
4c	4-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	11 ± 1.3
4'c	4-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	5.8 ± 0.4
4d	4-Br-Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	1.2 ± 0.1
4e	Furan-2-il	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	73.9 ± 6
4'e	Furan-2-il	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	40.57 ± 3
4'f	2-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	310 ± 28
4g	3-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	11 ± 1.30
4'g	3-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	5.8 ± 0.4
4h	4-CH ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	3.1 ± 0.4
5c	4-OH-Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	6.5 ± 0.5
5'c	4-OH-Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	17,786 ± 1
6c	4-CF ₂ H-Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	0.87 ± 0.01
6'c	4-CF ₂ H-Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	1.86 ± 0.2
7'c	4-OCOPh-Ph	Et	Et	CH ₂	CH ₃	CH ₃	0.0232 ± 0.005
5d	4-CF ₃ -Ph	Et	Et	CH ₂	CF ₃	CF ₃	1.3 ± 0.12
5C	4-OCH ₃ -Ph	Et	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂	CH ₃	CH ₃	53,343 ± 3
6C	4-OCH ₃ -Ph	Et	CH ₂ CH ₂ F	CH ₂	CH ₃	CH ₃	2,726 ± 0.2
7j	Ph	Et	Et	CH=CH	CH ₃	CH ₃	45.99 ± 3
8j	Ph	Et	Et	CH ₂ -CH ₂	CH ₃	CH ₃	855 ± 12
6''c	4-OCH ₃ -Ph	Et	Et	CH=CH	CH ₃	CH ₃	<i>nt</i>
6''d	4-Br-Ph	Et	Et	CH=CH	CH ₃	CH ₃	<i>nt</i>
PK11195	-			-	-	-	9.3 ± 0.5

^a = i valori di K_i sono la media ± SEM di 5 determinazioni. I tests sono condotti utilizzando [³H]PK11195 (0.4 nM), come ligande marcato, in EtOH, come solvente; 0% CBR < 20.

Per quanto riguarda i composti finali **6k** (N,N-dietil-2-(2-(4-(2-fluoropropossi)fenil)-6,8-dimetilimidazo[1,2-*b*]piridazin-3-il)etanamide) e **6l** (N-etil-N-(2-fluoroetil)-2-(2-(4-metossifenil)-6,8-dimetilimidazo[1,2-*b*]piridazin-3-il)acetamide), non vengono mostrati i risultati biologici in quanto oggetto di una prossima pubblicazione in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof.M. Kassiou della University of Sydney, presso la quale sono stati sintetizzati questi stessi prodotti.

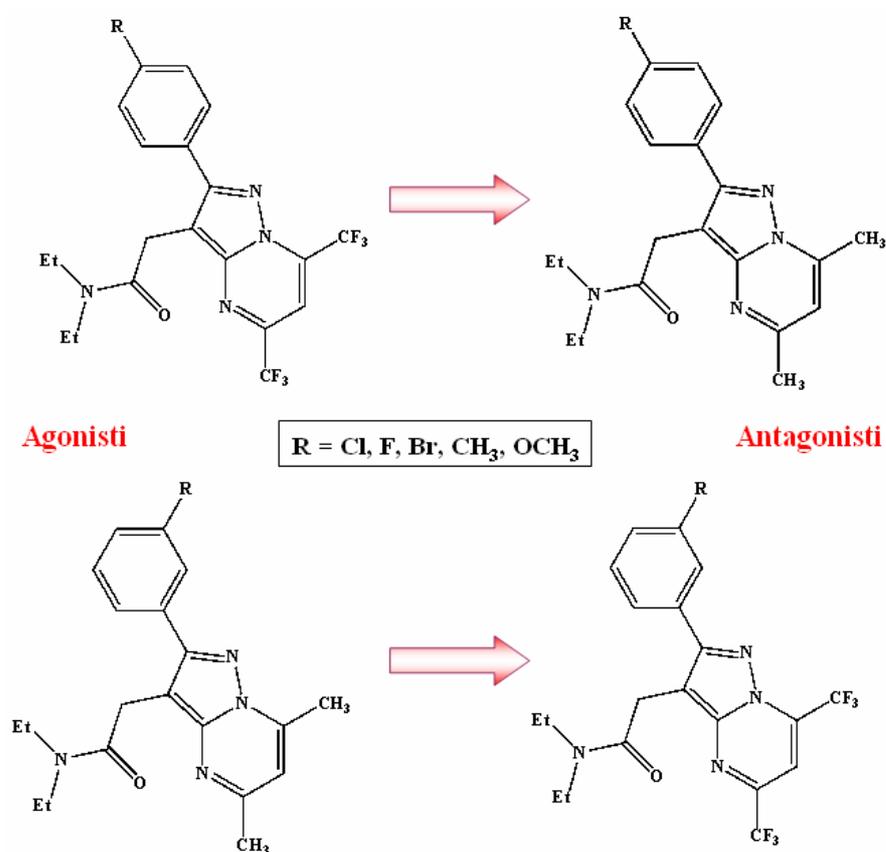
Nello studio finora condotto sui ligandi TSPO pirazolo-pirimidinici si era giunti ad osservare che le sostituzioni sul fenile in posizione 2, sebbene portino a minimi, ma significativi miglioramenti in termini di affinità e selettività (PBR *vs* CBR), sembrano avere una fondamentale importanza nel modificare il profilo farmacologico dei derivati di questa serie⁹². Come già detto in precedenza, i valori di affinità non hanno nessuna correlazione con l'attività intrinseca del ligande: infatti ligandi al PBR di simile potenza hanno mostrato differenti profili farmacologici nell'unico test *in vitro* considerato attendibile ad oggi. Si tratta di valutare la capacità dei ligandi saggiati di stimolare la formazione di pregnenolone dai mitocondri di cellule di glioma di ratto (C₆) rispetto ai livelli basali, usando il metodo proposto da Papadopoulos *et al.*³¹³. L'idea comunemente accettata dalla comunità scientifica è che i composti risultati positivi a tale test (incremento dei livelli di pregnenolone rispetto ai valori basali) sono agonisti, viceversa quelli risultati negativi vengono classificati come antagonisti o tutt'al più agonisti parziali. Ciò tuttavia non esclude la possibile esistenza di sottotipi recettoriali, ancora non dimostrata, ma fortemente supportata dalla notevole molteplicità funzionale tessuto-specifica del PBR, la quale potrebbe rappresentare l'elemento chiave per spiegare la diversa attività intrinseca di composti aventi simile affinità recettoriale.

Con questo intento è continuata l'indagine sui ligandi TSPO pirazolo-pirimidinici, oggetto di questo lavoro di tesi, allo scopo di chiarire quali siano le peculiarità strutturali che, nello scaffold pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico, provocano differenze di attività intrinseca o di profilo farmacologico ed eventualmente indagare l'esistenza di sottotipi recettoriali. Basandoci sui dati che ad oggi abbiamo a disposizione, possiamo individuare alcuni elementi discriminanti circa il profilo farmacologico della serie di ligandi sintetizzati. Dagli studi condotti è emerso che la serie recante in posizione 2 un gruppo p-toluilico, e contemporaneamente una funzione trifluorometilica in posizione 5, oltre ad una metilica in 7, tende a spostare il profilo da antagonista ad agonista rispetto all'analogo 5,7-dimetilato, probabilmente a causa della maggiore lipofilia e delle diverse caratteristiche elettroniche conferite al nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico.

Inoltre osservazioni sui profili farmacologici di derivati a struttura pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica, precedentemente sintetizzati all'interno del nostro gruppo di ricerca, hanno evidenziato che, per quanto concerne i derivati recanti in posizione 2 un anello fenilico variamente para-sostituito, il passaggio da una 5,7-dimetil- ad una 5,7-trifluorometil-sostituzione promuove il passaggio da un profilo antagonista ad agonista. Viceversa i derivati meta-sostituiti sull'anello fenilico in posizione 2

mostrano un trend struttura-attività intrinseca completamente opposto in relazione alla disostituzione con metili (agonisti) e con trifluorometili (antagonisti) nelle posizioni 5 e 7.

Quindi per il profilo farmacologico dei ligandi, la contemporanea presenza di raggruppamenti trifluorometilici in 5 e 7 appare dipendente dalla posizione dei sostituenti sul fenile in posizione 2 e indipendente dall'effetto elettronico e mesomerico dei sostituenti. Infatti, è stato visto che la sostituzione dei raggruppamenti metilici in 5 e 7, nel derivato 2-metafluorofenilico (avente la più alta capacità di stimolazione steroidogenica degli analoghi finora saggiati), in quello 2-metaclorofenilico, ma anche nel composto 2- α -tienilico, con due funzioni trifluorometiliche, porta ad una drastica inversione dell'attività intrinseca da forte agonista ad antagonista.



Sarà estremamente utile al fine di completare lo studio SAFIR/SAR iniziato sulla serie dei ligandi a struttura pirazolo[1,5-*a*]pirimidinica, valutare l'attività steroidogenica dei composti oggetto di questa tesi che hanno mostrato valori di affinità molto buoni.

II.5- Parte Sperimentale

II.5.1- Parte Sperimentale Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Gallenkamp e non sono corretti.

Le analisi elementari sono state realizzate per C, H, N con apparecchio Perkin Elmer 240 C e risultano \pm 0,4% dei valori teorici.

Lo spettro ^1H è stato realizzato con apparecchio Avance 400 Bruker e i chemical shifts sono stati riportati in δ (ppm). Le costanti di accoppiamento sono espresse in Hz.

I campioni sono stati controllati con T.L.C. realizzata con lastre Merck silica gel F 254. La separazione cromatografica è stata realizzata utilizzando gel di silice 60 (Merck, 70-230 mesh).

Procedura generale per la preparazione di 3-oxo-propionitrili 3-aril/eteroaril- sostituiti (1a-j)

In una sospensione omogenea di NaH al 60% (100mmol) in circa 30 ml di toluene anidro viene aggiunta, molto lentamente, una soluzione precedentemente preparata dell'opportuno estere benzoico (100 mmol) e di acetonitrile (100 mmol) in 20 ml di toluene; la reazione è riscaldata a 70°C sotto agitazione magnetica per circa 8 ore in condizioni di anidricità (tappo a CaCl_2). Spesso è necessario aggiungere qualche ml di isopropanolo per attivare tale condensazione. Si forma una sospensione molto densa che viene estratta in acqua, in cui il prodotto sottoforma di sale sodico è solubile, mentre l'estere che non ha reagito rimane nella parte organica. Spesso si assiste alla formazione del rispettivo acido dell'estere benzoico utilizzato, come prodotto secondario. Dopo aver ulteriormente purificato la soluzione acquosa mediante lavaggio con etere, questa viene acidificata con HCl concentrato, con la conseguente formazione di un precipitato giallo chiaro (1a-j), filtrato sotto vuoto e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 per eliminarne l'acidità residua. Il prodotto viene posto in essiccatore sotto vuoto con NaOH.

3-(4-fluorofenil)- 3-oxo-propionitrile (1a)³¹⁴

3-(4-clorofenil)- 3-oxo-propionitrile (1b)³¹⁵

3-(4-metossifenil)- 3-oxo-propionitrile (1c)³¹⁶

3-(4-bromofenil)- 3-oxo-propionitrile (1d)³¹⁴

3-(furan-2-il)- 3-oxo-propionitrile (1e)³¹⁵

3-(2-metossifenil)- 3-oxo-propionitrile (1f)³¹⁵

3-(3-metossifenil)- 3-oxo-propionitrile (1g)¹¹³

3-oxo-3-*p*-tolil-propionitrile (1h)³¹⁵

3-(3,4-diclorofenil)- 3-oxo-propionitrile (1i)³¹⁵**3-oxo-3-fenilpropionitrile (1j)**³¹⁷**Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-3-ciano-4-oxo-butanamidi 4-aril/eteroaril-sostituite (2a-h)**

Ad una soluzione di alcolato di sodio, precedentemente preparata con sodio metallico (10 mmol) in 20 ml di etanolo assoluto (reazione esotermica), viene aggiunta una soluzione dell'opportuno 3-oxo-propionitrile 3-aril sostituito (**1a-h**, 10mmol) in etanolo assoluto (30 ml). Successivamente si sgocciola rapidamente una soluzione di N,N-dietilcloroacetamide (10mmol) in etanolo assoluto (10 ml) con la formazione di una sospensione arancione; la reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂), per circa 30 ore. Il materiale inorganico che precipita viene eliminato per filtrazione e la soluzione alcolica viene evaporata sottovuoto; si ottiene una massa oleosa molto densa che contiene una grande quantità di impurezze oltre al prodotto desiderato (**2a-h**). Questo viene isolato tramite cromatografia su colonna, utilizzando un'opportuna miscela eluente.

N,N-Dietil-3-ciano-4-(4-fluorofenil)-4-oxo-butanamide (2a)⁹²**N,N-Dietil-3-ciano-4-(4-clorofenil)-4-oxo-butanamide (2b)**⁹²**N,N-Dietil-3-ciano-4-(4-metossifenil)-4-oxo-butanamide (2c)**⁹²**N,N-Dietil-3-ciano-4-(4-bromofenil)-4-oxo-butanamide (2d)**

Cristalli bianchi, resa 20%, p.f. 112°C, eluente: Toluene/EtOAc (8/3);

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.10 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.31 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.91 (dd, 1H, CH₂), 3.30-3.48 (m, 4H, 2CH₂[NEt₂]; 1H, CH₂), 4.98 (dd, 1H, CH), 7.69 (d, 2H, Ph), 7.96 (d, 2H, Ph).

N,N-Dietil-3-ciano-4-(furan-2-il)-4-oxo-butanamide (2e)

Olio di colore rosso-arancione, resa 28%, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.21 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.26 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.24 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.43 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 5.02 (s, 1H, CH), 5.23 (s, 2H, CH₂), 6.58-6.65 (m, 1H, furanile), 7.34-7.41 (m, 1H, furanile), 7.66-7.68 (m, 1H, furanile).

N,N-Dietil-3-ciano-4-(2-metossifenil)-4-oxo-butanamide (2f)

Olio denso giallo ocra, resa 10%, eluente: Toluene/EtOAc (8/3).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.06-1.44 (m, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.80-2.87 (dd, 1H, CH₂), 3.18-3.40 (m, 5H: 4H, 2CH₂[NEt₂]; 1H, CH₂), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 4.95 (dd, 1H, CH), 6.95 (m, 2H,Ph), 7.48 (m, 1H, Ph), 7.69 (m, 1H, Ph).

N,N-Dietil 3-ciano-4-(3-metossifenil)-4-oxo-butanamide (2g)

Olio denso giallo ocra, resa 9%, eluente: Toluene/EtOAc (8/3).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.05-1.32 (m, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.82-2.98 (dd, 1H, CH₂), 3.21-3.50 (m, 4H, 2CH₂[NEt₂]; 1H, CH₂), 4.10 (s, 3H, OCH₃), 5.09 (dd, 1H, CH), 6.90-7.16 (m, 3H, Ph), 7.35-7.50 (m, 1H, Ph).

N,N-Dietil 3-ciano-4-(p-toluil)-4-oxo-butanamide (2h)

Olio denso giallo ocra, resa 22%, eluente: Toluene/EtOAc (8:3).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.14-1.31 (m, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.86 (dd, 1H, CH₂), 3.28-3.48 (m, 4H, 2CH₂[NEt₂]; 1H, CH₂), 4.99-5.12 (dd, 1H, CH), 7.31 (d, 2H, Ph), 7.98 (d, 2H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-[3-aminopirazol-4-il]acetamidi 4-aril sostituite (3a-h)

Ad una soluzione dell'opportuna N,N-Dietil-3-ciano-4-oxo-butanamide 4-aril sostituita (**2a-d**, 10 mmol) in etanolo (40 ml) si aggiunge idrazina monoidrata in leggero eccesso (15 mmol) e acido acetico (1 ml) come catalizzatore. La reazione è condotta a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 4 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione alcolica viene evaporata sottovuoto ed il residuo oleoso ottenuto (**3a-h**) viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando un'opportuna miscela eluente.

N,N-Dietil-[3-amino-5-(4-fluorofenil)pirazol-4-il]acetamide (3a)⁹²**N,N-Dietil-[3-amino-5-(4-clorofenil)pirazol-4-il]acetamide (3b)⁹²****N,N-Dietil-[3-amino-5-(4-metossifenil)pirazol-4-il]acetamide (3c)⁹²****N,N-Dietil-[3-amino-5-(4-bromofenil)pirazol-4-il]acetamide (3d)**

Cristalli bianchi, resa 71%, p.f. 178°C, eluente CHCl₃/MeOH (10/1).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.00 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.12 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.10 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.37 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.1-3.45 (s slargato, 2H, NH₂ scambiabile), 3.53 (s, 2H, CH₂), 7.38 (d, 2H, Ph), 7.60 (d, 2H, Ph).

N,N-dietil-2-(3-amino-5-(furan-2-il)pirazol-4-il)acetamide (3e)

Olio di colore rosso scuro, resa 80%, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1).

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 1.14-1.19 (m, 6H, 2 CH₃[NEt₂]), 3.38-3.40 (m, 4H, 2CH₂[NEt₂]), 3.86 (s, 2H, CH₂), 6.56-6.58 (dd, 1H, furanile), 7.36-7.37 (dd, 1H, furanile), 7.49-7.55 (dd, 1H, furanile).

N,N-Dietil-[3-amino-5-(2-metossifenil)pirazol-4-il]acetamide (3f)

Cristalli color bianco avorio, resa 66%, p.f. 176°C, eluente CHCl₃/MeOH (10/1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 0.95 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 1.12 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 3.07 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.38 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.47 (s, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.65-4.25 (s slargato, 2H, NH_2 scambiabile), 6.98-7.43 (m, 4H, Ph).

N,N-Dietil-[3-amino-5-(3-metossifenil)pirazol-4-il]acetamide (3g)

Cristalli bianchi, resa 68%, p.f. 129°C , eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10/1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 0.96 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 1.09 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 3.08 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.37 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.57 (s, 2H, CH_2), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 4.06-4.35 (s slargato, 2H, NH_2 scambiabile), 6.96-7.01 (m, 3H, Ph), 7.38 (m, 1H, Ph).

N,N-Dietil-[3-amino-5-(p-toluil)pirazol-4-il]acetamide (3h)

Cristalli color bianco avorio, resa 70%, p.f. 217°C , eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10/1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 0.95 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 1.10 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.08 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.35 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.57 (s, 2H, CH_2), 3.6-3.95 (s slargato, 2H, NH_2 scambiabile), 7.25-7.35 (2d, 4H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-[5,7-ditri fluorometilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamidi 2-aril sostituite (4a-e, 4g-h)

Ad una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (**3a-e**, **3g-h**, 1 mmol) in etanolo assoluto (10 ml) viene aggiunto 1,1,1,5,5,5-esafluoropentan-2,4-dione (1 mmol) e la reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica, in condizioni di anidrità (tappo a CaCl_2) per circa 4 ore. Dopo raffreddamento la soluzione alcolica viene evaporata sottovuoto ed il residuo solido ottenuto è purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando un'opportuna miscela eluente.

N,N-Dietil-[2-(4-fluorofenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4a)⁹²

N,N-Dietil-[2-(4-clorofenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4b)⁹²

N,N-Dietil-[2-(4-metossifenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4c)⁹²

N,N-Dietil-[2-(4-bromofenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4d)

Cristalli gialli, resa 90%, p.f. 183°C , solvente di cristallizzazione: Etanolo.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 1.18 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 1.38 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_2]$), 3.48 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 3.60 (q, 2H, $\text{CH}_2[\text{NEt}_2]$), 4.08 (s, 2H, CH_2), 7.42 (s, 1H, H-6), 7.63 (d, 2H, Ph), 7.85 (d, 2H, Ph).

N,N-dietil-2-(2-(furan-2-il)-5,7-bis(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)acetamide (4e)

Solido giallo acceso, resa 30%, p.f.: 136-137°C, solvente di cristallizzazione: Etere Dietilico, eluente: Toluene/EtOAc/AcOH (8/2/1).

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 1.01-1.04 (t, 3H, CH₃[NEt₃]), 1.20-1.30 (t, 3H, CH₃[NEt₃]), 3.28-3.32 (q, 2H, CH₂[NEt₃]), 3.57-3.59 (q, 2H, CH₂[NEt₃]), 4.11 (s, 2H, CH₂), 6.72-6.73 (m, 1H, furanile), 7.05-7.06 (m, 2H, furanile), 7.92 (m, 1H, furanile), 8.04 (s, 1H, H-6).

N,N-Dietil-[2-(p-toluil)-5,7-ditrifluorometilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4g)

Cristalli gialli, resa 95%, p.f. 159°C, solvente di cristallizzazione: Etanolo.

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.15 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.35 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.47 (s, 3H, CH₃), 3.45 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.58 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 4.09 (s, 2H, CH₂), 7.30 (s, 1H, H-6) 7.37 (d, 2H, Ph), 7.80 (d, 2H, Ph).

N,N-Dietil-[2-(3-metossifenil)-5,7-ditrifluorometilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4h)

Cristalli gialli, resa 82%, p.f. 115-117°C, Toluene/EtOAc (8/2).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.17 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.27 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.43 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.49 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 4.07 (s, 2H, CH₂), 7.08 (d, 1H, H-6) 7.40-7.58 (m, 4H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-[5,7-dimetilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamidi 2-aril sostituite (4'c, 4'e-g)

Ad una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (**3c**, **3e-g**, 1 mmol) in etanolo assoluto (10 ml) viene aggiunto 2,4-pentandione (1 mmol) e la reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂), per circa 4 ore. Dopo raffreddamento la soluzione alcolica viene evaporata sottovuoto ed il residuo solido o oleoso ottenuto è purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando un'opportuna miscela eluente.

N,N-Dietil-[2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4'c)⁹²**N,N-Dietil-2-(2-(furan-2-il)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)acetamide (4'e)**

Solido giallo chiaro, resa 30%, p.f.: 194-196°C, solvente di cristallizzazione: Etere Dietilico, eluente: CH₂Cl₂/MeOH(10/1).

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 0.99-1.03 (t, 3H, CH₃(NEt₃)), 1.21-1.24 (t, 3H, CH₃(NEt₃)), 2.50 (s, 3H+DMSO, CH₃-5), 2.69 (s, 3H, CH₃-7), 3.26-3.28 (q, 2H, CH₂(NEt₃)), 3.54-3.55 (q, 2H, CH₂(NEt₃)), 3.93 (s, 2H, CH₂), 6.64 (m, 1H, furanile), 6.86-6.88 (m, 2H, furanile + H-6), 7.79 (m, 1H, furanile).

N,N-Dietil-[2-(2-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4'f)

Cristalli color bianco avorio, resa 92%, p.f. 180°C, solvente di cristallizzazione: Acqua/Etanolo (1:1)

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.05 (m, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.63 (s, 3H, 5-CH₃), 2.77 (s, 3H, 7-CH₃), 3.31 (m, 4H, 2CH₂[NEt₂]), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 2H, CH₂), 6.58 (s, 1H, H-6), 6.97-7.09 (m, 2H, Ph), 7.38-7.52 (m, 2H, Ph).

N,N-Dietil-[2-(3-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (4'g)

Cristalli color bianco avorio, resa 85%, p.f. 130°C, eluente: CHCl₃/MeOH (10/1).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.17 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.25 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.60 (s, 3H, 5-CH₃), 2.78 (s, 3H, 7-CH₃), 3.41 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.50 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 2H, CH₂), 6.58 (s, 1H, H-6), 6.96 (m, 1H, Ph), 7.39 (m, 3H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-[2-(4-idrossifenil)pirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide 5,7 sostituite (5c, 5'c)

I composti **5c** e **5'c** sono stati ottenuti mediante demetilazione sul sostituente para-metossilico dei composti **4c** e **4'c** (1 mmol) in HBr al 48% (20ml). La reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica, per circa 4 ore. Dopo raffreddamento della soluzione, il precipitato giallo formatosi nell'ambiente di reazione viene filtrato sottovuoto e lavato con acqua per eliminare l'acidità residua. I prodotti ottenuti (**5c,5'c**) vengono purificati mediante cromatografia su colonna.

N,N-Dietil-[2-(4-idrossifenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (5c)

Cristalli gialli, resa 88%, p.f. 189°C, eluente : CH₂Cl₂ /MeOH (10/1).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.26 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.39 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.48 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.64 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 4.12 (s, 2H, CH₂), 6.86 (d, 2H, Ph), 7.42 (s, 1H, H-6), 7.78 (d, 2H, Ph).

N,N-Dietil-[2-(4-idrossifenil)-5,7-dimetilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (5'c)

Cristalli gialli, resa 94%, p.f. 239°C, eluente : CH₂Cl₂ /MeOH (10/1).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.04 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.18 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.49 (s, 3H, 5-CH₃), 2.69 (s, 3H, 7-CH₃), 3.29 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.51 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.82 (s, 2H, CH₂), 6.83 (d, 2H, Ph), 6.89 (s, 1H, H-6), 7.55 (d, 2H, Ph), 9.63 (s, 1H, -OH scambiabile).

Procedura generale per la preparazione di N,N-Dietil-[2-(4-difluorometossifenil)pirazol[1,5-*a*]]pirimidin-3-il]acetamide 5,7 sostituite (6c, 6'c)

Ad una miscela dell'opportuna di N,N-Dietil-[2-(4-idrossifenil)pirazol[1,5-*a*]]pirimidin-3-il]acetamide 5,7 sostituita (5c, 5'c; 1 mmol), K₂CO₃ (50 mmol), CH₃CN (2ml) e H₂O (8ml) si aggiunge il 2-Cl-2,2difluoroacetofenone (5 mmol). La reazione è condotta a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica, per 36 h. Al termine della reazione i prodotti ottenuti (6c e 6'c con 7'c, prodotto secondario) vengono estratti in etile acetato. La fase organica è successivamente lavata con una soluzione di NaOH al 10% per allontanare eventuale prodotto di partenza residuo, anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata sotto vuoto. Si ottiene un solido che viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando un'opportuna miscela eluente o per cristallizzazione.

N,N-Dietil-[2-(4-difluorometossifenil)-5,7-ditrifluorometilpirazol[1,5-*a*]]pirimidin-3-il]acetamide (6c)

Solido giallo, resa 18%, p.f. 99°C, eluente :Toluene/EtOAc (8:4).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.01 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.24 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.30 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.55 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 4.07 (s, 2H, CH₂), 7.25 (d, 2H, Ph), 7.88 (d, 2H, Ph), 7.51, 7.2, 7.4 (3s, segnale caratteristico del -OCF₂H), 8.1 (s, 1H, H-6).

N,N-Dietil-[2-(4-difluorometossifenil)-5,7-dimetilpirazol[1,5-*a*]]pirimidin-3-il]acetamide (6'c)

Il composto 6'c è stato ottenuto a partire da 5'c e purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂ /MeOH = 10:0.5 per separarlo da 5'c e, successivamente, per cristallizzazione in etere isopropilico per separarlo da 7'c.

Solido giallo, resa 15%, p.f. 95°C, eluente per separarlo da 5'c: CH₂Cl₂ /MeOH (10/0.5), solvente di cristallizzazione per separarlo da 7'c: Etere Disopropilico.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.00 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.21 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.50 (s, 3H, 5-CH₃), 2.71 (s, 3H, 7-CH₃), 3.27 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.54 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.88 (s, 2H, CH₂), 6.89 (s, 1H, H-6), 7.27 (d, 2H, Ph), 7.83 (d, 2H, Ph), 7.10, 7.29, 7.5 (3s, segnale caratteristico dei -OCF₂H).

N,N-Dietil-[2-(4-fenilbenzoato)-5,7-dimetilpirazol[1,5-*a*]]pirimidin-3-il]acetamide (7'c)

Cristalli bianchi, resa 30%, p.f. 184°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.00 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.21 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 2.50 (s, 3H, 5-CH₃), 2.71 (s, 3H, 7-CH₃), 3.27 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.54 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.88 (s, 2H, CH₂), 6.89 (s, 1H, H-6), 7.41 (d, 2H, 2-Ph), 7.65 (t, 2H, -OCOPh), 3.66 (t, 2H, -OCOPh), 7.89 (d, 2H, 2-Ph), 8.16 (d, 2H, -OCOPh).

N,N-Dietil-[2-(4-trifluorometilfenil)-5,7-ditri fluorometilpirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]acetamide (5d)

Il composto bromurato **4d** (1 mmol) viene solubilizzato in DMF (10 mL) e alla soluzione si aggiunge CuI (1 mmol), KF spray-dried (1 mmol) e il reattivo trifluorometilante clorodifluoroacetato di metile (2 mmol). La reazione è condotta per circa 10 ore in corrente di N₂, alla temperatura di 120°C, sotto agitazione magnetica e in condizioni di totale anidricità (tappo a CaCl₂)²¹. Una volta raffreddata, la soluzione viene trattata con acqua, in cui si trasferiscono i sali inorganici e la DMF, ed etere dietilico, in cui si solubilizza il prodotto desiderato **5d**. Dopo varie estrazioni viene evaporata sottovuoto la parte organica e si ottiene un solido che viene purificato mediante cromatografia su colonna.

Cristalli gialli, resa 70%, p.f. 175°C, eluente: Toluene/EtOAc (8/3).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.18 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 1.35 (t, 3H, CH₃[NEt₂]), 3.43 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.60 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 4.08 (s, 2H, CH₂), 7.41 (s, 1H, H-6), 7.50 (d, 1H, Ph), 7.60-7.71 (m, 1H, Ph), 7.81-7.95 (m, 2H, Ph).

Procedura per la preparazione del 3,4-diclorofenil-3-oxopropanale (II)

Ad una soluzione di idruro di sodio (18 mmol) in toluene anidro viene aggiunta, sotto agitazione magnetica, goccia a goccia, una soluzione di formiato di etile (8 mmol) e 3,4-dicloroacetofenone (16 mmol) in toluene anidro. La reazione è condotta sotto agitazione magnetica per circa 2 ore, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂) e sotto leggero riscaldamento (circa 40 °C, reazione esotermica). E' necessario aggiungere qualche ml di metossietanolo per attivare la reazione. Dopo raffreddamento il precipitato viene recuperato per filtrazione sotto vuoto, lavato con etere dietilico e fatto asciugare in stufa.

Solido rosa, resa 98%. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 3.66 (s, 2H, CH₂), 7.65 (d, 1H, Ph), 7.71 (d, 1H, Ph), 7.84-7.86 (s, 1H, Ph), 11.52 (s, 1H, -CHO).

Procedura per la preparazione del 5-(3,4-diclorofenil)isossazolo (2I).

Il composto **II** (15 mmol) viene solubilizzato in EtOH (30 ml) e alla soluzione si aggiunge NH₂OH.HCl (23 mmol), la reazione è tenuta a riflusso, sotto agitazione magnetica per circa 5 ore. Dopo raffreddamento dalla sospensione viene eliminato l'alcool tramite evaporazione sotto vuoto ed il residuo solido ottenuto viene lavato con H₂O, recuperato per filtrazione sottovuoto.

Solido avorio, resa 95%, p.f. 173°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7.22 (s, 1H, CH), 7.65 (d, 1H, Ph), 7.71 (d, 1H, Ph), 7.84-7.86 (s, 1H, Ph), 8.72 (s, 1H, CH).

Procedura per la preparazione del 3-(3,4-diclorofenil)-3-oxo-propionitrile (1i) per idrolisi del 5-(3,4diclorofenil)isossazolo (2i)

Il composto **2i** (10 mmol) viene idrolizzato in ambiente basico con Na^o (12 mmol) in MeOH (50 ml) a refluxo, in condizioni anidre (tappo a CaCl₂), per circa 3 ore. Dopo raffreddamento la soluzione alcolica viene evaporata sottovuoto ottenendo un residuo solido. Il composto **1i**, sotto forma di sale sodico, viene solubilizzato in H₂O, e purificato da eventuali residui solidi per filtrazione sotto vuoto. La soluzione acquosa viene acidificata con HCl e il prodotto viene estratto in etere dietilico. La soluzione organica viene anidrificata per aggiunta di Na₂SO₄ e, dopo aver allontanato l'essiccante per filtrazione, portata a secco sotto vuoto ottenendo così un residuo ceroso arancione. Tale residuo ceroso viene trattato con etere diisopropilico ottenendo così un precipitato bianco recuperato per filtrazione sotto vuoto e lasciato asciugare in stufa.

Solido avorio, resa 55%, p.f. 122°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 4.08 (s, 2H, CH₂), 7.64 (d, 1H, Ph), 7.78 (d, 1H, Ph), 8.05 (s, 1H, Ph).

Procedura per la preparazione dell'acido (3-ciano-4-oxo) 4-metossifenil butanoico (2C).

Ad una soluzione di LiOH.H₂O (20 mmol) in 100 mL di etanolo assoluto si aggiungono il 3-(4-metossifenil)-3-oxo-propionitrile (**1c**, 20 mmol) ed una soluzione di iodoacetato di litio (25 mmol), precedentemente preparata solubilizzando in 60 mL di etanolo assoluto acido iodoacetico e LiOH.H₂O. La reazione è condotta a refluxo sotto agitazione magnetica, in condizioni di anidrità (tappo a CaCl₂), per circa 24 ore. Una volta raffreddata, la soluzione etanolica viene evaporata sottovuoto; il residuo oleoso ottenuto viene trattato con acqua, in cui si solubilizza il prodotto desiderato **2C** in forma salina, e tale soluzione lavata con etere dietilico. Successivamente la soluzione acquosa viene acidificata con HCl concentrato ed il precipitato oleoso formatosi viene estratto con etere dietilico. L'acido viene estratto nuovamente dal solvente organico con una soluzione satura di NaHCO₃; questa viene acidificata con HCl concentrato e il precipitato nuovamente estratto con etere dietilico. Tale soluzione viene anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata sottovuoto. Si ottiene un prodotto grezzo che viene purificato su colonna cromatografica con un opportuna miscela eluente o tramite semplice cristallizzazione.

Cristalli beige, resa 25%.

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 3.00 (dd, 1H, CH₂), 3.29 (dd, 1H, CH₂), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 4.70-4.81 (m, 1H, CH), 7.42-7.76 (m, 2H, Ph), 8.00-8.15 (m, 2H, Ph), 8.70 (s slargato, 1H, OH scambiabile).

Procedura per la preparazione dell'acido [3-aminopirazol-4-il]acetico 5-(4-metossifenil)sostituito (3C).

Ad una soluzione del composto **2C** (10 mmol) in etanolo (40 mL) si aggiunge idrazina monoidrata in

leggero eccesso (15 mmol) e acido acetico (1,5 mL) come catalizzatore. La reazione è condotta a riflusso sotto agitazione magnetica per circa 4 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione etanolica viene portata quasi a secco e successivamente, aggiungendo acqua goccia a goccia, si forma un precipitato che viene filtrato sottovuoto. Quindi il prodotto grezzo viene purificato per cristallizzazione con H₂O o tramite cromatografia su colonna utilizzando un'opportuna miscela eluente.

Cristalli avorio, resa 38%, p.f. 202°C, ¹H-NMR (DMSO) δ ppm: 3.38 (s, 2H, CH₂), 4.87 (s slargato, 2H, NH₂ scambiabile), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.70-4.81 (m, 1H, CH), 6.99 (m, 2H, Ph), 7.31 (m, 2H, Ph).

Procedura per la preparazione dell'acido 2-(2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acetico (4C).

Ad una soluzione dell'aminopirazolo **3C** (1 mmol) in etanolo assoluto (10 mL) viene aggiunto 2,4-pentandione (1 mmol) e la reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione magnetica, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂), per circa 4 ore. Dopo raffreddamento la soluzione etanolica viene evaporata sottovuoto ed il residuo solido ottenuto è purificato tramite cristallizzazione con acqua.

Cristalli gialli, resa 81%, p.f. 220°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2,58 (s, 3H, 5-CH₃), 2,78 (s, 3H, 7-CH₃), 3,85 (s, 2H, CH₂), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 6,50 (s, 1H, H-6), 6,99 (m, 2H, Ph), 7,80 (m, 2H, Ph), 9,35 (s slargato, 1H, OH scambiabile).

Procedura per la preparazione di N-etil-N-(2-idrossietil)-2-(2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acetamide (5C).

Una soluzione del composto **4C** (1 mmol) e trietanolamina (3 mmol) in THF anidro è tenuta sotto agitazione magnetica a -10°C, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂), per 30 minuti. Alla soluzione viene aggiunto isobutilcloroformiato (1.1 mmol) mantenendo sempre la temperatura di -10°C per 1 ora. Successivamente si aggiunge N-etil,N-etanol-amina (1.1 mmol) e la reazione è mantenuta a temperatura ambiente per circa 3 ore. Il materiale inorganico che precipita viene eliminato per filtrazione e la soluzione evaporata sottovuoto; si ottiene un solido (**5C**) purificato per lavaggio con una soluzione satura di NaHCO₃, estrazione con EtOAc e successiva cromatografia su colonna.

Cristalli bianchi, resa 25%, p.f. 162°C, eluente CH₂Cl₂/MeOH (10/0.5)

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.04-1.12 (m, 3H, -CH₃[NEt₂]), 2.42-2.44 (s, 3H, 5-CH₃), 2.63 (s, 3H, 5-CH₃), 3.35-3.43 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.44-3.45 (t, CH₂, CH₂CH₂OH), 3.55-3.56 (t, CH₂, CH₂CH₂OH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 2H, CH₂), 6.84 (s, 1H, H-6), 6.89-6.91 (d, 2H, Ph), 7.61-7.63 (m, 2H, Ph).

Procedura per la preparazione di N-etil-N-(2-fluoroetil)-2-(2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)acetamide (6C).

Una soluzione del composto 5C (10 mmol) in DCM anidro (3 ml) viene aggiunta a temperatura ambiente, in corrente di N₂ ad una soluzione di Deoxofluor (11 mmol) in DCM (2ml) e lasciata sotto agitazione per 15h. Quando la reazione è terminata, la miscela di reazione viene lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ ed estratta con DCM, essiccata con Na₂SO₄ e portata a secco sotto vuoto.

Il prodotto viene purificato tramite cromatografia su colonna.

Cristalli bianchi, resa 70%, p.f. 188°C, eluente Toluene/EtOAc (8/5).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.04-1.12 (m, 3H, -CH₃[NEt₂]), 2.42-2.44 (s, 3H, 5-CH₃), 2.63 (s, 3H, 5-CH₃), 3.35-3.43 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.65-3.68 (dd, 2H, CH₂CH₂F), 3.70-3.76 (dd, 2H, CH₂CH₂F), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 2H, CH₂), 6.84 (s, 1H, H-6), 6.89-6.91 (d, 2H, Ph), 7.61-7.63 (m, 2H, Ph).

Procedura per la preparazione di 3-fenil-5-aminopirazolo (2j)

Descritta in letteratura³¹⁸

Procedura per la preparazione della 5,7-dimetil-2-fenilpirazolo[1,5-a]pirimidina (3j)

Descritta in letteratura¹¹⁶

Procedura per la sintesi della 3-iodio-5,7-dimetil-2-fenilpirazolo[1,5-a]pirimidina (4j)

Ad una soluzione del composto 3j (10mmol) in THF (20 ml) viene aggiunta la N-iodiosuccinimide (NIS) (11 mmol). La reazione è condotta a riflusso, sotto agitazione magnetica per circa 24 h. Dopo raffreddamento la miscela di reazione viene trattata con una soluzione satura di Na₂S₂O₃ (tiosolfato di sodio), agente riducente che, ossidandosi a solfato, riduce lo iodio della NIS a ione ioduro con formazione della succinimide solubile in acqua ed eliminata con un lavaggio successivo. La fase organica viene anidrificata aggiungendo Na₂SO₄ e, dopo aver allontanato l'essiccante, il solvente viene evaporato sotto vuoto ottenendo così un solido giallo (4j). La reazione non porta alla formazione di prodotti secondari e il prodotto ottenuto non necessita di purificazione.

Solido giallo, resa 80%, p.f. 142°C.

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 2.67 (s, 3H, 5-CH₃), 2.81 (s, 3H, 7-CH₃), 6.65 (s, 1H, H-6), 7.45-7.52 (m, 3H,Ph), 8.044 (d, 2H, Ph).

Procedura per la sintesi della 3-metilacrilato-5,7-dimetil-2-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidina (5j) (reazione di Heck)

Ad una soluzione del composto **4j** (10 mmol) in MeCN (100 ml) si aggiunge il catalizzatore (Pd/C, 10% in peso), la trietilamina (2,8ml) e l'acrilato di metile (5 mmol) a refluxo, sotto agitazione magnetica e in atmosfera inerte per alcune ore. Dopo raffreddamento la miscela di reazione viene filtrata sotto vuoto, si raccoglie un precipitato (prodotto di partenza) e una soluzione intensamente colorata di rosso. Tale soluzione è evaporata sotto vuoto ottenendo così il prodotto **5j**.

Cristalli rossi, resa 80%, p.f. 215°C, solvente di cristallizzazione: MeCN.

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 2.67 (s, 3H, 5-CH₃), 2.80 (s, 3H, 7-CH₃), 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 6.72 (s, 1H, H-6), 7.29 (d, 1H, CH vinilico), 7.4-7.6 (m, 3H, Ph), 7.7-7.8 (m, 2H, Ph), 7.9-8.1 (d, 1H, CH vinilico).

Procedura per la sintesi della 5,7-dimetil-2-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-acido acrilico (6j)

Ad una soluzione del composto **5j** (3 mmol) in MeOH (60 ml) vengono aggiunti 30 ml di NaOH 2,5 N. La reazione è lasciata a refluxo, sotto agitazione magnetica per 36 ore. Dopo raffreddamento la soluzione viene acidificata, aggiungendo HCl, inducendo così la precipitazione dell'acido (**6j**). Il precipitato giallo è recuperato mediante filtrazione sotto vuoto e purificato per cristallizzazione.

Cristalli gialli, resa 58%, p.f. 250°C, solvente di cristallizzazione: Etanolo.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.62 (s, 3H, 5-CH₃), 2.74 (s, 3H, 7-CH₃), 6.99 (d, 1H, CH vinilico), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.5-7.7 (m, 6H: 5H, Ph; 1H, CH vinilico), 12.07 (s, 1H, OH scambiabile).

Procedura per la sintesi della N,N-Dietil-[2-fenil-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il]acrilamide (7j)

Una soluzione del composto **6j** (1 mmol) e trietanolamina (3,5 mmol) in THF anidro è tenuta sotto agitazione magnetica a -10°C, in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂), per 30 minuti. Alla soluzione viene aggiunto isobutilcloroformiato (1.1 mmol) mantenendo sempre la temperatura di -10°C per 1 ora. Successivamente si aggiunge dietilamina (1.2 mmol) e la reazione è mantenuta a temperatura ambiente per circa 1 giorno. Il materiale inorganico che precipita viene eliminato per filtrazione e la soluzione evaporata sottovuoto; si ottiene un residuo oleoso. Il composto (**7j**) viene purificato tramite cromatografia su colonna.

Cristalli gialli, resa 12%, p.f. 125°C, eluente: CH₂Cl₂/MeOH (10/0.5).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.27 (m, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.65 (s, 3H, 5-CH₃), 2.81 (s, 3H, 7-CH₃), 3.53 (pseudo q, 4H, 2CH₂[NEt₂]), 6.7 (s, 1H, H-6), 7.28-7.53 (m, 3H: 2H, Ph; 1H, CH vinilico), 7.79-7.82 (m, 3H: 2H, Ph; 1H, CH vinilico), 8.1 (d, 1H, Ph).

Riduzione catalitica per l'ottenimento della N,N-Dietil-[2-fenil-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il]propanamide (8j)

Il composto **8j** è stato ottenuto per idrogenazione catalitica del composto **7j**. Ad una soluzione della N,N-Dietil-[2-fenil-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il]acrilamide (**7j**, 1 mmol) in EtOH assoluto (30 ml) viene aggiunto, sotto agitazione magnetica, il catalizzatore Pd/C al 10% (0.1g). L'idrogenazione catalitica è stata effettuata utilizzando l'apparecchio di Parr a 60 psi per circa 2 ore.

Il catalizzatore viene allontanato per filtrazione su filtro a pieghe e la soluzione viene evaporata sotto vuoto. Il solido giallo scuro recuperato viene purificato mediante cromatografia su colonna.

Cristalli bianchi, resa 80%, p.f. 210-215°C, eluente: CH₂Cl₂ /MeOH (10/0.5).

¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.11 (t, 6H, 2CH₃[NEt₂]), 2.67 (s, 3H, 5-CH₃), 2.79 (t, 2H, CH₂ catena), 2.81 (s, 3H, 7-CH₃), 3.31-3.4 (m, 6H: 4H, 2CH₂[NEt₂]; 2H, CH₂ catena), 6.57 (s, 1H, H-6), 7.42-7.52 (m, 3H, Ph), 7.84 (d, 2H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di 4-aminopirazoli-3-arilsostituiti (2''c,d).

In un pallone da 150 ml si mette il prodotto di partenza (**1c,d**, 20mmol) a cui si aggiungono etanolo (quanto basta fino allo scioglimento) e successivamente acido acetico (10 ml) e idrazina idrata (40mmol). Si lascia tutto a riflusso sotto agitazione per 3 ore. Dopo raffreddamento e vedendo che non si forma nessun precipitato nella soluzione, si evapora a secco, ottenendo un olio che viene successivamente trattato con acqua/etanolo per far precipitare il prodotto finale; infine si filtra sotto vuoto. Il composto ottenuto viene purificato tramite cristallizzazione.

3-(4-metossifenil)pirazolo-5-amina (2''c)

Solido bianco latte, resa 91%, p.f. 132-134°C, solvente di cristallizzazione: Etanolo, eluente: CH₂Cl₂/MeOH (8/1).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ ppm: 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.67 (s, 1H, H-3), 6.93-6.95 (d, 2H, Ph), 7.55-7.58 (d, 2H, Ph), 11.681 (s slargato, 1H, NH scambiabile).

3-(4-bromofenil)-1H-pirazolo-5-amina (2''d)

Il prodotto finale è un solido bianco, resa 60%, p.f.: 170-171°C, eluente: CH₂Cl₂/MeOH (8/1).

solvente di cristallizzazione: acqua.

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 4.77-4.92 (s slargato, 2H, NH₂ scambiabile), 5.752 (s, 1H, H-3), 7.54-7.56 (d, 2H, Ph), 7.60-7.62 (d, 2H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di 5,7-dimetil-2-aril-pirazolo[1,5-*a*]pirimidine (3''c,d).

Ad una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (2''c,d, 10 mmol) in etanolo assoluto si aggiunge 2,4-pentandione (20 mmol) e la reazione è tenuta a riflusso sotto agitazione per un ora in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione viene evaporata sotto vuoto ed il residuo solido ottenuto viene purificato tramite cristallizzazione con l'opportuno solvente .

2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidina (3''c)

Solido cristallino arancione, resa del 60%. p.f. 150°-153°C, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1).

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.53 (s, 1H, H-3), 6.80 (s, 1H, H-6) , 6.99-7.01 (d, 2H, Ph), 7.94-7.97 (d, 2H, Ph).

5,7-dimetil-2-(4-bromofenil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina (3''d)

Solido bianco aghiforme, resa 93%, p.f.: 153°-155°C, eluente: Toluene/ EtOAc (8/3), solvente di cristallizzazione: Etanolo.

¹H-NMR(CDCl₃)δ ppm: 2.75-2.77 (s, 3H, 5-CH₃), 2.89-2.92 (s, 3H, 7-CH₃), 6.67-6.70 (s, 1H, H-3), 6.71-6.72 (s, 1H, H-6), 7.61-7.66 (d, 2H, Ph), 7.90-7.95 (d, 2H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di 2-aril-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-carbaldeidi (4''c,d).

Una sospensione formata dal prodotto di partenza (3''c,d, 5 mmol) in 10 ml di DMF viene aggiunta goccia a goccia in un pallone da 150 ml contenente tricloruro di fosforite (10 mmol). Durante lo sgocciolamento, si lascia il pallone in un bagno di ghiaccio e acqua sotto agitazione magnetica mantenendo sempre le condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂). Una volta finito di sgocciolare, si lascia la reazione sotto agitazione a t. a. per circa 30 minuti, quindi porta la sospensione ad una temperatura di 75-85°C per 3 ore. Dopo raffreddamento viene aggiunto alla miscela di reazione ghiaccio (75g) per permettere l'idrolisi, agitando vigorosamente. Il prodotto ottenuto viene recuperato mediante filtrazione.

2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-carbaldeide (4''c).

Solido di colore rosso, resa 25%, p.f. 176°-179°C, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1).

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ ppm: 2.61 (s, 3H, 5-CH₃), 2.77 (s, 3H, 7-CH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃) 7.07-7.09 (d, 2H, Ph), 7.23 (s, 1H, H-6), 8.11-8.13 (d, 2H, Ph), 10.25 (s, 1H, CHO).

2-(4-bromofenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-carbaldeide (4''d)

Solido rosso, resa 50%, p.f. 195-198°C, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1), solvente di cristallizzazione: Acqua/Etanol (4/1).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.64 (s, 3H, 5-CH₃), 2.79 (s, 3H, 7-CH₃), 7.29 (s, 1H, H-6), 7.74-7.76 (d, 2H, Ph), 8.08-8.10 (d, 2H, Ph), 10.28 (s, 1H, CHO).

Procedura generale per la preparazione di 3-(2-aril-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acidi acrilici (5''c,d).

In un pallone da 100 ml vengono messi prodotto di partenza (4''c,d, 0.4 mmol), acido malonico (1,142 mmol) e piridina (3 ml). Si lascia a temperatura ambiente sotto agitazione e successivamente si riscalda in bagno di acqua all'ebollizione in condizioni di anidricità (tappo a CaCl₂) per circa 5 ore. Dopo raffreddamento, si aggiungono circa 10 ml di acqua alla miscela di reazione e l'acido è sciolto con l'aggiunta di ammoniaca concentrata. La soluzione è successivamente filtrata su filtro a pieghe. Il filtrato è acidificato con HCl (diluito 1:1 con H₂O). Nel caso in cui si formi un precipitato, la miscela viene lasciata in un bagno di ghiaccio per alcune ore, quindi filtrata ed il precipitato lavato con acqua 4 volte. Nel caso in cui non si formi alcun precipitato, si procede con un'estrazione in etile acetato. La fase organica raccolta viene anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata a secco sotto vuoto. Il solido ottenuto viene purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando opportuna miscela eluente.

3-(2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acido acrilico (5''c)

Solido arancione, resa 90%. p.f. 196°C, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.74 (s, 3H, 5-CH₃), 2.78 (s, 3H, 7-CH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃) 6.99-7.00 (d, 1H, H vinilico), 7.09-7.10 (d, 2H, Ph), 7.25 (s, 1H, H-6), 7.71 (d, 1H, H vinilico), 8.11-8.13 (d, 2H, Ph).

3-(2-(4-bromofenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acido acrilico (5''c)

Solido arancione, resa 80%, p.f. 185°C, eluente: Toluene/ EtOAc/ AcOH (8/2/1), solvente di cristallizzazione: Etanol.

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.63 (s, 3H, 5-CH₃), 2.75 (s, 3H, 7-CH₃), 7.00-7.04 (d, 1H, Hvinilico), 7.16 (s, 1H, H-6), 7.63-7.65 (m, 3H, Ph e Hvinilico), 7.80-7.82 (d, 2H, Ph).

Procedura generale per la preparazione di 3-(2-aril-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)-N,N-dietilacrilamidi (6''c,d).

Una soluzione dell'acido acrilico di partenza (5''c,d, 1 mmol) in THF anidro è tenuta sotto agitazione in

bagno di ghiaccio e sale fino a raggiungere una temperatura di -10°C ; quindi si aggiungono trietilammina (3 mmol), dopo 30 minuti isobutilcloroformiato (1,1 mmol) e, dopo una successiva ora, dimetilammina. La reazione è tenuta a temperatura ambiente per 3 ore, quindi la sospensione viene filtrata e la soluzione ottenuta evaporata sottovuoto. I prodotti sono successivamente purificati tramite cromatografia su colonna usando opportuna miscela eluente.

N,N-dietil-3-(2-(4-metossifenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)acrilamide (6''c)

Solido rosso, resa 40%, p.f. $145^{\circ}\text{-}147^{\circ}\text{C}$, eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/0.5).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 1.06-1.13 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_3]$), 1.21-1.37 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_3]$), 2.59 (s, 3H, 5- CH_3), 2.72(s, 3H, 7- CH_3), 3.37-3.44 (m, 4H, $2\text{CH}_2[\text{NEt}_3]$), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 7.047 (d, 1H, H vinilico), 7.12-7.14 (d, 2H, Ph), 7.61-7.63 (m, 4H, H vinilico, Ph, H-6).

3-(2-(4-bromofenil)-5,7-dimetilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)-N,N-dietilacrilamide (6''d)

Solido rosso, resa 46%, p.f. $152^{\circ}\text{-}154^{\circ}\text{C}$, eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/0.5).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 1.074-1.12 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_3]$), 1.22-1.33 (t, 3H, $\text{CH}_3[\text{NEt}_3]$), 2.62 (s, 3H, 5- CH_3), 2.75 (s, 3H, 7- CH_3), 3.38-3.44 (m, 4H, $2\text{CH}_2[\text{NEt}_3]$), 7.29 (d, 1H, Hvinilico), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.63-7.65 (d, 2H, Ph), 7.75-7.80 (d, 2H, Ph), 8.09 (d, 1H, Hvinilico).

Procedura per la preparazione di 5,7-dimetil-2-fenil-3-(3-(tetraidro-2H-piran-2-ilossi)prop-1-inil)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina (5'j)

In un pallone a tre colli in corrente di N_2 , vengono aggiunti il composto **4j** (5 mmol), CuI (0.5 mmol) in 50 ml di dimetossietano. Dopo qualche minuto si aggiungono K_2CO_3 (12 mmol), Pd/C (al 10% in peso, 1,5 mmol), Ph_3P (1,5 mmol) e H_2O (10 ml) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Nell'ambiente di reazione si sgocciola una soluzione di 2-(prop-2-inilossi)tetraedro-pirano* in DME (5 ml) e si lascia a riflusso. Dopo 4h la reazione è finita. La miscela di reazione viene filtrata su celite, quindi si elimina il DME evaporando sotto vuoto; si aggiungono 50 ml di etere di etilico e si lava con H_2O per tre volte. La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 , viene potata a secco sotto vuoto ed il residuo solido così ottenuto, purificato tramite cromatografia su colonna.

Solido cristallino beige, resa 74%, p.f. $95^{\circ}\text{-}98^{\circ}\text{C}$, eluente: Toluene/ EtOAc (8/6), solvente di cristallizzazione: Etanolo.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 1.59-1.89 (m, 6H, piranile), 2.65-2.66 (s, 3H, 5- CH_3), 2.81 (s, 3H, 7- CH_3), 3.58-3.59 (m, 1H, piranile), 9.94-3.95 (m, 1H, piranile), 4.66 (s, 2H, CH_2), 5.01 (dd, 1H, piranileOCO), 6.64-6.66 (s, 1H, H_6), 7.49-7.51 (m, 5H, Ph).

***Procedura di preparazione del 2-(prop-2-inilossi)tetraidro-pirano**

In un pallone da 100 ml si mettono 3,4-diidro-pirano (3,2 mmol), acido p-Toluensolfonico monoidrato (10 mg) e alcool propargilico (3 mmol) e si lascia sotto agitazione per un'ora e mezzo a 60°-65°C. Dopo si aggiunge NaHCO₃ (0.5 g) e si lascia ancora sotto agitazione a temperatura ambiente per 1h. La miscela di reazione viene quindi filtrata e distillata (P= 23 mbar, bp= 47°-50°C).

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 1.54-1.76 (m, 6H, piranile), 2.42 (s, 1H, CH terminale), 3.53-3.56 (m, 1H, piranile), 3.84-3.86 (m, 1H, piranile), 4.28 (s, 2H, CH₂), 4.83 (dd, 1H, piranile-OCO).

Procedura di preparazione del 3-(5,7-dimetil-2-fenilpirazolo[1,5-*a*]pirimidin-3-il)prop-2-in-1-olo (6'j)

Ad una sospensione del composto 5'j (1.1 mmol) in metanolo (20 ml) si aggiunge perclorato ferrico (0.1 mmol) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 4 giorni la reazione non va più avanti, anche se il prodotto di partenza è ancora presente. La miscela di reazione viene filtrata su celite e la soluzione alcolica portata a secco sotto vuoto. Il residuo ceroso ottenuto viene purificato tramite cromatografia su colonna.

Solido polveroso giallo pallido, resa 36%, p.f. 120°C., eluente: Toluene/EtOAc (8/6).

¹H-NMR(CDCl₃) δ ppm: 2.63 (s, 3H, 5-CH₃), 2.831 (s, 3H, 7-CH₃), 3.4-3.7 (s slargato, 1H, OH scambiabile) 4.57 (s, 2H, CH₂), 6.65 (s, 1H, H₆), 7.57-7.70 (m, 5H, Ph).

Experimental section (synthesis of imidazo[1,2-*b*]pyridazine)- School of chemistry- University of Sydney- Cornforth lab- from 26/06/08 to: 19/09/08 (¹H-NMR by Avance 200 Bruker).

SECTION 1**Preparation of 6,8-dimethyl-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pyridazine (1k)**

In a 250 ml round bottom flask, 4-amino-1,2,4-triazole (50 mmol, 1 eq) was dissolved in 80 ml of toluene, then *p*-toluene-sulphonic acid (0.29 mmol, 0.006 eq) was added and after 10 minutes stirring, 2,4-pentanedione (50 mmol, 1 eq). The reaction mixture was refluxed with Dean-Stark trap overnight under N₂. When the reaction was finished, solvent was removed under vacuum and the pale yellow mass was dissolved in CHCl₃ (200 ml) and washed with sat. aq. NaHCO₃ (3 x 150 ml). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Pale yellow crystals of pure product were obtained (yield: 66%).

R_f: 0.75 (CH₂Cl₂/MeOH 10/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 2.54 (s, 3H, 8-CH₃), 2.69 (s, 3H, 6-CH₃), 6.78 (s, 1H, 7-H), 8.97 (s, 1H, 3-H).

Preparation of 6,8-dimethyl-2-(2-oxo-2-phenylethyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-2-ium (2k)

In a 250 ml round bottom flask **1k** (33.1 mmol, 1 eq) was dissolved in CH_3NO_2 (60 ml) and then Bromoacetophenone (33.1 mmol, 1 eq) was added. The reaction mixture was refluxed under N_2 overnight. When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum and the dark red viscous oil was purified by silica gel column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10/1). The pure product was obtained like orange crystals (yield: 72%).

Rf: 0.36 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10/1).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 2.7 (m, 6H, 6,8-di- CH_3), 6.97 (s, 2H, CH_2), 7.5- 7.7 (m, 3H, 7-H + Ph), 8.06- 8.19 (m, 3H, Ph), 11.98 (s, 1H, 3-H).

Preparation of 6,8-dimethylpyridazin-3-amine (3k)

In a 250 ml round bottom flask **2k** (15 mmol, 1eq) was dissolved in MeOH (10 ml) and aq. 20% NaOH (45 mmol, 3 eq) was added. The reaction mixture was refluxed for 10h. When the reaction was finished, solvent was removed under vacuum and the reaction mixture was diluted with 100 ml of water and the resulting solution was acidified until pH 7. The product was extracted by CH_2Cl_2 (3 x 100 ml) and the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The dark brown oil obtained was washed with a mix of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/$ Hexane (4/1) and the precipitate was recovered by filtration and washed by CHCl_3 . The product was a pale brown solid (yield: 64%).

Rf: 0.49 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10/1).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 2.14 (s, 3H, 8- CH_3), 2.51 (s, 3H, 6- CH_3), 4.37 (bs, 2H, NH_2), 6.93 (s, 1H, 7-H).

Preparation of N,N-diethyl-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutanamide (1'k)

In a 250 ml round bottom flask, 3-(4-methoxybenzoyl)-propionic acid (30 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (100 ml) under N_2 and cooled to 0°C . Then, NEt_3 (45 mmol, 1.5 eq) was added. After 30 minutes, isobutylchloroformate (36 mmol, 1.2 eq) was added. After 1h at 0°C , NHEt_2 (33 mmol, 1.1 eq) was added and the mixture was warmed at r. t. under N_2 overnight. When the reaction was finished, solvent was removed under vacuum, the reaction mixture was diluted with aq. 10% HCl (20 ml), aq. 5% NaOH (20 ml) and water (20 ml) and extracted in CHCl_3 (3 x 100 ml). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The resulted red viscous oil was cooled in ice bath and EtOAc (20 ml), Hex (30 ml) were added in the flask. After 2h, the precipitate was recovered by filtration and the light orange crystals obtained were washed with hexane (yield: 83%).

Rf: 0.45 (EtOAc/ Hex 1/1)

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.09-1.14 (t, 3H, CH_2CH_3), 1.21-1.26 (t, 3H, CH_2CH_3), 2.73-2.78 (q, 2H, CH_2CH_3), 3.30- 3.44 (m, 6H, CH_2CH_3) and $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.86 (s, 3H, O- CH_3), 6.91-6.95 (d, 2H, Ph), 7.99-8.01 (d, 2H, Ph).

Preparation of 3-Bromo-N,N-diethyl-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutanamide (2'k)

In a 250 ml round bottom flask, **1k** (25 mmol, 1eq) was dissolved in CHCl₃ (50 ml) and cooled to 0°C, Br₂ (27.5 mmol, 1.1 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C for 1h and then left stirring at r.t. overnight. The morning after was refluxed for 1h. When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum and the red viscous oil obtained was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/ Hex 1/1). The pure product was a yellow oil (yield: 81%).

Rf: 0.75 (EtOAc/ Hex 1/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 1.04-1.11 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.23-1.30 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.98-3.36 (m, 6H, 2(CH₂CH₃) and CH₂-CO), 3.87 (s, 3H, O-CH₃), 5.63-5.70 (dd, 1H, CHBr), 6.93-6.97 (d, 2H, Ph), 8.00-8.07 (d, 2H, Ph).

Preparation of N,N-diethyl-2-(2-(4-methoxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethanamide (4k)

In a 100 ml round bottom flask, **3k** (5 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (10 ml) and a solution of **2'k** (5 mmol, 1 eq) in DMF (10 ml) was added dropwise to the flask. The reaction mixture was stirred and refluxed for 8h. When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum and the black oil obtained was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/ Hex 9/1). The brown powder was recrystallized by EtOAc/ Hex (4/1) to obtain pale brown crystals (yield: 51%).

Rf: 0.42 (EtOAc/ Hex 9/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 1.11-1.18 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.25-1.34 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.49 (s, 3H, 8-CH₃), 2.63 (s, 3H, 6-CH₃), 3.40-3.59 (m, 4H, 2(CH₂CH₃)), 3.84 (s, 3H, O-CH₃), 4.11 (s, 2H, CH₂CO), 6.68 (s, 1H, 7-H), 6.95-7.00 (d, 2H, Ph), 7.77-7.85 (d, 2H, Ph).

Preparation of N,N-diethyl-2-(2-(4-hidroxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethanamide (5k)

In a 50 ml round bottom flask **4k** (0.5 mmol, 1 eq) was dissolved in aq. HBr (9 M, 7 ml) and tetrabutylphosphonium bromide (0.05 mmol, 0.1 eq) was added. The reaction mixture was refluxed for 6h. When the reaction was finished, the reaction mixture was basified until pH 8 with sat. aq. NaHCO₃ and the product was extracted by CH₂Cl₂ (3 x 100 ml) and the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The resulted brown powder was washed with Et₂O (10 ml) and the pure product was a pale brown solid (yield: 64%).

Rf: 0.58 (CH₂Cl₂/MeOH 10/1).

¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 0.91-1.11 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.25-1.45 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.48 (s, 3H, 8-CH₃), 2.57 (s, 3H, 6-CH₃), 3.33-3.40 (t, 2H, CH₂CH₃), 3.56-3.59 (t, 2H, CH₂CH₃), 4.12-4.15 (s, 2H, CH₂CO), 6.84-6.88 (d, 2H, Ph), 6.99 (s, 1H, 7-H), 7.58-7.63 (d, 2H, Ph), 9.5-9.7 (bs, 1H, OH).

Preparation of N,N-diethyl-2-(2-(4-(2-fluoropropoxy)phenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethanamide (6k)

In a 50 ml round bottom flask, NaH (60%, 1.66 mmol, 2 eq) was added in 8 ml of DMF and stirred at 0°C. Then a solution of **5k** (0.83 mmol, 1 eq) in DMF (16 ml) was added and the reaction mixture was stirred for 1h at 0°C. A solution of 3-fluoropropyl-4-methyl-benzene sulphonate (0.83 mmol, 1 eq) in DMF (4 ml) was added dropwise at the reaction mixture. After 5h, the reaction was complete and the DMF solution was dissolved in 200 ml of water and extracted with EtOAc (3 x 150 ml). The organic layer was concentrated under vacuum to reduce the volume at 100 ml and washed with a aq. 5% LiCl 2 x 50 ml) and once with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The brown oil obtained was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/ MeOH 10/1). The resulted yellow oil was recrystallized by DCM (yield: 54%).

R_f: 0.44 (EtOAc/ Hex 9/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 1.11-1.34 (m, 6H, 2(CH₂CH₃)), 2.13-2.28 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.49 (s, 3H, 8-CH₃), 2.63 (s, 3H, 6-CH₃), 3.39-3.56 (m, 4H, 2(CH₂CH₃)), 4.10 (s, 2H, CH₂CO), 4.11-4.18 (dd, 2H, CH₂O), 4.55-4.82 (dd, 2H, CH₂F), 6.73 (s, 1H, 7-H), 6.94-7.02 (d, 2H, Ph), 7.71-7.75 (d, 2H, Ph).

SECTION 2

Preparation of methyl-4(4-methoxyphenyl)-4-oxobutanoate (1l)

In a 500 ml round bottom flask 3-(4-methoxybenzoyl)-propionic acid (50 mmol, 1 eq) was dissolved in acetone (200 ml) and anhydrous K₂CO₃ (150 mmol, 3 eq) was added in the flask and the reaction mixture was stirred under N₂. After 15 minutes, methyl iodide (100 mmol, 2 eq) was added. After 3h, acetone (100 ml) was added to help to stir the reaction mixture and the reaction mixture was stirred overnight at r. t.

When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum and the white mass was dissolved in CHCl₃ (200 ml) and washed with a sat. aq. solution of NaHCO₃ (3 x 150 ml), the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness.

The pure product was a pale yellow powder (yield: 57%).

R_f: 0.76 (EtOAc/ Hex 1/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 2.72-2.78 (t, 2H, CH₂COOMe), 3.24-3.31 (t, 2H, CH₂COPh), 3.7 (s, 3H, CH₃OCO), 3.87 (s, 3H, O-CH₃), 6.91-6.96 (d, 2H, Ph), 7.94-7.99 (d, 2H, Ph).

Preparation of methyl 3-bromo-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobutanoate (2l)

In a 250 ml round bottom flask, **1l** (25 mmol, 1eq) was dissolved in CHCl_3 (100 ml) and cooled to 0°C , Br_2 (50 mmol, 2 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C for 1h and then left stirring at r.t. overnight. The morning after was refluxed for 1h. When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum and the red viscous oil obtained was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/ Hex 6/1). The pure product was a pale orange oil (yield: 49%).

Rf: 0.66 (EtOAc/ Hex 6/1)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 3.03-3.15 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.41-3.54 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.7 (s, 3H, CH_3OCO), 3.89 (s, 3H, O- CH_3), 5.43-5.51 (dd, 1H, CHBr), 6.94-6.99 (d, 2H, Ph), 8.01-8.05 (d, 2H, Ph).

Preparation of methyl 2-(2-(4-methoxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)acetate (3l)

In a 100 ml round bottom flask, **3k** (5 mmol, 1 eq) was dissolved in anhydrous DMF (10 ml) and anhydrous K_2CO_3 (7.5 mmol, 1.5 eq) was added in the flask. A solution of **2l** (5 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (10 ml) was added dropwise to the flask. The reaction mixture was refluxed for 7h. When the reaction was complete, the reaction mixture was dissolved in 100 ml of water and extracted with EtOAc (3 x 80 ml). The organic layer was concentrated under vacuum to reduce the volume to 50 ml and washed with aq. 5% LiCl (2 x 100 ml) and once with brine. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness and the brown oil obtained was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/ Hex 9/1). The pure product is a brown solid (yield: 12%).

Rf: 0.70 (EtOAc/ Hex 9/1)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 2.52 (s, 3H, 8- CH_3), 2.65 (s, 3H, 6- CH_3), 3.72 (s, 3H, CH_3OCO), 3.86 (s, 3H, O- CH_3), 4.14-4.15 (s, 2H, CH_2CO), 6.73 (s, 1H, 7-H), 6.97-7.01 (d, 2H, Ph), 7.69-7.73 (d, 2H, Ph).

Preparation of 2-(2-(4-methoxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)acetic acid (4l)

In a 50 ml round bottom flask, **3l** (0.4 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (10 ml) and aq. NaOH (0.4 M, 2 eq) was added. The reaction mixture was refluxed overnight. When the reaction was complete, solvent was removed under vacuum, 100 ml of water was added at the reaction mixture and HCl (1M) was added dropwise until pH 7. The product was extracted by CH_2Cl_2 (3 x 50 ml) and the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The product is a brown solid (yield: 80%).

Rf: 0.41 (EtOAc/ Hex/ H^+ 9/1/0.1).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 2.55 (s, 3H, 8- CH_3), 2.66 (s, 3H, 6- CH_3), 3.86 (s, 3H, O- CH_3), 4.16 (s, 2H, CH_2CO), 6.77 (s, 1H, 7-H), 6.99-7.22 (d, 2H, Ph), 7.71-7.74 (d, 2H, Ph).

Preparation of N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)acetamide (5l)

In a 50 ml round bottom flask, **4l** (1 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (25 ml) under N₂ and cooled to 0°C, NEt₃ (1.5 mmol, 1.5 eq) was added and the mixture still stirred at 0°C. After 30 minutes, isobutylchloroformate (1.2 mmol, 1.2 eq) was added and the mixture still stirred at 0°C. After 1h, 2-(ethylamino)ethanol (1.1 mmol, 1.1 eq) was added and the mixture was stirred at r. t. under N₂. After 5h, when the reaction was complete, solvent was removed under vacuum, the reaction mass was dissolved in 50 ml of CH₂Cl₂ and washed with a sat. aq. solution of NH₄Cl (2 x 30 ml) and with a sat. aq. NaHCO₃ (2 x 30 ml). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness and the brown oil obtained was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 10/1),

R_f: 0.82 (CH₂Cl₂/ MeOH 10/1).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ: 2.50 (s, 3H, 8-CH₃), 2.65 (s, 3H, 6-CH₃), 3.48-3.49 (t, CH₂, CH₂CH₂OH), 3.67-3.78 (t, CH₂, CH₂ CH₂OH), 3.85 (s, 3H, O-CH₃), 4.20 (s, 2H, CH₂CO), 6.68 (s, 1H, 7-H), 7.01-7.22 (d, 2H, Ph), 7.81-7.92 (d, 2H, Ph).

Preparation of N-ethyl-N-(2-fluoroethyl)-2-(2-(4-methoxyphenyl)-6,8-dimethylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)acetamide (6l)

In a 50 ml round bottom flask, **5l** (1 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM anhydrous (3 ml) at room temperature under N₂ and Deoxofluor (1.1 mmol, 1.1 eq) in DCM (2 ml) was added and the mix still stirred at room temperature. when the reaction was complete, the mix was washed with a sat. aq. NaHCO₃ (3 X30 ml).The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness and the brown oil obtained was purified by silica gel column chromatography (toluene/EtOAc (8/5)).

Whitw crystals, yield 70%, p.f. 126°C, ¹H-NMR (CDCl₃), δppm: 1.14-1.12 (m, 3H, -CH₃[NEt₂]), 2.52-2.53 (s, 3H, 5-CH₃), 2.66 (s, 3H, 5-CH₃), 3.41-3.48 (q, 2H, CH₂[NEt₂]), 3.75-3.79 (dd, 2H, CH₂CH₂F), 3.80-3.90 (dd, 2H, CH₂CH₂F), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 4.11 (s, 2H, CH₂), 6.98 (s, 1H, H-6), 7.13-7.24(d, 2H, Ph), 7.61-7.63 (m, 2H, Ph).

II.5.2- Parte Sperimentale Biologica

Determinazione del legame del [³H]Ro15-1788 al Recettore Benzodiazepinico Centrale su membrane di corteccia bovina e di ratto

Le membrane di corteccia bovina e di ratto sono state preparate mediante centrifugazioni differenziali come descritto da Squires *et al.*¹¹⁸ e sono state sottoposte a lavaggi per eliminare il GABA endogeno. La frazione di membrane lavate è stata diluita 1:20 con tampone Tris-Citrato 50 mM pH 7.1 (T₁) ed omogenata mediante Ultraturax. Aliquote da 50 µl (~ 0.2 mg di proteine) sono state incubate con il radioligande [³H]Ro15-1788 (~ 0.2 nM, attività specifica 85 Ci/mmol, Dupont-New England Nuclear Boston, MA, USA) in un volume finale di 500 µl di T₁ a 0 °C per 90 minuti. Il legame aspecifico è stato determinato in presenza di diazepam non marcato 10 µM. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati rapidamente filtrati a pressione ridotta su filtri di fibra di vetro Whatman GF/C, effettuando un lavaggio da 5 ml in provetta più due lavaggi da 5 ml su filtro con tampone T₁ freddo (4 °C). Per la filtrazione è stato utilizzato un apparecchio Millipore, costituito da sistema a tenuta per filtri ed un attacco per la pompa a vuoto, questo strumento consente la filtrazione simultanea di 12 campioni. Effettuata la filtrazione, i filtri sono stati posti in pico vials in cui sono stati aggiunti 4 ml di liquido di scintillazione Ready-Safe Beckman. Il conteggio della radioattività è stato effettuato mediante scintillatore in fase liquida 1600-TR Packard con efficienza del 66% ed espressa come disintegrazioni per minuto (dpm).

Determinazione del legame del [³H]Ro15-1788 sulle membrane di corteccia bovina e di ratto in presenza di composti di nuova sintesi

Per i composti che risultano affini al recettore benzodiazepinico viene misurata anche l'affinità sul recettore centrale per valutarne la selettività.

Il saggio di binding del [³H]Ro15-1788 sulle membrane di corteccia bovina e di ratto è stato condotto come riportato precedentemente. In questo caso il legame del radioligande è stato valutato in presenza di composti di nuova sintesi.

I composti sono stati solubilizzati in etanolo assoluto o in dimetilsolfossido (DMSO) e aggiunti alla miscela di incubazione ad una concentrazione di 10 µM.

Per i ligandi che, alla concentrazione suddetta, hanno mostrato una buona capacità inibitoria (circa del 60-70%) sul legame del radioligande, è stato determinato il valore di IC₅₀ dal quale è stato derivato il valore di K_i. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte per valutare l'errore standard della media (SEM).

Determinazione del legame del [³H]PK11195 sulle membrane di mitocondri di rene di ratto

Le membrane di mitocondri di rene di ratto sono state diluite 1:160 con tampone T₂ ed omogenate con Ultraturax. Aliquote da 50 µl (~ 50 µg di proteine) sono state incubate con il radioligande [³H]PK11195 (~

0.4 nM, attività specifica 87 Ci/mmmole, Dupont-New England Nuclear Boston, MA, USA) e con tampone T₂ in un volume finale di 500 µl a 0 °C per 90 minuti. Il legame aspecifico è stato determinato in presenza di PK11195 1 µM.

Al termine dell'incubazione i campioni sono stati filtrati rapidamente sotto vuoto su filtri GF/C, effettuando tre lavaggi da 5 ml in provetta con tampone T₂. Effettuata la filtrazione, i filtri sono stati posti in pico vials in cui sono stati aggiunti 4 ml di liquido di scintillazione Ready-Safe Beckman.

Il conteggio della radioattività è stato effettuato mediante scintillatore in fase liquida 1600-TR Packard con efficienza del 66% ed espressa come disintegrazioni per minuto (dpm).

Determinazione del legame del [³H]PK11195 sulle membrane di mitocondri di rene di ratto in presenza di composti di nuova sintesi per valutare l'attività farmacologica

Per valutare se i composti di nuova sintesi, risultati attivi sul recettore benzodiazepinico periferico, si comportano da agonisti o antagonisti sono stati condotti studi termodinamici, come precedentemente riportato da Le Fur *et al.*³²¹. Le membrane di mitocondri di rene di ratto (~ 50 µg di proteine) sono state incubate con concentrazioni crescenti dei composti di nuova sintesi e con una concentrazione fissa del radioligande [³H]PK11195 a 0 °C e 25 °C in un volume finale di 500 µl di tampone T₂. Mediante l'analisi LOG-PROBIT sono stati calcolati i valori di IC₅₀ dai quali sono stati derivati i valori di K_i. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte per valutare l'errore standard della media (SEM).

Se i valori delle K_i calcolate alle due temperature rimangono invariati il composto si comporta da agonista, se invece il valore di K_i aumenta all'aumentare della temperatura il composto si comporta da agonista o agonista parziale.

III.1- Introduzione

Le infezioni causate da protozoi costituiscono il maggior impedimento per il progresso socioeconomico nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo. Le mancate conoscenze sul meccanismo attraverso il quale i parassiti acquisiscono la resistenza ai farmaci si sommano ai problemi anche nel campo della sanità pubblica, impedendo così il controllo vero e proprio dello sviluppo di epidemie.

La *Leishmania*, che fa parte delle malattie tropicali neglette (Neglected Tropical Diseases, NTDs)³¹⁹, è uno dei protozoi più presenti in natura, insieme a quello che causa la malaria. La leishmaniosi, da esso causata, è una patologia ad alto grado di morbosità e mortalità.

La *Leishmania* è un parassita che sopravvive nel mammifero nella forma intracellulare e più precisamente nei macrofagi e nelle cellule dendritiche. La *Leishmania* viene trasmessa attraverso la puntura di flebotomi femmine infettati che inoculano la forma flagellata, il promastigote, in un ospite sensibile. La ricerca di vaccini e farmaci efficaci e poco tossici si rivela ancora deludente ed i trattamenti con storici farmaci leishmanicidi risultano costosi e necessitano di terapia periodica con iniezioni giornaliere, a seconda del tipo di leishmaniosi, diminuendo così la compliance del paziente.

La leishmaniosi è ampiamente diffusa in numerose parti del mondo³²¹ come si vede dalla figura III.1.



Fig. III.1- Mappa che illustra la disposizione geografica delle aree endemiche per la Leishmaniosi.

La diffusione della malattia risulta influenzata da molti fattori: ambiente (densità dei flebotomi nelle aree endemiche, altitudine e caratteristiche geologiche del territorio,...); clima (temperatura, tasso di umidità,...); condizioni socio-sanitarie (malnutrizione, incidenza nella popolazione umana di soggetti affetti da immunodeficienza acquisita, elevata concentrazione di animali infetti, randagismo, ...); mancanza di presidi immunizzanti (ossia vaccini) efficaci sia nell'uomo che nel cane.

Il parassita presente nella nostra penisola e responsabile delle forme di leishmaniosi umana è rappresentato da *Leishmania infantum*.

La leishmaniosi può essere classificata in funzione del coinvolgimento sistemico e della severità clinica in cutanea, monocutea, cutanea diffusa e viscerale. Quest'ultima è provocata dalla *Leishmania donovani* e dalla *Leishmania infantum*, le quali vanno a localizzarsi nei principali organi vitali e tale infezione, se non trattata, è mortale nel 90% dei casi, scende al 5% se il paziente viene curato.

III.1.1- Etiologia

La Leishmaniosi è un'infezione causata da un protozoo appartenente alla classe Zoomastigophorea, ordine Kinetoplastida, famiglia Trypanosomatidae. Questa classificazione è stata elaborata dall'OMS nel 1990 sulla base di studi inerenti la biologia del protozoo, le specie di flebotomi e soprattutto il suo corredo enzimatico³²².

Le leishmanie sono microrganismi dicensi che necessitano di un ospite intermedio costituito da un vettore ematofago e da uno definitivo rappresentato dall'ospite vertebrato. Si tratta di parassiti intracellulari dei macrofagi e delle cellule dendritiche del cane, dell'uomo e di altri animali selvatici. Il vettore è un flebotomo all'interno del quale i protozoi si moltiplicano e diventano infettanti.

I parassiti appaiono dentro i macrofagi come organismi rotondeggianti od ovoidali con il cinetoplasto a bastoncino situato vicino al nucleo, con un abbozzo di flagello che non si estende oltre il margine cellulare. Questa forma di parassita si chiama amastigote e viene ingerito dal flebotomo durante il pasto di sangue. Nell'intestino dell'ospite intermedio si trasforma in promastigote, caratterizzato dalla presenza di un lungo flagello libero. Questi si dividono ripetutamente per scissione binaria e successivamente migrano verso la faringe. Qui si trasformano in promastigoti metaciclici, altamente mobili e migrano verso la proboscide.

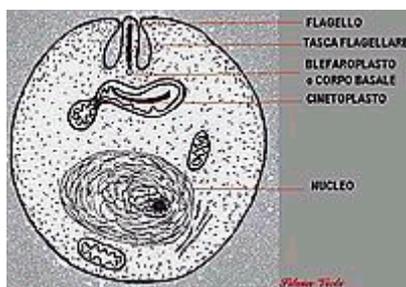


Fig. III.2: Amastigote

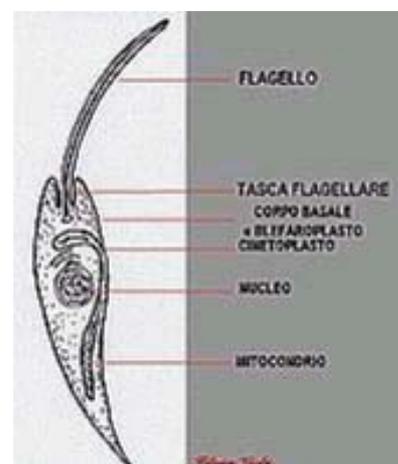


Fig. III.3- Promastigote

Vengono quindi trasmessi all'ospite definitivo con una nuova puntura, e vengono fagocitati dai macrofagi. Anche gli amastigoti si dividono per scissione binaria all'interno del vacuolo parassitoforo, raggiungendo un numero tale da portare a rottura la cellula.

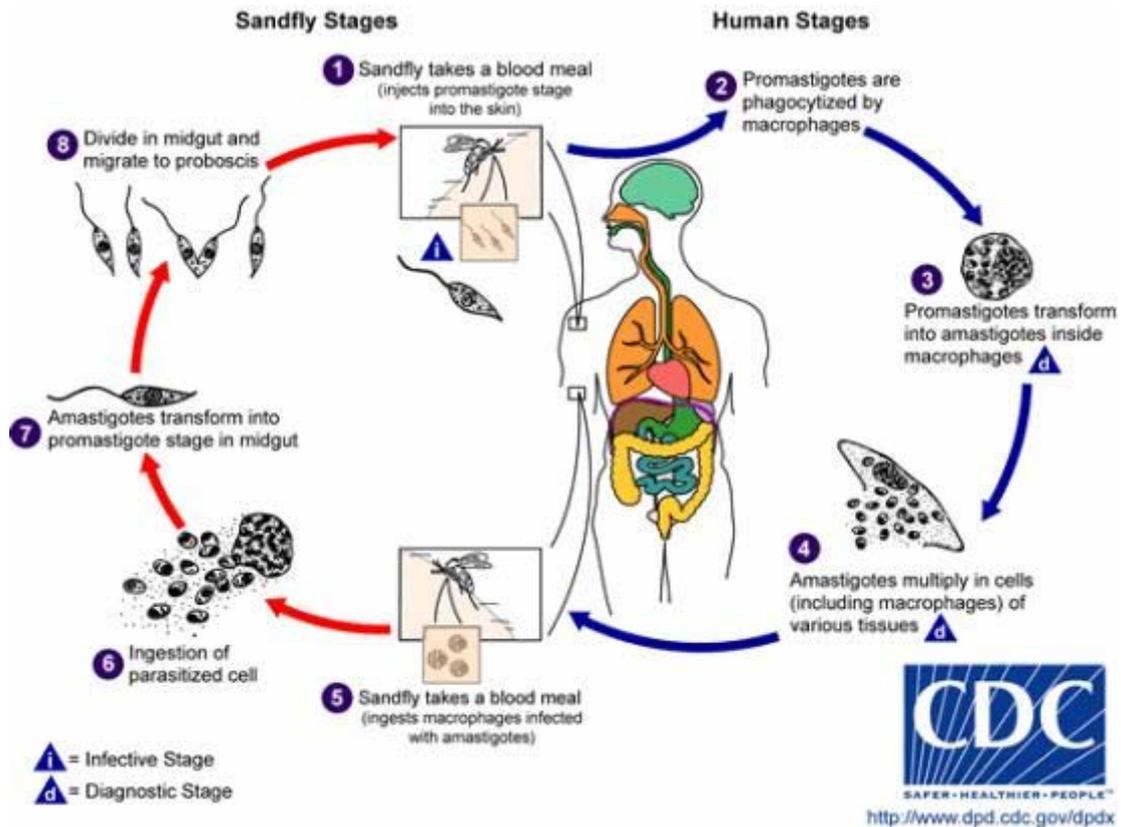


Fig. III.4- Ciclo biologico del parassita nell'ospite umano.

La durata del ciclo biologico del parassita nell'ospite invertebrato varia da un minimo di 4 giorni ad un massimo di 20, in relazione alle condizioni climatiche esterne. Le forme capaci di conferire l'infezione al mammifero ospite sono costituite da promastigoti piccoli e molto attivi (promastigoti metaciclici infettanti) presenti nella proboscide dei flebotomi vettori.

Mentre i flebotomi maschi si nutrono di succhi vegetali, le femmine sono ematofaghe, determinando irritazione con la loro puntura, e per questo hanno strutture buccali atte a perforare la pelle dei propri ospiti.

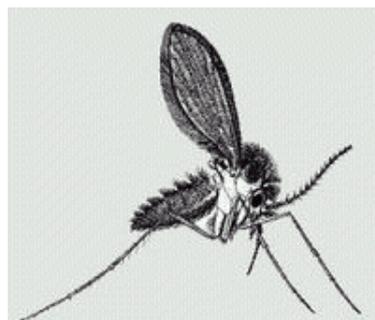


Fig. III.5- Flebotomo.

III.1.2- Infezione e patogenesi

La via naturale del contagio è rappresentata dall'inoculazione dei promastigoti metaciclici infettanti, da parte dei flebotomi parassitati, durante un pasto di sangue, nella cute (sito primario d'infezione) dei mammiferi ospiti. Non si escludono altre possibili vie di contagio, come quella dell'ingestione volontaria o accidentale da parte del mammifero ospite dei flebotomi parassitati.

Introdotte nell'organismo le forme promastigote sono attaccate dai macrofagi, a cui i parassiti si "agganciano" mediante l'estremità craniale flagellata o l'estremità caudale, nei quali, in un tempo piuttosto breve, passano a forme amastigote (requisito importante per lo stabilirsi dell'infezione) e si riproducono per scissione binaria fino ad infarcire tutta la cellula ospite provocandone la distruzione. L'attività leishmanicida del macrofago è bassa a temperatura compresa fra 30 e 35°C; infatti nell'uomo le lesioni più gravi sulla pelle sono state rilevate in aree del corpo in cui la temperatura è mediamente di 30-32°C. In ospiti normorecettivi, non ignorando che, nel campo delle leishmaniosi sperimentale in piccoli animali da laboratorio come i topi, si siano riconosciuti individui geneticamente recettivi in contrapposizione ad individui geneticamente resistenti, il protozoo stimola l'attivazione delle difese immunitarie sia umorali (anticorpi) che cellulo-mediate.

Peraltro amastigoti e promastigoti sono in grado di opporsi agli anticorpi (Ac) sierici agganciandoli mediante gli antigeni (Ag) di superficie, il plasmalemma di questi protozoi può essere considerato come un mosaico costituito da una matrice lipidica e da molecole proteiche capaci di "movimenti direzionali", e poi eliminandoli come immunocomplessi (Ic), al contempo ricostituendo, secondo un turnover assai breve (3,5 - 4 ore), gli antigeni di superficie andati perduti.

L'esito dell'infezione è strettamente connesso al tipo di risposta immune che viene innescata. In particolare il controllo dell'infezione o l'evoluzione della malattia, sono legati alle popolazioni di linfociti T (LT), CD4+ e CD8+, responsabili del riconoscimento degli Ag presentati dai macrofagi e dell'attivazione dell'immunità cellulo-mediata.

L'abnorme produzione di Ac diretti anche contro strutture proprie dell'organismo (fenomeni immunopatologici autoimmunitari), che sono alla base di gran parte degli eventi patologici che si realizzano nei soggetti leishmaniotici.

Le Leishmanie posseggono dei determinanti d'infezione³²¹ che permettono con successo lo stabilirsi del parassita intracellulare in fagolisosomi nei macrofagi. I sintomi clinici potrebbero essere provocati da questi macrofagi infetti che interagiscono con determinati elementi nell'ospite. Alcuni determinanti molecolari sembrano fondamentali per la stabilizzazione intracellulare della leishmania. Questi determinanti sono:

- 1) glicosilfosfatidilinositoli
- 2) glicosilfosfolipide
- 3) lipofosfoglicano

- 4) fosfoglicano
- 5) proteofosfoglicano
- 6) leishmanolisina Gp63
- 7) cisteinproteasi

Il parassitismo intracellulare si realizza attraverso una precisa sequenza di eventi che inizia con la liberazione di fattori umorali litici da parte della cellula e quindi l'attacco dei parassiti ai macrofagi in seguito alla loro fagocitosi. I parassiti endocitizzati devono sopravvivere dentro la cellula e poi differenziarsi da amastigote a promastigote; infine i promastigoti si replicano.

Anche se il passaggio cruciale è l'infezione dei macrofagi da parte degli amastigoti, questo avviene con un meccanismo molto semplice viene infatti sfruttato il meccanismo d'azione dei macrofagi: questi fagocitano cellule, sia morenti che danneggiate, frammenti cellulari, ai quali possono essere attaccati alcuni amastigoti, e anche vacuoli contenenti materiale parassitario. Anche i promastigoti possono infettare i macrofagi ma ancora non si conosce il meccanismo d'azione.

Le leishmaniosi causate da *Leishmania Infantum* sono parassitosi importanti in campo veterinario ed un serio problema di sanità pubblica. Questa patologia veterinaria è endemica in Italia^{323,324}.

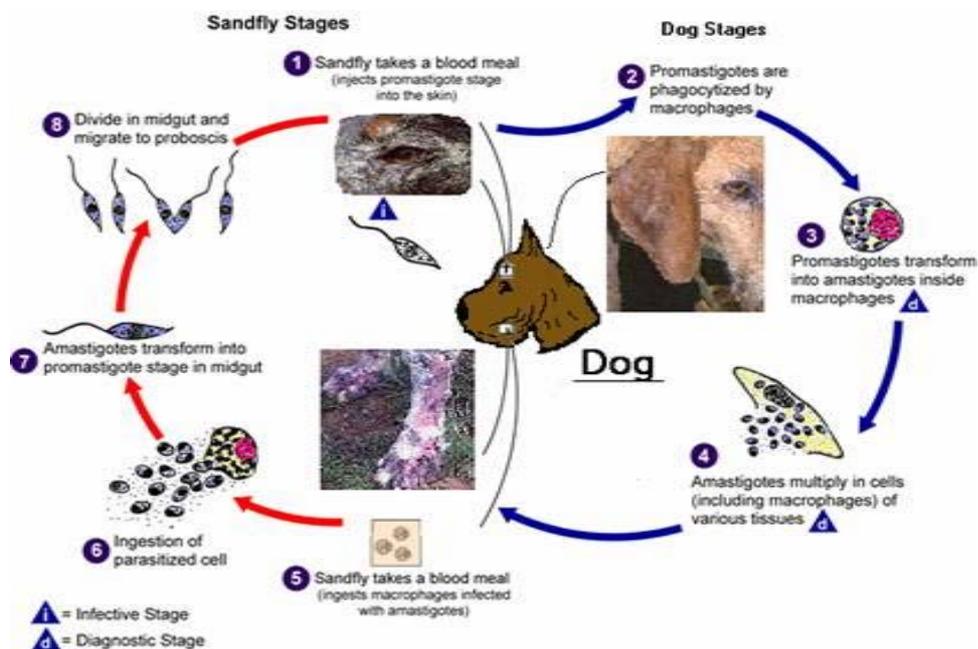


Fig. III.6- Ciclo biologico del parassita nel cane.

III.1.3- Trattamenti terapeutici

Fino a qualche tempo fa l'unico modo per confermare quest'infezione consisteva nei test cutanei approvati dalla FDA; attualmente i tests più usati sono quelli sierologici, ed in particolare i tests ELISA e i tests IFAT (immunifluorescenza indiretta).

Il trattamento primario per tutti i tipi di Leshmaniosi prevede l'impiego di composti antimoniali prevalentemente per via parenterale, la cui somministrazione prolungata (20-28 giorni) provoca una grave tossicità cardiaca ed epatica; inoltre nei confronti di tale trattamento si sono verificati anche fenomeni di resistenza³²⁰.

Farmaci di seconda scelta comprendono: Paramidina, Stilbamidina, Amfotericina B, un antibiotico macrolide antifungino. La loro somministrazione risulta, però, difficoltosa e comunque bisogna ricordare che questi farmaci inducono grave nefrotossicità.

Una delle scoperte più recenti è stato un derivato alchilfosfonico: la Miltefosina, primo farmaco somministrabile per via orale che ha dato buoni risultati sia per la forma viscerale che per quella cutanea³²⁴.

Hanno poi mostrato una certa utilità clinica Allopurinolo, Ketoconazolo e Fluconazolo.

Nel 1944 l'FDA ha approvato l'uso di un antibiotico: l'Aminosidina³²⁶, paromomicina non contenente l'antimonio, ma che induce comunque gravi effetti collaterali (ototossicità e nefrotossicità).

Il trattamento ed il controllo delle leishmaniosi sono perciò fortemente compromessi a causa del limitato numero di farmaci disponibile e della loro elevata tossicità; si rende quindi sempre più urgente l'individuazione di nuovi potenti e selettivi agenti terapeutici per ridurre i gravi effetti collaterali e contrastare i fenomeni di resistenza che si sono verificati negli ultimi anni, parallelamente alla crescente diffusione di questa parassitosi. I farmaci in uso sono stati scoperti empiricamente, ma attualmente, le conoscenze sulle differenze biologiche tra protozoi e organismi ospiti costituiscono sicuramente un'ottima opportunità per la progettazione e scoperta di nuovi farmaci dotati di una specifica tossicità nei confronti dei parassiti patogeni.

Nell'ambito veterinario il protocollo terapeutico più frequentemente usato in Italia è quello che prevede l'uso dell'antimoniato di N-metilglucamina in combinazione con allopurinolo.

Anche in ambito veterinario le ricerche sono rivolte verso un'immunomodulazione per condizionare il ripristino della giusta risposta immunitaria.

Nella figura III.7 sono riassunti i farmaci più comunemente usati nel trattamento delle leishmaniosi.

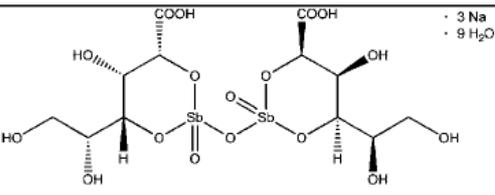
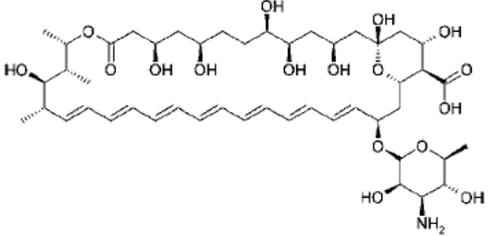
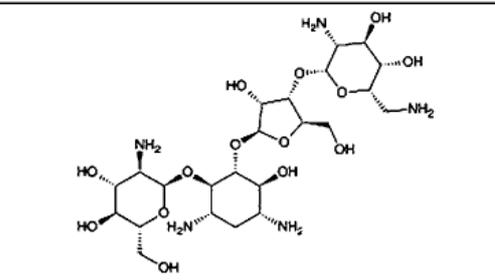
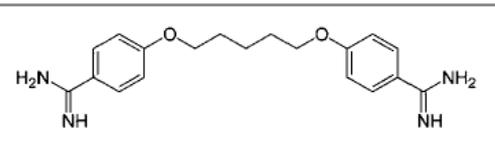
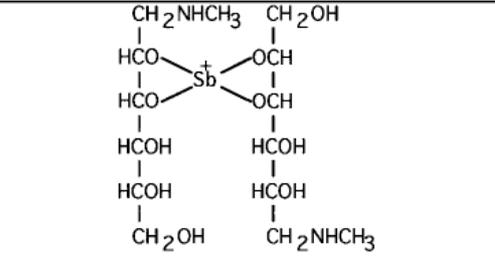
Name		2D - structure	Chemical formula	Molecular Mass (g/mol)
Commercial	Chemical			
Pentostam®	Sodium stibogluconate		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910.9
Fungizone	Amphotericin B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924.084
Humatin	Paromomycin sulfate		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615.629
Pentamidine	Pentamidine isethionate		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340.42
®Glucantime	Meglumine antimoniate		$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	507.01

Fig. III.7- Farmaci più comunemente usati nel trattamento della leishmaniosi³²⁷.

III.1.4- Ricerca Farmaceutica

La ricerca farmaceutica in tema di leishmaniosi non è ad oggi soddisfacente, questo però non dipende dall'interesse scientifico riposto in questo campo, ma piuttosto dalle difficoltà che biologi e chimici hanno riscontrato nello studio dei sistemi metabolici da una parte e nella realizzazione di farmaci specifici per il protozoo dall'altra.

Da un punto di vista biologico la leishmania è un microrganismo difficilmente riproducibile *in vitro* e questa problematica rende difficoltose le prove con nuovi farmaci, inoltre i saggi *in vivo* non hanno dato spesso risultati incoraggianti anche a causa della facilità di acquisizione di resistenza non solo al farmaco saggiato ma anche alla classe di molecole da cui deriva, fenomeno già conosciuto come multi-drug resistance (MDR).

I sistemi attraverso i quali il protozoo si mantiene in vita non sono stati chiariti del tutto e questo rappresenta, per i chimici farmaceutici, una grande limitazione nella ricerca di nuovi lead.

Alla luce di queste problematiche la ricerca di nuovi potenziali farmaci è stata orientata verso due strade molto differenti, di cui la prima privilegia l'inibizione di vie metaboliche specifiche, restringendo quindi il numero di molecole da saggiare, mentre la seconda interessa un maggior numero di potenziali farmaci senza però un meccanismo d'azione ben definito. Dai dati cristallografici ottenuti dall'isolamento di proteine presenti nel protozoo sono state evidenziate strutture specifiche che sono diventate bersagli di nuove molecole.

Il secondo tipo di approccio alla ricerca, invece, permette lo studio di un numero considerevolmente alto di nuove strutture molecolari. Sono state sfruttate le proprietà farmacologiche di altri farmaci come ad esempio farmaci attivi su altri protozoi, come gli anti-malarici, o farmaci citotossici come gli anti-neoplastici. Anche la ricerca dei vecchi rimedi nella medicina tradizionale ha suggerito lo studio e la sperimentazione di derivati da prodotti naturali.

a) Inibitori a meccanismo d'azione definito

- Inibitori della tripanotione reduttasi^{327,328};
- Inibitori della gliceraldeide 3-fosfodeidrogenasi³²⁹⁻³³¹;
- Inibitori delle nucleosidi idrolisi^{332,333};
- Inibitori del sistema di trasporto dei nucleotidi³³⁴;
- Inibitori della farnesilpirofosfato sintasi³³⁵;
- Inibitori della diidrofolato redattasi³³⁶;
- Inibitori della pteridina redattasi³³⁷;

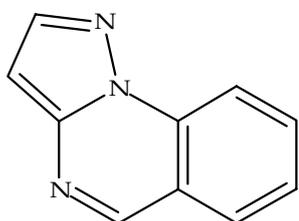
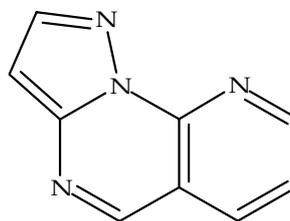
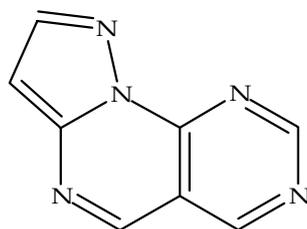
b) Attività anti-Leishmania con meccanismo definito

- Sostanze di origine naturale: artemisinina³³⁸, isolata dalle parti aeree dell'Artemisia annua; β -lapacone³³⁹, isolato dalla corteccia di alberi delle famiglie Bignoniaceae e Verbanaceae; stilbenoidi³⁴¹, derivanti dalle combrestatine; Licochalcone A³⁴¹, isolato dalla liquirizia cinese; Argentilactone³⁴², un δ -lattone α,β -insaturo isolato dai rizomi dell'Aristolchia Argentina; saponine sequiterpeniche³⁴³, estratte dalla pianta di Maesa Balansae;
- Sistemi condensati: pirazolo-pirimidine (allopurinolo, tiopurinolo e aminopurinolo)^{344,345}; 4-aminopirazolo-(3,4-diammino)pirimidina e 4-idrossi-pirazolo-pirimidina³⁴⁶; derivati pirazolo[3,4-*b*]pirazinici³⁴⁷; 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirimidine complessate con metalli³⁴⁸⁻³⁵⁰; derivati chinonici³⁵¹; benzotiazoli³⁵²;
- Derivati metallici: Sali di platino(IV) e rodio(III)³⁵³.

III.2- Progetto della Ricerca

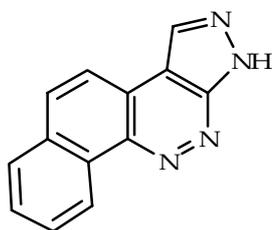
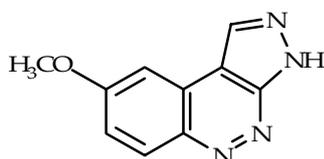
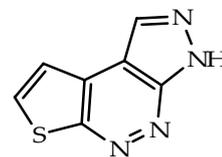
Come già visto in precedenza, il gruppo di ricerca del Prof. Bruni del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche si lavora su composti contenenti il nucleo pirazolo[1,5-*a*]pirimidinico, che si è dimostrato un nucleo estremamente versatile per reattività chimica e applicazioni farmacologiche e data l'isosteria tra tale nucleo ed il sistema purinico ha stimolato lo studio di possibili proprietà biologiche, in conseguenza del fatto che erano stati trovati derivatipirazolo-pirimidinici attivi contro varie specie di microrganismi quali *Trichomonas* e *Schistosoma*³⁵⁴.

Seguendo l'interesse sintetico per sistemi eteroaromatici policondensati contenenti l'anello pirazolico, come analoghi delle basi puriniche e pirimidiniche, sono state sviluppati precedentemente alcune serie di composti come potenziali agenti antiprotozoari per patologie correlate alle infestazioni del genere *Leishmania* nell'uomo e nel cane^{344,348}. Tale interesse nasce dal grave incremento e dall'ampia diffusione di dette patologie riscontrati nell'ultimo decennio e dall'osservazione che a fronteggiare tale emergenza sanitaria esistono farmaci datati e con effetti collaterali gravi.

Pirazolo[1,5-*a*]chinazolinePirazolo[1,5-*a*]pirido[3,2-*e*]pirimidinePirazolo[1,5-*a*]pirimido[5,4-*e*]pirimidine

Alla base di questo progetto, che risulta completamente nuovo rispetto alle applicazioni viste nei precedenti capitoli, riguardanti rispettivamente il CBR ed il TSPO, c'è la realizzazione del tutto inattesa, almeno inizialmente, di composti tricyclici e tetracyclici poliazotati. Come si è mostrato nel

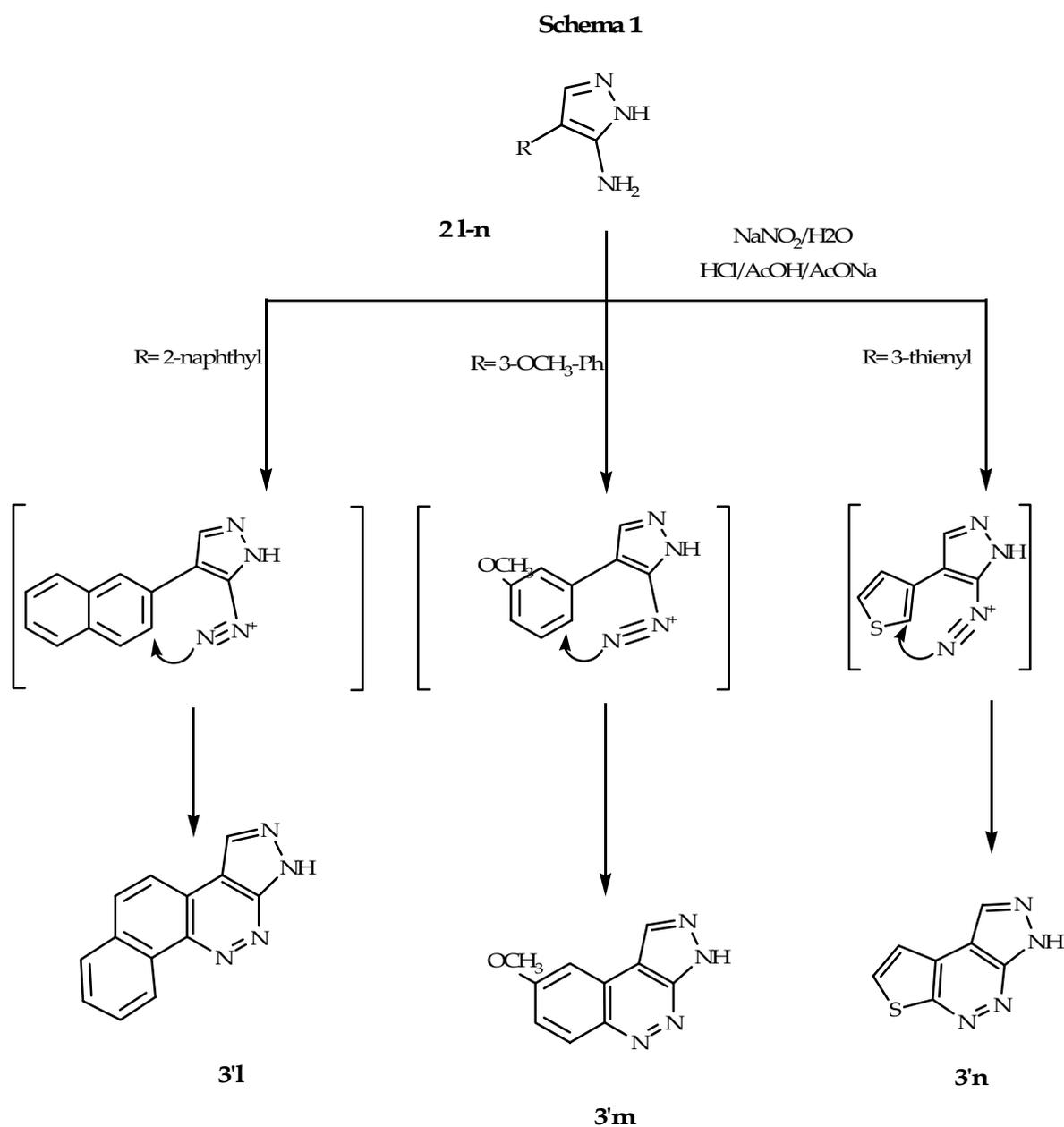
capitolo I.3 di questa tesi, la reazione di diazocopulazione per ottenere il nucleo pirazolo[5,1-c]triazinico, in alcuni casi ha portato alla formazione di pirazolo-cinnoline.

**3'l****3'm****3'n**

Una volta intuita la loro possibile applicazione come anti-parassitari, si è intrapreso un nuovo percorso sintetico allo scopo di funzionalizzare gli atomi di azoto presenti su queste strutture, in particolare N¹ e N². Questo si rende necessario inizialmente per aumentarne la solubilità in solventi organici, utilizzati in vari tipi di analisi e test biologici. Successivamente si è pensata un'ulteriore applicazione come potenziali antitumorali intercalanti il DNA che necessitano di atomi di azoto accettori di protoni.

III.3- Parte Chimica

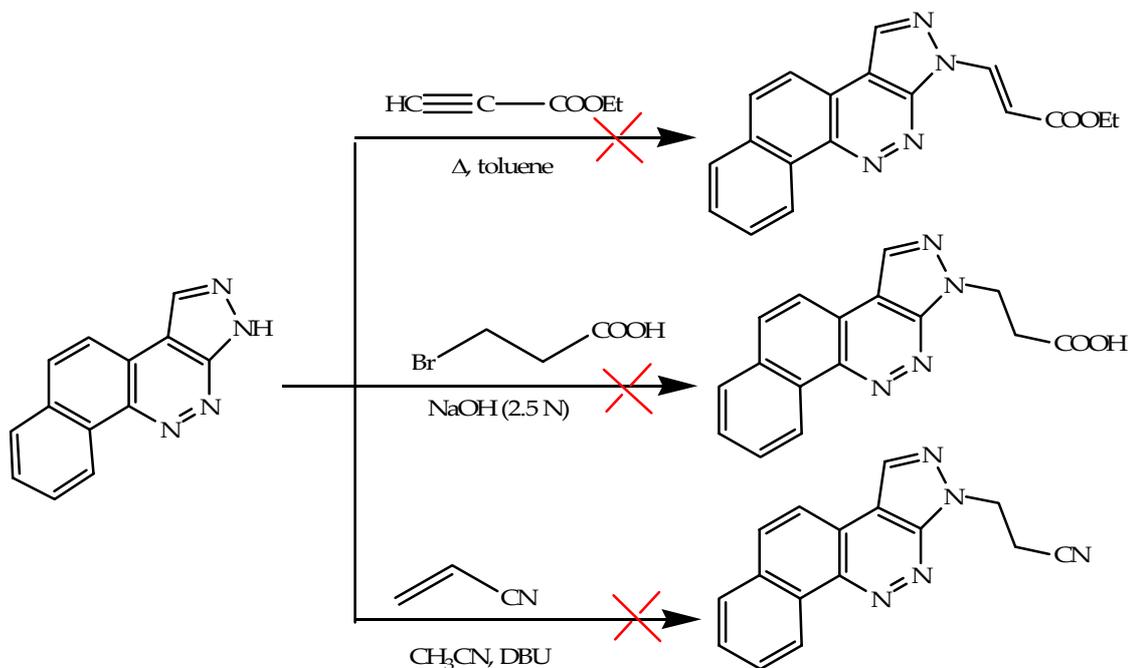
La sequenza sintetica che ha portato alla realizzazione delle strutture policicliche **3'l**, **3'm** e **3'n** è già stata discussa nella parte chimica riguardante il CBR (cap I.3) e viene qui sotto riportato l'ultimo step di reazione per ottenerle.



A causa della loro scarsa solubilità in molti solventi organici, usati per i saggi biologici, e prevedendone possibili nuove ed importanti applicazioni, si è deciso di tentare la funzionalizzazione di tali cinnoline, in particolare sugli atomi di azoto N¹ ed N² dei composti **3'l** e **3'm**.

Inizialmente si è pensato di intervenire direttamente sui prodotti finali, come si vede nello schema 2, dove sono rappresentati tre tentativi di inserimento di catene variamente funzionalizzate sul composto **3'1**^{355,356}.

Schema 2



Successivamente si è pensato di introdurre la funzionalizzazione su N¹ e N² già dallo step di reazione che prevede l'uso dell'idrazina, come si vede dallo Schema 3, infatti il 2-idrazinil-etanolo è il reagente utilizzato per l'ottenimento del nucleo pirazolico opportunamente funzionalizzato per la realizzazione dei prodotti finali **3L** e **3'L**. Questi si ritrovano come miscela isomerica (1:1) rispettivamente funzionalizzati su N¹ e N², risolta tramite cromatografia su colonna ed uno solo dei due regioisomeri è stato identificato con cristallografia a raggi X. Ciò ha reso possibile, grazie agli spettri ¹H-NMR, l'attribuzione strutturale di entrambi.

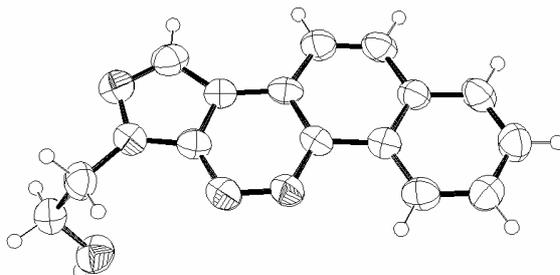
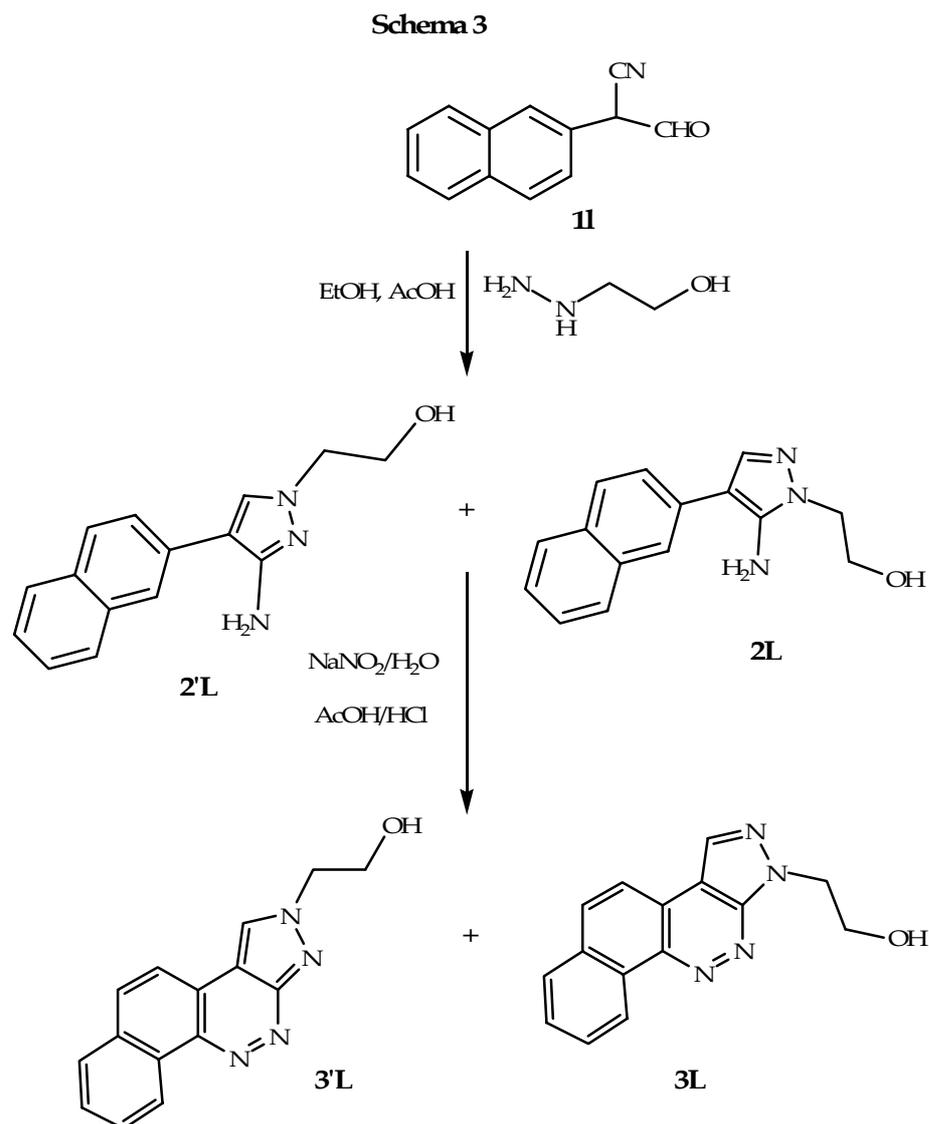
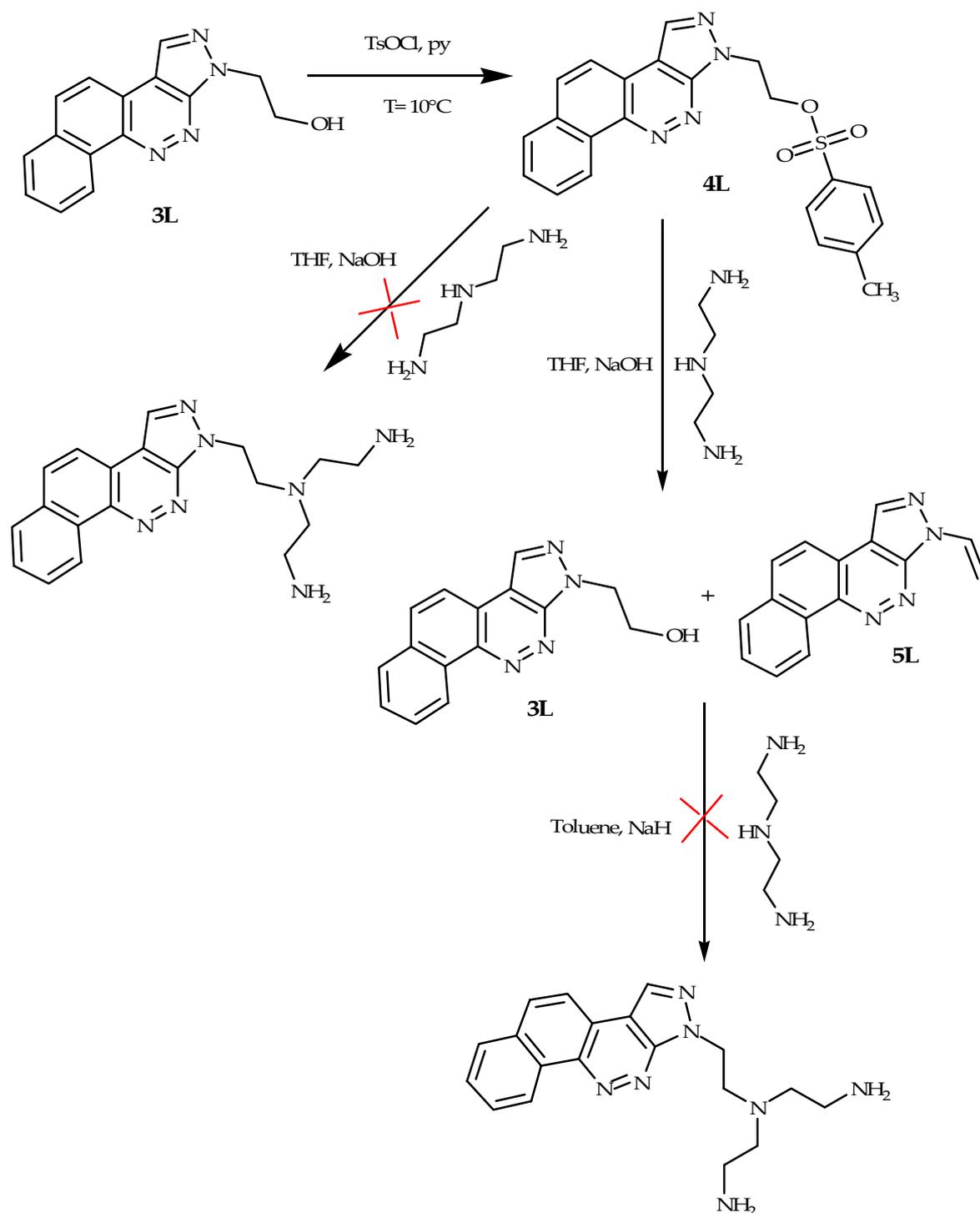


Fig.III.8- Diagramma della struttura cristallina, realizzato con programma ORTEP3, del composto 1-(benzopirazolo-pirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etanolo (**3'L**).



Nello Schema 4 viene riportato il tentativo di introdurre una catena alchilaminica sull' N². Il composto **3L** viene fatto reagire con acido p-toluensolfonico in presenza di piridina e si ottiene con resa molto buona l'intermedio **4L**, che è stato purificato tramite cromatografia su colonna e poi identificato con analisi spettroscopica ¹H-NMR. Su tale intermedio si effettua l'ultimo step di reazione in presenza di un largo eccesso di dietilen-triammina (1:20), allo scopo di ottenere un prodotto finale chelante bidentato³⁵⁷, ma anche questo tentativo non ha successo. Dall'ambiente di reazione si recuperano il prodotto di partenza detosilato (**3L**) e il composto **5L**, evidentemente derivante da una disidratazione del **3L**. Anche questo prodotto è stato isolato tramite cromatografia su colonna e caratterizzato con spettroscopia ¹H-NMR. Su quest'ultimo viene tentata nuovamente la reazione di addizione della catena alchilamidica chelante, questa volta sul doppio legame, ma anche in tal caso non si ottiene il prodotto atteso.

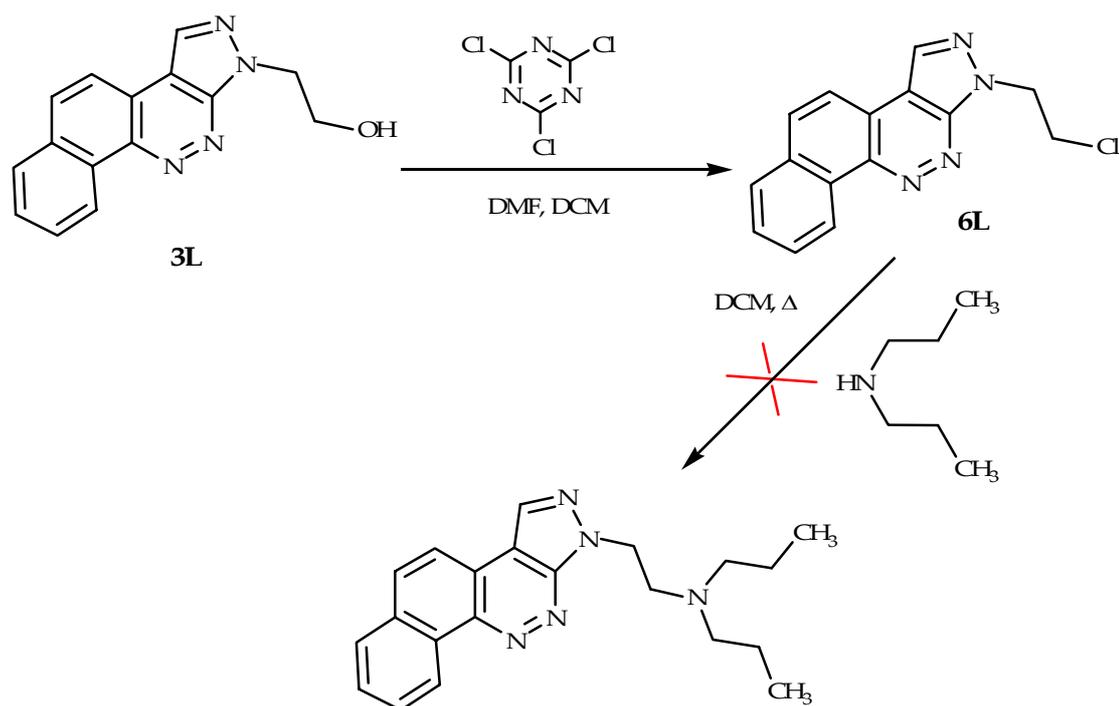
Schema 4



Nello Schema 5 è descritta un'altra reazione effettuata sul composto **3L**: si tratta di una clorurazione in presenza di 2,4,6-tricloro[1,3,5]triazina e DMF in DCM a temperatura ambiente³⁵⁹. La reazione avviene in tempi brevi e con una resa molto buona. Il prodotto **6L** ottenuto, è stato purificato tramite cristallizzazione ed identificato con spettroscopia di massa (ESI-MS) e $^1\text{H-NMR}$.

Il passaggio successivo ha previsto il tentativo di sostituzione dell'alogeno con dipropilammina, ma l'esito è stato ancora una volta negativo.

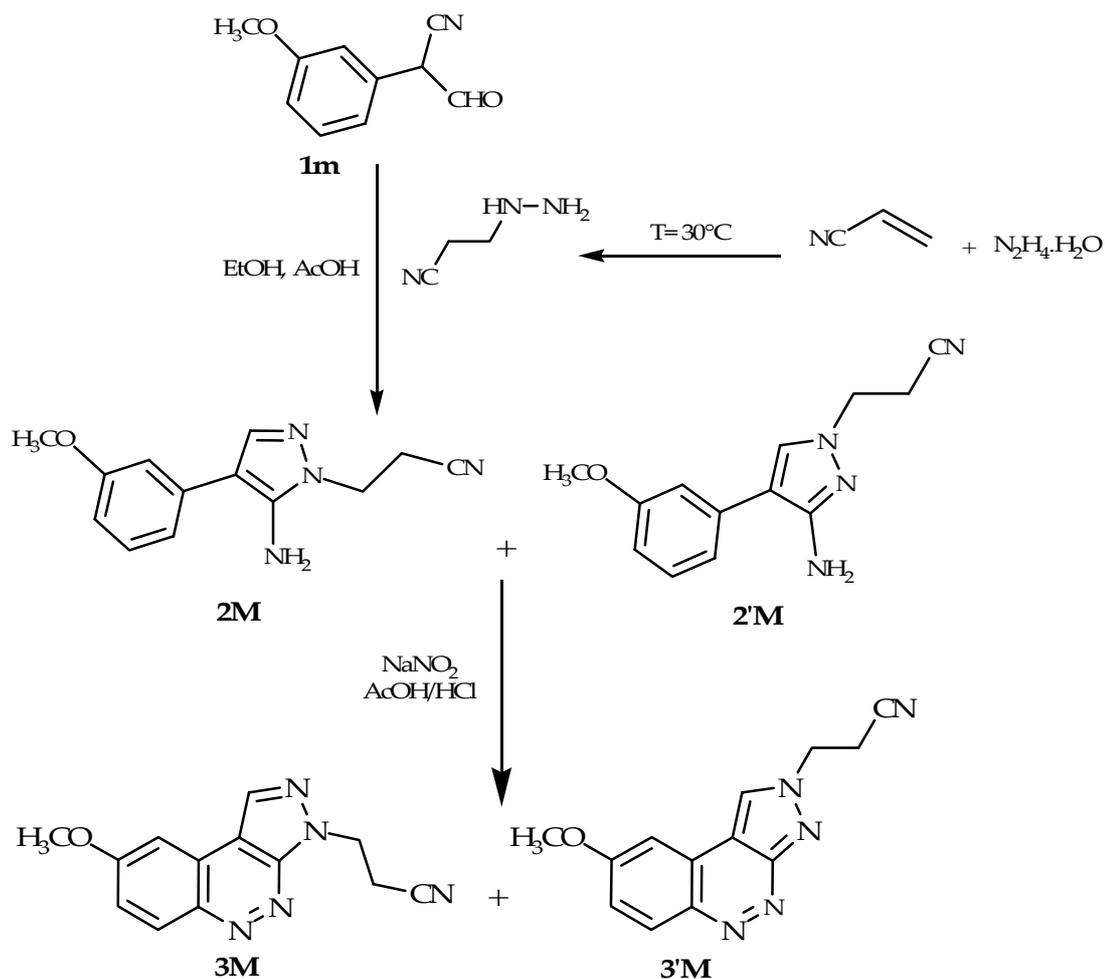
Schema 5



Nello Schema 6 è riportata la sintesi dei prodotti **3M** e **3'M**: il primo step prevede la reazione del formilderivato **1m** con idrazina precedentemente funzionalizzata con acrilonitrile. Si ottiene una miscela di aminopirazoli **2M** e **2'M** che non viene separata e viene fatta direttamente reagire secondo la solita reazione di diazotazione a dare i prodotti **3M** e **3'M**. Questi vengono separati tramite cromatografia su colonna e caratterizzati con spettrometria $^1\text{H-NMR}$.

I tentativi di riduzione del nitrile a CH_2CN , effettuati su questi composti, sono stati innumerevoli come si può vedere nell'elenco riportato nello Schema 6. Nessuno di questi ha portato alla formazione dei prodotti attesi.

Schema 6

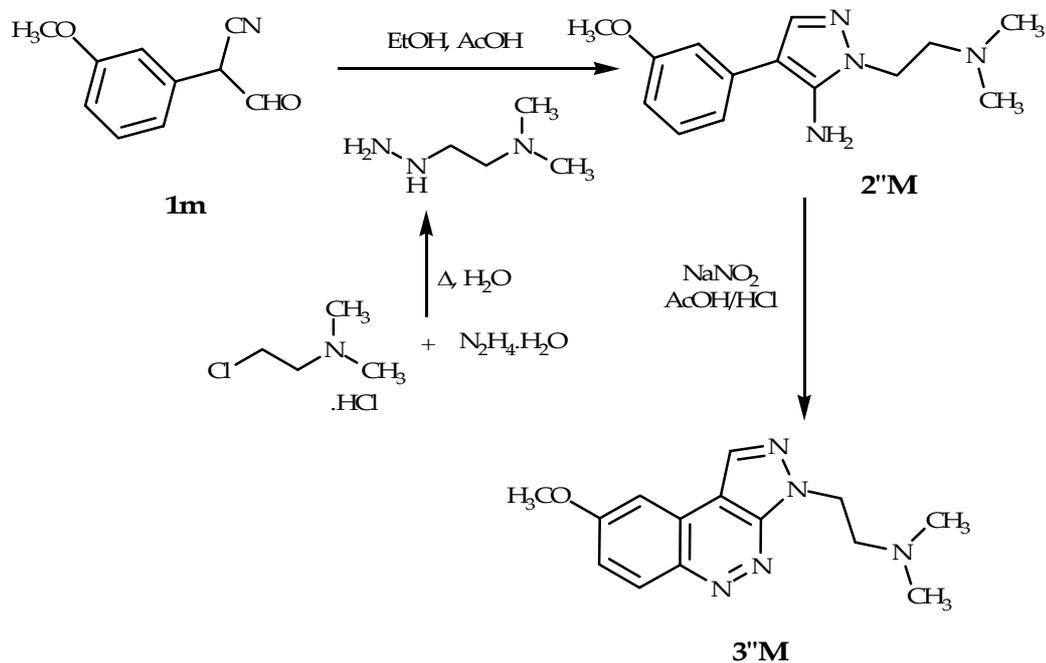


Tentativi di riduzione del gruppo $-\text{CN}$ a gruppo $-\text{CH}_2\text{NH}_2$:

- NiCl_2 , NaBH_4 , EtOH abs, N_2 ³⁵⁹;
- $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , EtOH;
- $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , EtOH abs, N_2 ;
- $\text{S}(\text{CH}_3)_2\text{BH}_3$, THF, Δ ;
- $\text{S}(\text{CH}_3)_2\text{BH}_3$, dyglime, Δ ;
- LiAlH_4 , dyglime, Δ .

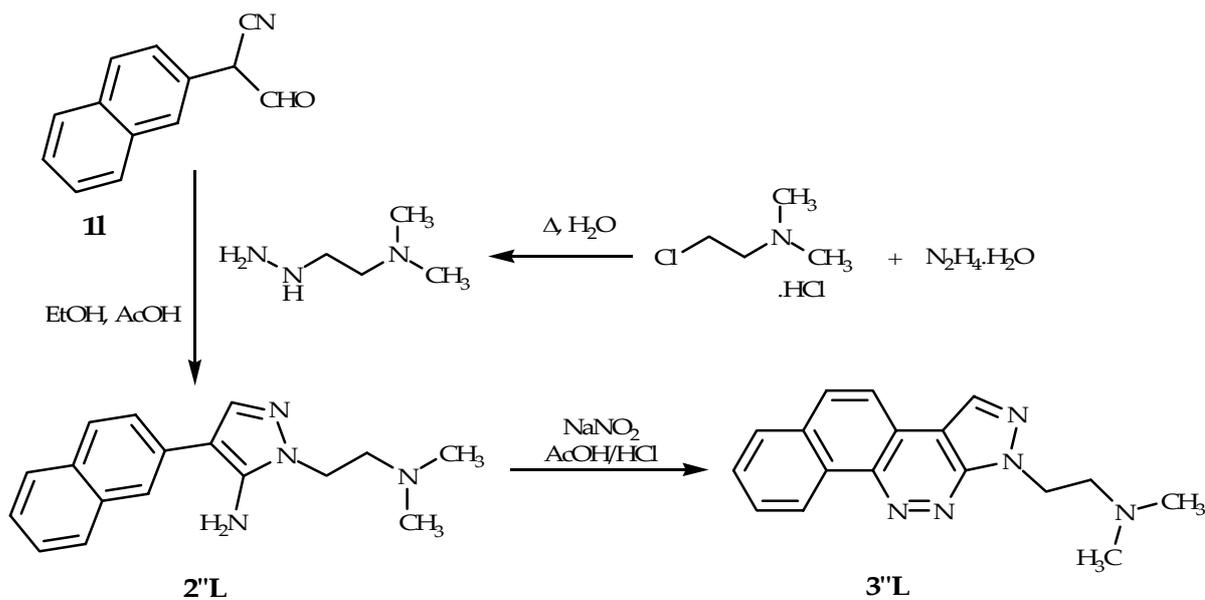
Per riuscire ad inserire un gruppo alchilammिनico sugli N^1 e N^2 dei policicli in questione, si è fatto un ulteriore tentativo, funzionalizzando l'idrazina con il cloridrato del β -dimetilammino cloruro³⁶⁰, e facendo successivamente reagire questa con il formil derivato **1m**. L'aminopirazolo **2''M** si forma con buone rese e porta alla formazione del prodotto finale **3''M**, purificato tramite cromatografia su colonna e caratterizzato con spettrometria ^1H -NMR e cristallografia a Raggi X.

Schema 7



Nell'ultimo schema di reazione, Schema 8, viene riportata la stessa via sintetica appena descritta, che in questo caso porta alla formazione del prodotto finale **3''L**. Quest'ultimo analogamente viene purificato tramite cromatografia su colonna e caratterizzato con spettrometria $^1\text{H-NMR}$.

Schema 8



III.4- Relazioni Struttura-Affinità/ Attività

I composti sintetizzati come anti-parassitari ed in particolare come anti-leishmania sono stati testati in vitro dalla Dott.ssa Campisi del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università di Firenze.

Attualmente siamo in possesso di dati preliminari riguardanti i composti **3'm**, **3'n**, **3L** e **3'L** .

Il trattamento con Anfotericina B, come ci si aspetta, mostra un'attività molto alta: dopo 24 ore di incubazione i parassiti sono tutti morti.

Per quanto riguarda i nostri composti, invece, dai test non si riscontrano sostanziali variazioni nella motilità e nel numero dei parassiti vitali rispetto ai promastigoti controllo.

Inoltre sono già in corso saggi biologici *in vivo* (tipo ELISA) per testare l'attività antitumorale dei composti **3L**, **3'L**, **3'M**, **3''L**, presso la Dott.ssa Sissi del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova

III.5- Parte Sperimentale

III.5.1- Parte Sperimentale Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Gallenkamp e non sono corretti.

Le analisi elementari sono state realizzate per C, H, N con apparecchio Perkin Elmer 240 C e risultano \pm 0,4% dei valori teorici.

Lo spettro ^1H è stato realizzato con apparecchio Avance 400 Bruker e i chemical shifts sono stati riportati in δ (ppm).

I campioni sono stati controllati con T.L.C. realizzata con lastrine Merck silica gel F 254. La separazione cromatografica è stata realizzata utilizzando gel di silice 60 (Merck, 70-230 mesh).

L'indagine diffrattometrica a raggi X è stata eseguita con diffrattometro OXFORD XCALIBUR3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 0.71068 \text{ \AA}$) del Centro Intradipartimentale di Cristallografia Strutturale (C.R.I.S.T.), ad opera della Dott.ssa Carla Bazzicalupi.

Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro LTQ (ThermoFisher, San José, California USA).

Procedura generale per la sintesi dei composti 3'1, 3'm, 3'n.

Una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (**2l***, **2m***, **2n***, 10 mmol) in acido acetico (16 ml) e HCl concentrato (6 ml) viene raffreddata in bagno di ghiaccio fino a 5°C, quindi viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaNO_2 (10 mmol) in acqua (3 ml). Dopo circa un'ora si toglie il bagno di ghiaccio e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione magnetica per 30 minuti, quindi si aggiunge acqua e, filtrando, si recupera il precipitato solido.

* per la sintesi di questi amino-pirazoli vedere Capitolo I.5.

1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolina (3'1)

Cristalli da bianchi da etanolo, resa 90%, p.f. $>300^\circ\text{C}$, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ ppm: 7.70-8.0 (m, 2H, naft), 8.1-8.3 (s, 1H, naft), 8.35-8.55 (m, 2H, naft), 8.90-9.00 (s, 1H, naft) 9.6 (s, 1H, H-2).

Analisi strutturale a raggi X: un cristallo singolo di forma prismatica e di colore beige adatto per indagine diffrattometrica a raggi X è stato montato su un diffrattometro OXFORD XCALIBUR 3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 0.71069$). La raccolta è stata condotta a temperatura ambiente. La struttura è stata risolta per mezzo dei metodi diretti del programma SIR97³⁶¹ e raffinata anisotropicamente con il metodo di minimi quadrati del programma SHELX-97³⁶². Dati cristallografici: $a = 12.242(5) \text{ \AA}$, $b = 4.749(2) \text{ \AA}$, $c = 17.433(7) \text{ \AA}$, sistema ortorombico, gruppo spaziale $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}_1$. Dati relativi alla raccolta ed al trattamento dei dati: 3323 riflessi raccolti dei quali 1599 unici usati per il raffinamento,

fattori di accordo al termine del raffinamento: 0.0542 per 138 parametri e 408 riflessi con $I > 2 \sigma(I)$. Il diagramma della struttura cristallina è stato realizzato con il programma ORTEP3³⁶³.

8-metossi-3H-pirazolo[3,4-c]cinnolina (3'm)

Cristalli gialli da etanolo, resa 90%, p.f. 262°-263°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7.42-7.48 (m, 1H, m-Ph), 7.87-7.91 (d, 1H, m-Ph), 8.78-8.82 (s, 1H, H-2), 8.48-8.55 (m, 1H, m-Ph).

Analisi strutturale a raggi X: un cristallo singolo di forma prismatica e di colore giallo adatto per indagine diffrattometrica a raggi X è stato montato su un diffrattometro OXFORD XCALIBUR 3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 0.71068$). La raccolta è stata condotta a temperatura ambiente. La struttura è stata risolta per mezzo dei metodi diretti del programma SIR97³⁶¹ e raffinata anisotropicamente con il metodo di minimi quadrati del programma SHELX-97³⁶². Dati cristallografici: $a = 7.429(3)$ Å, $b = 9.220(3)$ Å, $c = 13.554(6)$ Å, $\beta = 102.09(3)$ Å, sistema monoclinico, gruppo spaziale P2₁/n. Dati relativi alla raccolta ed al trattamento dei dati: 3323 riflessi raccolti dei quali 1599 unici usati per il raffinamento, fattori di accordo al termine del raffinamento: 0.0542 per 138 parametri e 408 riflessi con $I > 2 \sigma(I)$. Il diagramma della struttura cristallina è stato realizzato con il programma ORTEP3³⁶³.

3H-pirazolo[3,4-c]tieno[3,2-e]piridazina (3'n)

Cristalli beige da etanolo, resa 80%, p.f. 258°-261°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 7.93-7.98 (d, 1H, tienile), 8.48-8.53(d, 1H, tienile), 8.60-8.64(s, 1H, H-2).

Analisi strutturale a raggi X: un cristallo singolo di forma prismatica e di colore beige adatto per indagine diffrattometrica a raggi X è stato montato su un diffrattometro OXFORD XCALIBUR 3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 1.5418$). La raccolta è stata condotta a temperatura ambiente. La struttura è stata risolta per mezzo dei metodi diretti del programma SIR97³⁶¹ e raffinata anisotropicamente con il metodo di minimi quadrati del programma SHELX-97³⁶². Dati cristallografici: $a = 48.166(9)$ Å, $b = 3.790(5)$ Å, $c = 28.933(4)$ Å, $\beta = 123.66(1)$ Å, sistema monoclinico, gruppo spaziale C2/c. Dati relativi alla raccolta ed al trattamento dei dati: 3323 riflessi raccolti dei quali 1599 unici usati per il raffinamento, fattori di accordo al termine del raffinamento: 0.0542 per 138 parametri e 408 riflessi con $I > 2 \sigma(I)$. Il diagramma della struttura cristallina è stato realizzato con il programma ORTEP3³⁶³.

Procedura per la sintesi della miscela di 2-(3-amino-4-(naftalen-2-il)-piralol-1-il)etanolo (2'L) e 2-(5-amino-4-(naftalen-2-il)-piralol-1-il)etanolo (2L)

Ad una soluzione del formilacetone nitrile 2-naftil sostituito (**11**) (15 mmol) in etanolo (30 ml), viene aggiunto 2-idrazinil-etanolo (30 mmol) e acido acetico glaciale (3 ml); la miscela di reazione viene tenuta a riflusso per circa 2 ore sotto agitazione magnetica. Quindi viene evaporato l'etanolo, si raffredda il

residuo oleoso giallo in bagno di ghiaccio e si aggiunge abbondante acqua per favorire la precipitazione. Il solido formatosi viene filtrato e lavato con acqua.

Solido giallo, resa 60%. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 3.74-4.06 (m, 8H, CH₂-CH₂), 4.70-4.84 (s slargato, 2H, NH₂ scambiabile), 5.45-5.52 (s slargato, 2H, NH₂ scambiabile), 7.39-8.05 (m, 14H, naftile).

Procedura per la sintesi della miscela di 2-(benzopirazolo[3,4-c]cinnolin-2-il)etanolo (3L) e 2-(benzopirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etanolo (3'L)

Una soluzione della miscela di aminopirazoli (2L e 2'L, 5 mmol) in acido acetico (4 ml) e HCl concentrato (1,5 ml) viene raffreddata in bagno di ghiaccio fino a 5°C, quindi viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaNO₂ (5 mmol) in acqua (2 ml). Dopo circa un'ora si aggiunge abbondante acqua e si lascia a sé per la notte. La mattina successiva recupero, filtrando sottovuoto, un precipitato giallo vivo. La resa della reazione è del 90% sulla miscela.

La miscela di isomeri (1:1) viene separata tramite cromatografia su colonna con eluente Toluene/ EtOAc /AcOH (8/2/1).

2-(benzopirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etanolo (3L)

Solido giallo cristallino, p. f. 249°-251°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 4.04-4.05 (t, 2H, CH₂-N), 4.92-4.95 (t, 2H, CH₂-O), 7.82-7.85 (dd, 1H, naft), 7.91-7.95 (dd, 1H, naft), 8.17-8.19 (d, 1H, naft), 8.41-8.42 (dd, 1H, naft), 8.91 (1H, s, H-2), 9.52-9.54 (d, 1H, naft).

2-(benzopirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etanolo (3'L)

Solido bianco, p. f. 195°-196°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 4.02-4.04 (t, 2H, CH₂-N), 4.70-4.73 (t, 2H, CH₂-O), 7.79-7.83 (dd, 1H, naft), 7.90-7.94 (dd, 1H, naft), 8.18-8.20 (d, 1H, naft), 8.39-8.40 (dd, 1H, naft), 9.17 (s, 1H, H-2), 9.56-9.58 (d, 1H, naft).

Analisi strutturale a raggi X: un cristallo singolo di forma prismatica e incolore adatto per indagine diffrattometrica a raggi X è stato montato su un diffrattometro OXFORD XCALIBUR 3 equipaggiato con radiazione di Mo ($\lambda = 1.5418$). La raccolta è stata condotta a temperatura ambiente. La struttura è stata risolta per mezzo dei metodi diretti del programma SIR97³⁶¹ e raffinata anisotropicamente con il metodo di minimi quadrati del programma SHELX-97³⁶². Dati cristallografici: $a = 18.760(9)$ Å, $b = 4.741(2)$ Å, $c = 13.800(7)$ Å, $\beta = 83.57(4)$ Å, sistema monoclinico, gruppo spaziale P2₁/c. Dati relativi alla raccolta ed al trattamento dei dati: 3323 riflessi raccolti dei quali 1599 unici usati per il raffinamento, fattori di accordo al termine del raffinamento: 0.0542 per 138 parametri e 408 riflessi con $I > 2 \sigma(I)$. Il diagramma della struttura cristallina è stato realizzato con il programma ORTEP3³⁶³.

Procedura per la sintesi di 2-(benzopirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etil 4-metilbensolfonato (4L)

Ad una soluzione del composto **3L** (0.5 mmol) in piridina (6 ml) in bagno di ghiaccio ad una temperatura inferiore a 10°C si aggiunge p-TsOH (1 mmol) e si lascia sotto agitazione in corrente di N₂ per 5 ore la reazione è finita. La miscela di reazione viene diluita con 50 ml di DCM, lavata per tre volte con acqua (30 ml X 3) e il solvente eliminato sottovuoto. Il liquido bruno residuo, lasciato a sé per la notte, cristallizza.

Solido cristallino beige, resa 86%, p. f. 167°-169°C, ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 4.77-4.80 (t, 2H, CH₂-N), 5.15-5.18 (t, 2H, CH₂-O), 6.94-6.96 (d, 2H, Ph), 7.47-7.50 (d, 2H, Ph), 7.80-7.83 (m, 1H, naft), 7.91-7.95 (m, 1H, naft), 8.04-8.10 (m, 1H, naft), 8.23-8.25 (d, 1H, naft), 8.49 (s, 1H, H-2), 9.18-9.21 (d, 1H, naft).

Tentativo di sintesi di N1-(2-(1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)etil)-N1-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina

Ad una soluzione del composto **4L** (0.35 mmol) in THF viene aggiunta goccia a goccia una soluzione aq di NaOH (0.38 mmol in 2 ml) e dietilentriammina (6.5 mmol). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a riflusso per 5 ore. Quindi si aggiungono 10 ml di DCM e si estrae il prodotto. Una volta portata a secco sotto vuoto la fase organica, si ottiene un solido appiccicoso giallo. Tramite cromatografia su colonna con eluente CH₂Cl₂/MeOH (10/0.5) si isolano due diversi composti che non corrispondono al prodotto atteso: il prodotto **3L** ed il prodotto **5L**.

1-vinil-1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolina (5L)

Solido cristallino marrone chiaro, p.f. 183°-186°C, ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 5.25-5.31 (d, 1H, CH_{vinilico}-N), 5.15-5.18 (d, 1H, CH_{vinilico} terminale), 8.75-8.82 (dd, 1H, naft), 8.91-8.99 (dd, 1H, naft), 8.05-8.19 (m, 3H, naft), 8.24-8.31 (dd, 1H, naft), 8.61 (s, 1H, H-2), 9.72-9.79 (d, 1H, naft).

Procedura per la sintesi di 1-(2-cloroetil)-1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolina (6L)

Per la formazione del complesso TCT-DMF si mettono Triclorotriazina (0.5 mmol) e DMF (4 ml) sotto agitazione con tappo a CaCl₂ e in corrente di N₂. Dopo circa 30 minuti si forma un precipitato, a questo punto si sgocciola rapidamente una soluzione di **3'L** (0.5 mmol) in DCM (20 ml) e lascio sotto agitazione. Dopo circa 1 ora la reazione è finita: vengono aggiunti altri 10 ml di DCM e lavo con acqua per 3 volte (30 ml x 3). Dopo aver evaporato a secco recupero un prodotto solido.

Solido giallo, resa 90%, p. f. 160°-163°C, eluente: EtOAc. ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 4.22-4.25 (t, 2H, CH₂-Cl), 5.25-5.31 (t, 2H, CH₂-N), 7.78-7.84 (dd, 1H, naft), 7.92-7.96 (dd, 1H, naft), 8.04-8.06 (d, 1H, naft), 8.14-8.16 (d, 1H, naft), 8.25-8.27 (d, 1H, naft), 8.60-8.61 (s, 1H, H-2), 9.77-9.80 ((d, 1H, naft).

MS(ESI) m/z: 283.18 ([M+H]⁺).

Procedura per la sintesi della miscela 3-(3-amino-4-(3-metossifenil)-1H-pirazol-1-il)propionitrile (2M) e 3-(5-amino-4-(3-metossifenil)-1H-pirazol-1-il)propionitrile (2'M)

Ad una soluzione di **1m** (25 mmol) in EtOH (20 ml) e AcOH (5 ml) si aggiunge 3-idrazinil-propionitrile precedentemente sintetizzato* e si lascia a riflusso sotto agitazione per circa 4 ore. Quando la reazione è terminata, si recupera per filtrazione un prodotto grezzo.

Solido rosa chiaro, eluente colonna: CH₂Cl₂/MeOH (10/1). ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 3.04-3.07 (t, 2H, CH₂-CN), 3.86 (s, 3H, OMe), 4.25-4.48 (s slargato, 2H, NH₂), 4.52-4.55 (t, 2H, CH₂-N), 6.85-6.97 (m, 3H, m-Ph), 7.28-7.38 (dd, 1H m-Ph), 7.6 (s, 1H, H-2).

***Procedura per la sintesi del 3-idrazinil-propionitrile**

In un pallone contenente acrilonitrile (108 mmol) viene sgocciolata lentamente idrazina idrata (108 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a 30°C per 2 ore. Il colore diventa osato e si aggiunge direttamente nell'ambiente di reazione il composto da condensare.

Procedura per la sintesi della miscela 3-(8-metossi-2H-pirazolo[3,4-c]cinnolin-2-il)propionitrile (3M) e 3-(8-metossi-3H-pirazolo[3,4-c]cinnolin-3-il)propionitrile (3'M)

Una soluzione della miscela di aminopirazoli (**2M** e **2'M**, 1.16 mmol) in acido acetico (4 ml) e HCl concentrato (2ml) viene raffreddata in bagno di ghiaccio fino a 5°C, quindi viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaNO₂ (1.16 mmol) in acqua (2 ml). Dopo circa un'ora si aggiunge abbondante acqua e si lascia a sé per la notte. La mattina successiva recupero, filtrando sottovuoto, un precipitato rosa chiaro. La resa della reazione è del 75% sulla miscela.

Solido rosa chiaro, eluente colonna: Tol/EtOAc/acOH (8/2/1). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 3.31-3.34 (t, 2H, CH₂-CN), 4.05 (s, 3H, OMe), 5.08-5.11 (t, 2H, CH₂-N), 7.48-7.51 (d, 1H, m-Ph), 7.93 (s, 1H, m-Ph), 8.56-8.58 (d, 1H, m-Ph), 8.88 (s, 1H, H-2).

Procedura per la sintesi di 2''M e 2''L

Ad una soluzione dell'opportuno formilderivato (**1m**, **1l**, 6 mmol) in EtOH (20 ml) e AcOH (5 ml) si aggiunge 2-idrazinil-N,N-dimetiletanamina precedentemente sintetizzata* e si lascia a riflusso sotto agitazione per circa 3 ore. Quando la reazione è terminata, si recupera un prodotto grezzo evaporando sotto vuoto.

1-(2-(dimetilamino)etil)-4-(3-metossifenil)-1H-pirazol-5-amina (2''M)

Solido appiccicoso scuro, eluente colonna: Tol/EtOAc/acOH (8/2/1). ¹H-NMR (CDCl₃) δ ppm: 2.06 (s, 3H, N-Me), 2.21 (s, 3H, N-Me), 3.14-3.17 (t, 2H, CH₂-CN), 3.85 (s, 3H, OMe), 4.39-4.42 (t, 2H, CH₂-N),

4.83 (s slargato, 2H, NH₂), 6.77-6.79 (d, 1H, m-Ph), 6.91-6.97 (d, 1H, m-Ph), 7.28-7.33 (m, 2H, m-Ph), 7.47 (s, 1H, H-2).

1-(2-(dimetilamino)etil)-4-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-5-amina (2''L)

Olio scuro, eluente colonna: Tol/EtOAc/acOH (8/2//1). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2.34-2.56 (s, 6H, N-Me), 2.97-3.17 (t, 2H, CH₂-CN), 4.97-5.01 (t, 2H, CH₂-N), 5.98-5.34 (s slargato, 2H, NH₂), 7.85-7.87 (dd, 1H, naft), 7.92-7.96 (dd, 1H, naft), 8.20-8.21 (d, 1H, naft), 8.44-8.46 (m, 2H, naft), 8.95 (s, 1H, H-2), 9.54-9.56 (d, 1H, naft).

***Procedura per la sintesi del 2-idrazinil-N,N-dimetiletanamina**

Ad una soluzione di idrazina idrata (168 mmol) in acqua (50 ml) sotto agitazione si fanno piccole aggiunte di 2-dimetilaminoetilcloruro.HCl (50 mmol). Terminata l'aggiunta, si lascia sotto agitazione per 1 ora, quindi si aggiunge K₂CO₃ e si lascia a riflusso per circa 7 ore. Una volta raffreddata la soluzione, aggiungo NaOH (25 g) e lascio sotto agitazione fino a completa dissoluzione. Il prodotto viene estratto in etere di etilico, anidrificato ed evaporato a secco, per recuperare un olio giallo molto chiaro (resa 27%).

Procedura per la sintesi di 3''M e 3''L

Una soluzione dell'opportuno aminopirazolo (2''M e 2''L, 6.4 mmol) in acido acetico (20 ml) e HCl concentrato (10 ml) viene raffreddata in bagno di ghiaccio fino a 5°C, quindi viene aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaNO₂ (6.4 mmol) in acqua (4 ml). Dopo circa un'ora si blocca l'agitazione e si lascia a sé per la notte. La mattina successiva aggiungo AcONa fino a pH 4-5, estraggo in EtOAc recupero, evaporando sotto vuoto, un olio marrone molto denso.

2-(8-metossi-3H-pirazolo[3,4-c]cinnolin-3-il)-N,N-dimetiletanamina (3''M)

Solido rosso scuro, resa 80%, p. f. 180°C, eluente colonna: CH₂Cl₂/MeOH (10/1). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.71-1.73 (s, 3H, N-Me), 2.17 (s, 3H, N-Me), 2.89-3.00 (t, 2H, CH₂-CN), 4.04 (s, 3H, OMe), 4.90-4.98 (t, 2H, CH₂-N), 7.46-7.48 (d, 1H, m-Ph), 7.90 (s, 1H, m-Ph), 8.53-8.55 (d, 1H, m-Ph), 8.79 (s, 1H, H-2).

Dati cristallografici disponibili presso il C.R.I.S.T.

2-(1H-benzo[h]pirazolo[3,4-c]cinnolin-1-il)-N,N-dimetiletanamina (3''L)

Solido rosso scuro, resa 76%, p. f. 115-1117°C, eluente colonna: CH₂Cl₂/MeOH (10/1). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2.22 (s, 6H, N-Me), 2.96-2.98 (t, 2H, CH₂-CN), 4.97-5.00 (t, 2H, CH₂-N), 7.85-7.87 (dd, 1H, naft), 7.92-7.97 (dd, 1H, naft), 8.20-8.21 (d, 1H, naft), 8.40-8.44 (m, 2H, naft), 8.96 (s, 1H, H-2), 9.50-9.53 (d, 1H, naft).

III.5.2- Parte Sperimentale Biologica

Antileishmanial agents. 3'm, 3'l, 3L e in DMSO solutions.

Parasite. *Leishmania infantum* promastigotes (strain MON 1).

Cultures. *L. infantum* promastigotes were maintained at 22 °C by weekly subpassages in biphasic Evans modified Tobie's medium added with proline Balanced Salts Solution (PBSS) (**Evans D.: Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania 1989 WHO**).

For subcultures and susceptibility tests we used RPMI 1640 medium (AppliChem, Ottoweg, Germany) buffered with NaHCO₃ 2g/l (pH 7.2), supplemented with L-glutamine 2mM (Fluka) and 20% of heat inactivated Fetal Calf Serum (Biowittaker Europe).

Initial parasite concentrations were 5 x 10⁵ flagellates per ml of medium, and the cultures were performed at 22°C.

Promastigote drug susceptibility assay. Promastigote drug susceptibility determinations were made using a direct assay based on growth inhibition and viability evaluation.

Briefly, promastigotes from late log phase of growth (10⁶ promastigotes/ml) were seeded in 96-well flat-bottom microtrays (Nunc) in a final volume of 100 µl under adequate above mentioned culture conditions .

10 µl of each drug (final concentration 5 and 50 µg/ml) were added in 90 µl of promastigote suspension in duplicate.

Amphotericine B (final concentration 0,5 and 5 µg/ml) was used as positive antileishmania activity control.

Controls for the promastigote viability and for the DMSO toxicity were also prepared.

After 24 and 48 hours of incubation the sensitivity to each drug was evaluated on the basis of tests assessing promastigote viability: cell motility, Cell Counting Assay and Trypan Blue Dye Exclusion Assay (TBDEA).

From each well a sample of 10µl was taken and the parasites were observed in a Burker chamber at 400x magnification to assess the promastigotes number and motility. For the TBDEA the parasites were collected after centrifugation (1400g, 5min at room temperature), washed and resuspended in phosphate saline buffer (PBS), then an equal volume of trypan blue (0,4% in PBS, final concentration 0,2%) was added, well mixed and left for 5 min at room temperature. Cells were examined at a light Microscope (Nikon Eclipse E400) at the x 400 final magnification.

Non-motile blu stained parasites were considered damaged. The dye excluding and the still refringent ones were counted as alive.

Bibliografia

1. Nutt D. J., Glue P., Lawson C., *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 14, 737-752 (1990).
2. Pratt J. A., *Pharmacol. Ther.* 55, 149-181 (1992).
3. Olsen R. W., Avoli M., *Epilepsia* 38,399-407 (1997).
4. Fritschy J. M., Kiener T., Bouillert V., Loup F., *Neurochem. Internat.* 34, 435-445 (1999).
5. Turek F. W., Van Reeth O., *Trends Neurosci.* 11, 535-541 (1988).
6. Wagner S., Castel M., Gainer H., Yarom Y., *Nature* 387, 598-603 (1997).
7. Cooper S. J., *Human Psychopharmacol.* 4, 81-89 (1989).
8. Berridge K. C., Pecina S., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 121-131 (1995).
9. Dawson G. R., Collinson N., Atack J. R., *CNS Spectr.* 10(1), 21-27 (2005).
10. Graham A. R. J., *Curr. Pharmaceutical Design* 11, 1867-1885 (2005).
11. Nayeem N., Green T. P., Martin I. L., Barnard E. A., *J. Neurochem.* 62, 815-818 (1994).
12. Baumann S. W., Baur R., Sigel E., *J. Biol. Chem.* 277, 46020-46025 (2002).
13. Rupprecht R., *Psychoneuroendocrinology* 28(2), 139-168 (2003).
14. Martin I., Dunn S., *In Tocris Reviews*, 1-7 (2002).
15. Zhang D., Pan Z. H., Awobuluyi M., Lipton S. A., *Tips* 22, 121-132 (2001).
16. Clayton T., Chen J. L., Richter L., Cromer B. A., Morton C. J., Ng H., Kaczorowski C. C., Helmstetter F. J., Furtmuller R., Ecker G., Parker M. W., Sieghart W., Cook J. M., *Curr. Med. Chem.* 14, 2755-2775 (2007).
17. Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T. A., Seeburg P. H., Barbard E. A., *Nature* 328, 221-227 (1987).
18. Mehta A. K., M. K. Ticku, *Brain Research Review* 29, 196-217 (1999).
19. Mohler H., *Journal of Neurochemistry* 102, 1-3 (2007).
20. Sieghart W., Sperk G., *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 795-816 (2002).
21. Trudell J. R., *Biochimica et Biophysica Acta* 1565, 91-96 (2002).
22. Cutting G. R., LU L., O'hara B. F., Kasch L. M., Montrose-Rafidazeh C., Donovan D. M., Shimada S., Antonarakis S. E., Guggino W. B., Uhl G. R., Kazazian H. H., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2673-2677 (1991).
23. Verdoorn T. A., Draghun A., Ymer S., Seeburg P. H., Sakmann B., *Neuron* 4, 919-928 (1990).
24. Sigel E., Baur R., Trube G., Möhler H., Malherbe P., *Neuron* 5, 703-711 (1990).
25. Verdoorn T. A., *Mol. Pharmacol.* 45, 475-480 (1994).
26. Sigel E., Baur., *J. Neurochem.* 74, 2590-2596 (2000).
27. Hansen S. L., Ebert B., Fjalland B., Kristiansen U., *Brit. J. Pharmacol.* 133, 539-549 (2001).
28. Wingrove P. B., Thomson S. A., Wafford K. A., Whiting P. J., *Mol. Pharmacol.* 52, 874-881 (1997).
29. Mihic S. J., Whiting P. J., Klein R. L., Wafford K. A., Harris R. A., *J. Bio. Chem.* 269, 32768-32773 (1994).
30. Wieland H. A., Lüddens H., SEEBURG P. H., *J. Bio. Chem.* 267, 1426-1429 (1992).
31. Amin J., Brooks-Kayal A., Weiss D. S., *Mol. Pharmacol.* 51, 833-841 (1997).
32. Pritchett D.B., Seeburg P.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1421-1425 (1991).
33. McKernan R. M., Rosahl T. W., Reynolds D. S., Sur C., Wafford K. A., Atack J. R., Farrar S., Myers J., Cook G., Ferris P., Garret L., Bristow L., Marshall G., Macaulay A., Brown N., Howell O., Moore K. W., Arling R. W., Street L. J., Castro J. L., Ragan C. I., Dawson G. R., Whiting P. J., *Nat. Neurosci.* 3(6), 587-592 (2000).
34. Rudolph U., Crestani F., Benke D., Brunig I., Benson J. A., Fritschy J. M., Martin J. R., Bluethmann H., Möhler H., *Nature* 401(6755), 796-800 (1999).
35. Burt D. R., *Life Sciences* 73, 1741-1758 (2003).
36. Whiting J. P., *Drug Discovery Today* 8(10), 445-450 (2003).
37. Fradley R. L., Guscott M. R., Bull S., Hallett D. J., Goodacre S. C., Wafford K. A., Garrett E. M.,

- Newman R. J., O'Meara G. F., Whiting P. J., Rosahl T. W., Dawson G. R., Reynolds D. S., Atack J. R., *J. Psychopharmacol.* 21(4), 384-391 (2007).
38. Löw K., Crestani F., Keist R., Benke D., Bruning I., Benson J. A., Fritschy J. M., Rulicke T., Bluethmann H., Möhler H., Rudolph U., *Science* 290, 131-134 (2000).
39. Rudolph U., Möhler H., *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 18-23 (2006).
40. Crestani F., Martin J. R., Möhler H., Rudolph U., *Nat. Neurosci.* 3(11), 1059 (2000).
41. Lippa A. S., Czobor P., Stark J., Beer B., Kostakis E., Gravielle M., Bandyopadhyay S., Russek S. J., Gibbs T. T., Farb D. H., Skolnick P., *Pharmacology* 102, 7380-7385 (2005).
42. Popik P., Kostakis E., Krawczyk M., Nowak G., Szewczys B., Krieter P., Chen Z., Russek S. J., Gibbs T. T., Farb D. H., Skolnick P., Lippa A. S., Basile A. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1244-1252 (2006).
43. Atack J. R., *Expert Opin. Investig. Drug* 14(5), 601-618 (2005).
44. Dias R., Sheppard W. F. A., Fradley R. L., Garret E. M., Stanley J. L., Tye S. J., Goodacre S., Lincoln R. J., Cook S. M., Conley R., Hallett D., Humpries A. C., Thompson S. A., Wafford K. A., Street L. J., Castro J. L., Whiting P. J., Rosahl T. W., Atack J. R., McKernan R. M., Dawson G. R., Reynolds D. S., *J. Neurosci.* 25, 10682-10688 (2005).
45. Griebel G., Perrault G., Letang V., Graner P., Avenet P., Schoemaker H., Sanger D. J., *Psychopharmacol.* 146, 205-213 (1999).
46. Paronis C. A., Cox E. D., Cook J. M., Bergam J., *Psychopharmacology* 156(4), 461-8 (2001).
47. Min S. S., Quan H. Y., Ma J., Han J. S., Jeon B. H., Seol G. H., *Neurosci. Lett.* 456, 20-24 (2009).
48. McKay P. F., Foster K. L., Mason D., Cummings R., Garcia M., Williams L. S., Grey C., McCane S., He X., Cook J. M., June H. L., *Psychopharmacology* 172(4), 455-462 (2004).
49. Cook J. B., Foster K. L., Eiler W. J. A., McKay P. F., Peter F., Woods J., Harvey S. C., Garcia M., Grey C., McCane S., Mason D., Cummings R., Li X., Cook J. M., June H. L., *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29(8), 1391-1401 (2005).
50. Ruscito J. B., Harrison N. L., *Blood* 102, 1525-1528 (2003).
51. Auta J., Costa E., Davis J. M., Guidotti A., *Neuropharmacol.* 49, 425-429 (2005).
52. Rowlett J. K., Cook J. M., Duke A. N., Platt D. M., *CNS Spectr.* 10, 40-48 (2005).
53. Salmi E., Aalto S., Hirvonen J., Längsjö J. W., Maksimow A. T., Oikonen V., Metsähonkala L., Virkkala J., Nägren K., Scheinin H., *Neuroimage* 41(2), 260-269 (2008).
54. Ito H., Goto R., Koyama R., Kawashima R., Ono S., Sato K., Fukuda H., *Eur. J. Nucl. Med.* 23(7), 782-791 (1996).
55. Wafford K. A., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 47-52 (2005).
56. Sieghart W., *Pharmacol. Rev.* 47, 181-234 (1995).
57. Sieghart W., *Drugs of the Future* 31(8), 685-694 (2006).
58. McKernan R. M., Rosahl T. W., Reynolds D. S., *Nature Neurosci.* 3, 587-592 (2000).
59. Williams M., *J. Med. Chem.* 26, 619 (1983).
60. Im W. B., Blakeman D. P., *Mol. Pharmacol.* 30, 419-426 (1991).
61. Schwartz R. D., Sudak P. D., Paul S. M., *Mol. Pharmacol.* 30, 419-426 (1986).
62. Im H. K., Im W. B., Hamilton B. J., Carter D. B., Von Voigtlander P. F., *Mol. Pharmacol.* 44, 866-870 (1993).
63. Benavides J., Peny B., Durand A., Arbilla S., Scatton B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 884-896 (1992).
64. Belzung C., Le Guisquet A. M., Griebel G., *Behav. Pharmacol.* 11, 125-131 (2000).
65. Lippa A. S., Coupet J., Greenblatt E. N., Klenper C. A., Beer B., *Pharmacol Biochem. Behav.* 11(1), 99-106 (1979).
66. Mirza N. R., Rodgers R. J., Mathiansen L. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1291-1299 (2006).
67. Anzini M., Cappelli A., Vomero S., Giorgi G., Langer T., Bruni G., Romeo M. R., Basile A. S., *J. Med. Chem.* 39, 4275-4284 (1996).
68. Langer S. Z., Faure-Halley C., Seeburg P., Graham D., Arbilla S., *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2, 232-234 (1992).
69. Möhler H., Fritschy J., Rudolph U., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(1), 2-8 (2002).
70. Meadows H. J., Kumar C. S., Pritchett D. B., Blackburn T. P., Benham C. D., *Br. J. Pharmacol.* 123, 1253-1259 (1998).

71. McKernan R. K., Reynolds D. S., Sur C., Wafford K. A., Atack J. R., Farrar S., Myers J., Cook G., Garrett L., Bristow L., Marshall G., Macaulay A., Brown N., Howell O., Moore K. W., Carling R. W., Street L. J., Castro L., Ragan C. I., Dawson G. R., Whiting P. J., *Nat. Neurosci.*, vol3, n.6, (june 2000).
72. Chilman-Blair K., Castaner J., Silvestre J. S., *Drugs of the future* 28, 115-120 (2003).
73. Hood S. D., Argyropoulos S. V., Nutt D. J., *CNS Drugs* 13, 421-431 (2000).
74. Berezhnoy D., Gravielle M. C., Downing S., Kostakis E., Basile A. S., Skolnick P., Gibbs T. T., Farb D. H., *BMC Pharmacology* 8(11), (2008).
75. Casula M. A., Bromidge A., Pillai G. V., Wingrove P. B., Martin K., Maubach K., Seabrook R., Whiting P. J., Hadingham L., *J. Neurochem.* 77, 445-451 (2001).
76. Chambers M. S., Atack J. R., Broughton H. B., Collison N., Cook S., Dawson G. R., Hobbs S. C., Marshall G., Maubach K. A., Pillai G. V., Reeve A. J., MacLoad A. M., *J. Med. Chem.* 46, 2227-2240 (2003).
77. Sullivan S. K., Petroski R. E., Verge G., Gross R. S., Foster A. C., Grigoriadis D. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 537-546 (2004).
78. Foster A. C., Pellemounter M. A., Cullen M. J., Lewis D., Joppa M., Chen T. K., Bozigian H. P., Gross R. S., Gogas K. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 547-559 (2004).
79. Savić M. M., Huang S., Furtmüller R., Clayton T., Huck S., Obradović, D. I., Ugresić N. D., Sieghart W., Bokonjić D. R., Cook J. M., *Neuropsychopharmacology* 33, 332-339 (2008).
80. Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Bruni F., Costagli C., Selleri S., Besnard F., Costa B., Martini C., Malberg-Aiello P., *J. Med. Chem.* 45, 5710-5720 (2002).
81. Guerrini G., Ciciani G., Cambi G., Bruni F., Selleri S., Guarino C., Melani F., Montali M., Martini C., Ghelardini C., Norcini M., Costanzo A., *J. Med. Chem.* 52(15), 4668-4682 (2009).
82. Zhang W., Koheler K. F., Zhang P., Cook J. M., *Drug Des. Discovery* 12, 193-248 (1995).
83. Selleri S., Bruni F., Costanzo A., Guerrini G., Casilli M. L., Costagli C., Giusti L., Lucacchini A., Martini C., Malberg-Aiello P., Lambertini C., *Eur. J. Med. Chem.* 32(12), 941-953 (1997).
84. Yu S., He X., Ma C., McKernan R., Cook J. M., *Med. Chem. Res.* 9(2), 20271-20288 (1999).
85. Huang Q., Xiaohui H., Chunrog M., Ruiyan L., Shu Y., Dayer A. C., Wenger R. G., McKernan R., Cook M. J., *J. Med. Chem.* 43, 71-95 (2000).
86. Filizola M., Harris D. L., *International Journal of Quantum Chemistry* 88, 56-64 (2002).
87. Kahnberg P., Lager E., Rosenberg C., Schougaard J., Camet L., Sternere O., Østergaard Nielsen E., Nielsen M., Lijiefors T., *J. Med. Chem.* 45(19), 4188-4201 (2002).
88. Kahnberg P., Howard M. H., Liliefors T., Nielsen M., Nielsen E., Sterner O., Petterson I., *J. Mol. Graph. Model.* 23, 253-261 (2004).
89. Chou Kuo-Chen, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 316, 634-642 (2004).
90. Selleri S., Bruni F., Costagli C., Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Malbmerg P., Lambertini C., Costa B., Martini C., *Med. Chem. Res.* 10(2), 92-113 (2000).
91. Selleri S., Bruni F., Costagli C., Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Costa B., Martini C., *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2705-2711 (1999).
92. Selleri S., Bruni F., Costagli C., Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Costa B., Martini C., *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2661-2671 (2001).
93. Selleri S., Bruni F., Costagli C., Guerrini G., Ciciani G., Costanzo A., Malberg-Aiello P., Fohlin J., Besnard F., Costa B., Martini C., XVI Convegno Nazionale alla Divisione di Chimica Farmaceutica, Sorrento 18-22 Settembre (2002).
94. Selleri S., Bruni F., Costagli C., Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Gratteri P., Bonaccioni C., Malberg-Aiello P., Besnard F., Renard S., Costa B., Martini C., *J. Med. Chem.* 46, 310-313 (2003).
95. Costanzo A., Guerrini G., Ciciani G., Bruni F., Selleri S., Martini C., Lucacchini A., Malberg-Aiello P., Ipponi A., *Med. Chem. Res.* 9(5), 322-339 (1999).
96. Costanzo A., Guerrini G., Bruni F., Ciciani G., Selleri S., Cappelletti S., Costa B., Martini C., Lucacchini A., *Eur. J. Med. Chem.* 33, 237-244 (1998).
97. Justoni R., Terruzzi M., *Gazz. Chim. Ital.* 78, 166 (1948).
98. Kroker E. H., McElvain S. M., *J. Am. Chem. Soc.* 56, 1172, (1934).
99. Bredereck H., Sell R., Effenberg F., *Chem. Ber.* 97, 3407 (1964).

100. "Organic Syntheses" vol.II (curato da Jeremiah P. Freeman, Editor in Chief) pagg. 34-40 e riferimenti ivi inclusi. Edito da John Wiley e sons, New York.
101. Bruni F., Costanzo A., Selleri S., Guerrini G., Giusti L., Martini C., Lucacchini A., *Farmaco* 48, 309-319 (1993).
102. Chimichi S., Bruni F., Cosimelli B., Costanzo A., Selleri S., Valle G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1147-1152 (1996).
103. Selleri S., Bruni F., Costanzo A., Guerrini G., Casilli M. L., Giusti L., Lucacchini A., Martini C., *Farmaco* 50(10), 679-687 (1995).
104. Carling R. W., Russell M. G. N., Moore K. W., Mitchinson A., Guiblin A., Smith A., Wafford K. A., Marshall G., Atack J. R., Street L. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3550-3554 (2006).
105. Chilman-Blair K., Castanör J., Silvestre J. S., *Drugs of the Future* 28(2), 115-120 (2003).
106. Russell P. B., Hitchings G. H., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3763-3770 (1951).
107. Gronowitz S., Lijefors S., *Chemica Scripta* 13(1), 39-45 (1979).
108. Lang S. A. Jr., Cohen E., *J. Med. Chem.* 18(6), 623-625 (1975).
109. Koyama T., Hirota T., Matsumura T., Yamato M., *Chem. Abstr.* 78, 4210 (1973).
110. Hess X., Weltzien W., Messmer E., *Justus Liebig's Ann. Chem.* 436, 1-144 (1924).
111. Benson D. A., Karsch-Mirzachi I., Lipman D. J., Rapp B. A., Wheeler D. L., *Genbank. Nucl. Acids Res.* 28(1), 15-18 (2000), [PATENT].
112. Anderson E. L., Casey J. E. Jr., Greene L. C., Lafferty J. J., Reiff H. E., *J. Med. Chem.* 7, 259-268 (1964).
113. Bruni F., Selleri S., Costanzo C., Guerrini G., Casilli M. L., *J. Het. Chem.* 32, 291-298 (1995).
114. Howe R., Bolluyt S. C., *J. Org. Chem.* 34(6), 1713-1716 (1969).
115. Dobson A. J., Gerkin R. E., *Acta Crystallographica* 54(2), 253-256 (1998).
116. Cecchi S., Papini P., Ridi M., *Gazzetta Chimica Italiana* 85, 1160-1170 (1955).
117. Sprinter R. H., Scholten M. B., O'Brien D. E., Novinson T., Miller J. P., Robins R. K., *J. Med. Chem.* 25(3), 235-242 (1982).
118. Squires R. F., Bastrup C., *Nature* 266, 732-734 (1997).
119. Cheng Y. C., Prusoff W. H., *Biochemistry* 21(14), 2612-2619 (1973).
120. Bastrup C., Squires R. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3805-3809 (1977).
121. Verma A., Snyder S. H., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 307-322 (1989).
122. Gavish M., Kats Y., Bar-Ami S., Weizman R., *J. Neurochem.* 58, 1589-1601 (1992).
123. Antkiewicz-Michaluk L., Guidotti A., Krueger K. E., *Mol. Pharmacol.* 34, 272-278 (1988a).
124. Anholt R. R. H., Pedersen P. L., De Souza E.B., Snyder S.H., *J. Biol. Chem.* 261, 576-583 (1986b).
125. Mukherjee S., Das S. K., *J. Biol. Chem.* 264, 16713-16718 (1989).
126. O'Beirne G. B., Woods M. J., Williams D. C., *Eur. J. Biochem.* 188, 131-138 (1990).
127. Gavish M., Bachman I., Sshoukrun R., Katz Y., Veenman L., Weisinger G., Weizman A., *Pharmacol. Rev.* 51, 629-650 (1999).
128. Marangos P. J., Patel J., Boulanger J. P., Clark-Rosenberg R., *Mol. Pharmacol.* 22, 26-32 (1982).
129. Carayon P., Bouaboula M., Cahard D., Shire D., Rouque C., Le Fur G., Casellas P., *Life Sci.* 52, 104-118 (1992).
130. Romeo E., Auta J., Kozikowski A. P., Ma D., Papadopoulos V., Puia G., Costa E., Guidotti A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 971-978 (1992).
131. Langer S. Z., Arbila S., *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2, 159-170 (1988).
132. Taupin V., Toulmond S., Serrano A., Benavides J., Zavala F., *J. Neuroimmunol.* 42, 177-186 (1993).
133. Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T. R., Knudsen T. B., Lacapere J. J., Lindemann P., Norenberg M. D., Nutt D., Weizman A., Zhang M. R., Gavish M., *Trends pharmacol. Sci.* 27(8), 402-409 (2006).
134. Chang Y. J., McCabe R. T., ennert H., Budarf M. L., Sayegh R., Emanuel B. S., Skolnick P., Srauss J. F., *DNA Cell. Biol.* 11, 471-480 (1992).
135. Sprengel R., Werner P., Seeburg P. H., Mukhin A. G., Santi M. R., Grayson D. R., Guidotti A., Krueger K. E., *J. Biol. Chem.* 264, 20415-20421 (1989).
136. Krueger K. E., Mukhin A. G., Antkiewicz-Michaluk L., Santi M. R., Grayson D. R., Guidotti A., "GABA and Benzodiazepine Receptor Subtypes", Ed. Biggio G. and Costa E., 1-13, Raven Press,

- New York (1990).
137. Parola A. L., Stump D. G., Pepperl D. J., Krueger K. E., Regan J. W., Laird H. E., *J. Biol. Chem.* 266, 14082-14087 (1991).
138. Riond J., Mattei M. G., Kaghad M., Dumont X., Guillemot J. C., Le Fur G., Caput D., Ferrara A. P., *Eur. J. Biochem.* 195, 305-311 (1991).
139. Taketani S., Kohno H., Okuda M., Furukawa T., Tokunaga R., *J. Biol. Chem.* 269, 7527-7531 (1994).
140. Bernassau J. M., Teversat J. L., Ferrara P., Caput D., Le Fe G., *J. Mol. Graph.* 11, 236-245 (1993).
141. Aurora R., *Science* 264, 1126-1130 (1994).
142. Joseph-Liazun E., Delmas P., Shire D., Ferrara P., *J. Biol. Chem.* 273, 2146-2152 (1998).
143. Murail S., Robert J. C., Coïc Y. M., Neumann J. M., Ostuni M. A., Yao Z. X., Papadopoulos V., Jaminj N., Lacapere J. J., *Biochem. Biophys. Acta* 1778, 6, 1375-1381 (2008).
144. McEenery M. W., Snowman A. M., Trifletti R. R., Snyder S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3170-3174 (1992).
145. Tanimoto Y., Onishi Y., Sato Y., Kizaki H., *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 177-183 (1999).
146. Salvetti F., Chelli B., Gesi M., Pellegrini A., Giannaccini G., Lucacchini A., Martini C., *Life Sci.* 66, 1165-1175 (2000).
147. Ujwal R., Cascio D., Collettier J. P., Faham S., Zhang J., Toro L., Ping P., Abramson J., *Biochem.* 105(46), 17742-17747 (2008).
148. De Pinto V., Tomasello F., Messina A., Guarino F., Benz R., La Mendola D., Magri A., Pappalardo G., *Chembiochem* 8(7), 744-756 (2007).
149. Weiss J. N., Korge P., Honda H. M., Ping P., *Circ Res* 93, 292-301 (2003).
150. Galluzzi L., Keep O., Tajeddine N., Kromer G., *Oncogene* 27, 4633-4635 (2008).
151. Yeliseev A. A., Kaplan S., *J. Biol. Chem.* 274, 21234-21243 (1999).
152. Yeliseev A. A., Kaplan S., *J. Biol. Chem.* 270, 21167-21175 (1995).
153. Yeliseev A. A., Krueger K. E., Kaplan S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5101-5106 (1997).
154. Garnier M., Dimchev A. B., Boujrad N., Price J. M., Musto N. A., Papadopoulos V., *Mol. Pharmacol.* 45, 201-211 (1994).
155. Joseph-Liazun E., Farges R., Delmas P., Ferrara P., Loison G., *J. Biol. Chem.* 272, 28102-28106 (1997).
156. Farges R., Joseph-Liazun E., Shire D., Caput D., Le Fur G., Ferrara P., *Mol. Pharmacol.*, 46, 1160-1167 (1994).
157. Li H., Papadopoulos V., *Endocrinology* 139, 4991-4997 (1998).
158. Nadège J., Neumann J. M., Ostuni M. A., Thi Kim Ngoc Vu, Yao Z. X., Murail S., Robert J. C., Giatzakis C., Papadopoulos V., Lacapère J. J., *Molecular Endocrinology* 19 (3), 588-594 (2005).
159. Yeliseev, A. A.; Kaplan S., *J. Biol. Chem.* 275, 5657-5667 (2000).
160. Papadopoulos V., Brown A., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 53, 103-110 (1995).
161. Wendler G., Lindemann P., Lacapere J. J., Papadopoulos V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 847-852 (2003).
162. Scarf A. M., Ittner L. M., Kassiou M., *J. Med. Chem.* 52(3), 581-592 (2009).
163. Papadopoulos V., Berkovich A., Krueger K. E., *Neuropharmacology* 30, 1417-1423 (1991a).
164. Brown A. S., Hall P. F., Shoyab M., Papadopoulos V., *Mol. Cell. Endocrinol.* 83, 1-9 (1992).
165. Casellas P., Galiegue S., Basile A., *Neurochem. Inter.* 40,475-486 (2002).
166. Raghavendra Rao V. L., Dogan A., Bowen K. K., Dempsey R. J., *Exp. Neurol.* 61, 102-114 (2000).
167. Bonuccelli U., Nuti A., Del Dotto P., Piccini P., Martini C., Giannaccini G., Lucacchini A., Muratorio A., *Life Sci.* 48, 1185-1190 (1991).
168. Owen F., Poulter M., Waddington J. L., Mashal R. D., Crow T. J., *Brain Res.* 278, 373-375 (1983).
169. Diorio D., Welner S. A., Butterworth R. F., Meaney M. J., Suranyi-Cadotte B. E., *Neurobiol. Aging* 12, 255-258 (1991).
170. Torres S. R., Fröde T. S., Nardi G. M., Vita N., Reeb R., Ferrara P., Ribeiro-Do-Valle R. M., Farges R. C., *Eur. J. Pharmacol.* 408, 199-211 (2000).
171. Curran T., Morgan J. I., *Science* 229, 1265-1268 (1985).
172. Ferrarese C., Apollonio I., Frigo M., Gaini S. M., Piolti R., Frattola L., *Ann. Neurol.* 26, 564-568

- (1989).
173. Pawlikowski M., Kurent-Radek J., Radek A., Stepien H., *Acta Neurol. Scand.* 77, 231-233 (1988).
174. Miccoli L., Porison-Bichat F., Sureau F., Bras Gonçalves R., Burgeois Y., Dutrillaux B., Poupon M. F., Oudard S., *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1400-1406 (1998).
175. Torres S. R. R., Nardi G. M., Ferrara P., Ribeiro-Do-Valle R. M., Farges R. C., *Eur. J. Pharmacol.* 385, R1-R2 (1999).
176. Zorov D. B., Krasnicov B.F., Kuzminova A. E., Vysokikh M. Y., Zorova L. D., *Biosci. Rep.* 17, 507-520 (1997).
177. Kruger K. E., Papadopoulos V., *J. Biol. Chem.* 265, 15015-15022 (1990).
178. Culty M., Li H., Boujrad N., Amri H., Vidic B., Bernassau J. M., Reversat J. L., Papadopoulos V., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 123-130 (1999).
179. Marino F., Cattaneo S., Cosentino M., Rasini E., Di Grazia L., Fietta A. M., Lecchini S., Frigo G., *Pharmacology* 63, 42-49 (2001).
180. Lazzarini R., Malucelli B. E., Palermo Neto J., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23, 253-265 (2001).
181. Mestre M., Carriot T., Belin C., Uzan A., Renault C., Dubroicq M. C., Guerey C., Le Fur G., *Life Sci.* 35, 953-962 (1984).
182. Hirsch J. D., Beyer C. F., Malkwitz, Beer B., Blume A. J., *Mol. Pharmacol.* 35, 157-163 (1989).
183. Moreno-Sanchez R, Hogue B. A., Bravo C., Newman A. H., Basile A. S., Chang P. K., *Biochem. Pharmacol.* 41, 1479-1484 (1991).
184. Taketani S., Kohno H., Furukawa T., Tukunaga R., *J. Biochem* 117, 875-80 (1995).
185. Hall P. F., *Vitam. Horm* 42, 315-368 (1985).
186. Jefcoate C., *J. Clin Invest* 110, 881-890 (2002).
187. Lacapere J. J., Papadopoulos V., *Steroids* 68, 569-585 (2003).
188. Mukmin A. G., Papadopoulos V., Costa E., Krueger K. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9813-9816 (1989).
189. Majwska M. D., Harrison N. L., Schwartz R. D., Barker J. L., Paul S. M., *Science* 232, 1004-1007 (1986).
190. Marx C. E., *Psychiatric Times* 18(10), (2001).
191. Lambert J. J., Peters J. A., Cottrell G. A., *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 224-227 (1987).
192. Mienville J. M., Vicini S., *Brain Res.* 489, 190-194 (1989).
193. Puia G., Santi M. R., Vicini S., *Neuron* 4, 759-765 (1990).
194. Davies P. A., Kirkness E. F., Hales T. G., *Br. J. Pharmacol.* 120(5), 899-909 (1997).
195. Wu F., Gibbs T. T., Farb D. H., *Mol. Pharmacol.* 40, 333-336 (1991).
196. Maurice T., Urani A., Phan V. L., Romieu P., *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37(1-3), 116-132 (2001).
197. Curt P. Richter, *Psychoneuroendocrinology* 28, 139-168 (2003).
198. Darnaudery M., Pallas M., Bouyer J. J., Le Moan M., Mayo W., *Neuroscience* 92, 583-588 (1999).
199. Maurice T., Phan V. L., Urani A., Kamei H., Noda Y., Nabeshima T., *Jpn. J. Pharmacol.* 81, 125-155 (1999).
200. Campiani G., Nacci V., Fiorini I., De Filippis M. P., Garofalo A., Ciani S. M., Greco G., Novellino E., Williams D. C., Zisterer D. M., Woods M. J., Mihai C., Manzoni C., Mennini T., *J. Med. Chem.* 39, 3435-3450 (1996).
201. Everitt B. J., Robbinsins T. W., *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649-684 (1997).
202. Rodhes M. E., Li P. K., Flood J. F., Johnson D.A., *Brain Research* 733, 284-286 (1996).
203. Veiga S., Azcoitia I., Garcia-Segura L. M., *J. Neurosci. Res.* 1, 129-137 (2005).
204. Papadopoulos V., Lecanu L., Brown R. C., Han Z., Yao Z. X., *Neurosciencie* 138(3), 749-756 (2006).
205. Alho H., Varga V., Kruger K. E., *Cell. Growth Differ* 5, 1005-1014 (1994).
206. Corsi L., Avallone R., Geminiani E., Cosenza F., Venturini I., Baraldi F., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 313, 62-66 (2004).
207. Katz Y., Ben-Baruch G., Kloog Y., Menczer J., Gavish M., *Clin. Sci.* 78, 155-158 (1990b).
208. Katz Y., Eitan A., Gavish M., *Oncology* 47, 139-142 (1990c).
209. Black K. L., Ikezaki K., Artur W. T., *J. Neurosurg.* 71, 113-118 (1989).
210. Ikezaki K., Black K. L., *Cancer Lett.* 49, 115-120 (1990).
211. Maaser K., Grabowski P., Sutter A., Sten H., Berger G., Cavish M., Zeitz M., Scherubl H., *Clin.*

- Cancer Res.* 8, 3205 (2002).
212. Starosta-Rubinstein S., Ciliax B. J., Penney J. B., McKeever P., Young A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (3), 891 (1987).
213. Pawlikowski M., Stepien H., Mroz-Wasilewska Z., Pawlikowska A., *Life Sci.* 40, 1131-1135 (1987).
214. Maaser K., Hopfner M., Jansen A., Weisinger G., Gavish M., Kozikowski P., Weizman A. Carayon P., Riecken E. O., Zeitz M., Scherubl H., *Br. J. Cancer* 85 (11), 1771 (2001).
215. Sutter A. P., Maaser K., Hopfner M., Barthel B., Grabowski P., Faiss S., Carayon P., Zeitz M., Scherubl H., *Int. J. Cancer* 102 (4), 318 (2002).
216. Maaser K., Sutter A. P., Scherubl H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (3), 646-652 (2005).
217. Halestrap A. P., Doran E., Gillespie J., O'Toole A., *Biochem. Soc. Trans.* 28(2), 170-177 (2000).
218. Li W., Hardwick M. J., Rosenthal D., Culty M., Papadopoulos V., *Biochem. Pharmacol.* 73, 491-503 (2007).
219. Bono F., Lamarche L., Prabbonaud L., Herbert J., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 265(2), 457-461 (1999).
220. Guo P., Ma J., Li S., Guo Z., Adams A. L., Gallo J. M., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 48, 169, (2001).
221. Kessel D., Horwitz J. P., *Canc. Lett.* 168, 141-144 (2001).
222. Zavala F., Taupin V., Descamps-Latscha B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 442-450 (1990).
223. Vownickel E., Reutens D., Becher B., Verge G., Evens A., Owens T., Antel J. P., *J. Neurosci. Res.* 50, 345 (1997).
224. Lococ P., Gandolfo P., Tonon M. L., Brault E., Dalibert I., Schumacher M., Benavides J., Ferzas B., *Brain Res.* 815, 70 (1999).
225. Scatton B., Benavides J., Dubois A., Bourdiol F., *Int. J. Tiss. Res.* 12, 15 (1990).
226. Waterfield J. D., Mc Geer E. G., Mc. Geer P. L., *Rheumatology* 38, 1068 (1999).
227. Bribes E., Bourie B., Esclagon M., Galiegos S., Vidal H., Casellas P., *Eur. J. Pharmacol.* 452, 111 (2002).
228. Bribes E., Caliegos S., Bourrie B., Casellas P., *Immunol. Lett.* 85, 13 (2003).
229. Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J., *Annu. Rev. Immunol.* 15, 351-369 (1997).
230. Moreno-Sanchez R., Hogue B. A., Bravo C., Newman A. H., Basile A. S., *Biochem. Pharmacol.* 41(10), 821-827 (1991).
231. Carayon P., Portier M., Dussosoy D., BordA., Petiprêtre G., Canat X., Casellas P., *Blood* 87(8), 3170-3178 (1996).
232. Halestrap A. P., *Biochem. Soc. Sympos.* 66, 181-203 (1999).
233. Krower G., Reed C., *Natural Med.* 6, 513-519 (2000).
234. Tanver A., Virji S., Andreewa, Totty N. F., Hsuan J. J., Ward J. M., Crompton M., *Eur J. Biochem.* 15, 166-172 (1996).
235. Gottlieb R., *Febs Lett.* 482, 6-12 (2000).
236. Marzo L., Brenner C., Zanzani N., Susin S. A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z. H., Reed J. C., Kroemer G., *J. Exp. Med.* 187(8), 1261-1271 (1998).
237. Brokkes P. S., Ysang Y., Robotham J. L., Anders M. W., Shey-Shing S., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 287, 817-833 (2004).
238. Marzo I., Brenner C., Zamzani M., Susin S. A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z. M., Reed J. C., Kroemer G., *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271 (1998).
239. Fennel D. A., Corbo M., Pallaska A., Cotter F. E., *British J. Cancer* 84, 1397-1404 (2001).
240. Petronilli V., Penzo D., Scorrano L., Bernardi P., Di Lisa F., *J. Biol. Chem.* 276, 12030-12034 (2001).
241. Benavides J., Cornu P., Dennis T., DuboisA., Hauw J. J., Mackenzie E. T., Sadzovitch V., Scatton B., *Ann. Neurol.* 24, 708-712 (1988).
242. Park C.H., Carboni E., Wood P. L., Gee K. W., *Glia* 16, 65-70 (1996).
243. Gulyàs B., Makkai B., Cásà P., Gulya K., Bakota L., Vársgezi S., Beliczai Z., Aanderson J., Csiba L., Thiele A., Dyrks T., Suhara T., Suzuki K., Higuchi M., Halldin C., *Neurochem. Int.* 54(1), 28-36 (2009).
244. Vownickel E., Reutens D., Becker B., Verge G., Evens A., Antel J. P., *J. Neurosci. Res.* 50, 345-353 (1997).
245. Hauet T., Yao Z., Bose S., Wall C. T., Han Z., Hales B. D., Miller W. L., Culty M., Papadopoulos

- V., *Mol. Endocrinol.* 19, 540-554 (2005).
246. Pappata S., Cornu P., Samson Y., Prenant C., Benavides J., Scatton B., Crozuel C., Hauw J. J., Syrota A., *J.Nucl. Med.* 32, 1608-1610 (1991).
247. Maeda J., Suhara T., Zhang M. R., Okauchi T., Yasuno F., Ikoma Y., Inaji M., Nagai Y., Takano A., Obayashi S., Suzuki K., *Synapse* 52, 283-291 (2004).
248. Weissmann B. A., Brandeis R., Gilat E., Cohen G., Alkala Y. D., Rabinovitz I., Sonogo H., Raveh L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025, 584-589 (2004).
249. Goodman Gilman A., Hardman G., Limbird L. E., *Le basi farmacologiche della Terapia – vol. 1, X edizione*, 555 (2003).
250. Lacor P., Benavides J., Ferzaz B., *Neurosci. Lett.* 220, 61-65 (1996).
251. Lacor P., Gandolfo P., Tonon M. C., Brault E., Dalibert I., Schumacher M., Benavides J., Ferzaz B., *Brain Res.* 815, 70-80 (1999).
252. Koenig H., Schiumacher M., Ferzaz B., Thi A., Ressouches A., Guennouon R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E., *Obstet. Gynecol. Surv.* 50, 792-793 (1995).
253. Leonelli E., Yague J. G., Ballabio M., Azcoitia I., Magnaghi V., Schumacher M., Garcia-Segura M. L., Melacangi R. G., *Mech. Ageing Dev.* 126, 1159-1163, (2005).
254. Veenman L., Gavish M., *Drug Dev. Res.* 50, 355-370 (2000).
255. Marazziti D., Dell'Osso B., Baroni S., Masala I., Di Nasso E., Giannaccini G., Conti L., *Life Sci.* 77, 3268-3275 (2005).
256. Nakamura K., Yamada K., Swayama Y., Toyota T., Furukawa A., Takimoto T., Teramaya H., Swahashi K., Takei N., Minnabe Y., Semine Y., Ikeda K., Yoshi M., Mori N., *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 141, 222-226 (2006).
257. Weizman A., Burgin R., Harley, Gavish M., *J. Affect. Disorder* 33, 257-261 (1996).
258. Marx C.E., Vandoren M., Duncan C.E., *Schizophr. Res.* 49, 94 (2001).
259. Eser D., Romeo E., Baghai T. C., Di Michele F., Schule C., Pasini A., Zwanger P., Padberg F., Rupprecht R., *Neuroscience* 138, 1041-1048 (2006).
260. Damianisch K., Rupprecht R., Lancel M., *Neuropsychopharmacology* 25, 576-584 (2001).
261. Faegws R., Joseph-Liazun E., Shire D., Caput D., Le Fur G., Ferrara P., *Mol. Pharmacol.* 46, 1160-1167 (1994).
262. Le Fur G., Perrier M. L., Vaucher N., Imbault F., Flamier A., Benavides J., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M. C., Gueremy C., *Life Sci.* 32, 1839-1847 (1983).
263. Cagnin A., Brooks D., Kennedy A., Gunn R., Myers R., Turkheimer F., Jones T., Banati R. B., *Lancet* 358, 461-467 (2001).
264. Belloli S., Moresco R., Matarrese M., Biella G., Sanvito F., Simonelli P., Turolla E., Olivieri S., Cappelli A., Vomero S., Galli-Kienle M., Fazio F., *Neurochem. Int.* 44, 433-440 (2004).
265. Fiorini I., Nacci V., Ciani S. M., Garofalo A., Campiani G., Savini L., Novellino E., Greco G., Bernasconi P., Mennini T., *J. Med. Chem.* 37, 1427-1438 (1994).
266. Campiani G., Nacci V., Fiorini I., De Filippis M. P., Garofalo A., Ciani S. M., Greco G., Novellino G., Manzon C., Pennini T., *J. Med. Chem.* 39, 3435-3450 (1996).
267. Zister D. M., Hance N., Campiani G., Garofalo A., Nacci V., Williams D. C., *Biochem. Pharmacol.* 65, 397-403 (1998).
268. Romeo E., Cavallaro S., Korneyev A., Kozikovski A. P., Ma D., Polo A., Costa E., Guidotti A., *J.Pharmacol. Exp. Therm.* 262, 971-978 (1992).
269. Primofiore G., Da Settimo F., Taliani S., Simorini F., Patrizi M. P., Novellino E., Greco G., Abignente E., Costa B., Chelli B., Martini C., *J. Med. Chem.* 47, 1852-1855 (2004).
270. Ferzas B., Brault E., Bourliaud G., Robert J. P., Poughon G., Clausure Y., Marquet F., Liere P., Schumacher M., Nowicki J. P., Fournier J., Soubrier P., Benavides J., Scatton B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 1067-1078 (2002).
271. Okuyama S., Chakil S., Yoshikawa R., Ogawa S., Suzuki J., Okubo T., Nakazato A., Nagamine M., Tomisawa K., *Life Sci.* 64, 1455-1464 (1999).
272. Culty M., Silver P., Nakazato O A., Gazouli M., Li H., Muramatsu M., Okuyama S., Papadopoulos V., *Drug. Dev. Res.* 52, 475-484 (2001).
273. Trapani G., Franco M., Ricciardi L., Latrofa A., Genchi G., Sanna E., Tuveri F., Cagetti E., Bigio G.,

- Liso G., *J. Med. Chem.* 40, 3109-3118 (1997).
274. Serra M., Madau P., Chessa M. F., Caddeo M., Sanna E., Trapani G., Franco M., Liso G., Purdy R. H., Barbaccia M. L., Biggio G., *Br. J. Pharmacol.* 127, 177-187 (1989).
275. Da Settimo F., Simorini F., Taliani S., La Motta C., Marini A., *et al.*, *J. Med. Chem.* 51, 5789-5797 (2008).
276. Selleri S., Gratteri P., Costagli C., Bonaccioni C., Costanzo A., Mealni F., Guerrini G., Ciciani G., Costa B., Spinetti F., Martini C., Bruni F., *Biorg. & Med. Chem.* 13, 4821-4834 (2005).
277. Gulayas B., Halladin C., Vas A., Banati R. B., Shkuchin E., Finnema S., Tarkainen J., Tihanyi K., Szilagyi G., Farde L., *J. Neurol. Sci.* 229-230 (2005).
278. Bourguignon J. J., "Peripheral Benzodiazepine Receptors", Ed. Giessen-Crouse E., 59-85, Academic Press, New York, (1993).
279. Greco G., Novellino E., Fiorini., Cacci V., Campiani G., Ciani S. M., Garofalo A., Bernasconi P., Mennini T., *J. Med. Chem.* 37, 4100-4108 (1994).
280. Dal Piaz A., Bertolasi V., Borea P. A., Nacci V., Fiorini I., Campiani G., Mennini T., Manzoni C., Novellino E., Greco G., *J. Med. Chem.* 38, 4730-4738 (1995).
281. Anzini M., Cappelli A., Vomero S., Giorni G., Langer T., Bruni G., Romeo M. R., *J. Med. Chem.* 39, 4275-4284 (1996).
282. Cappelli A., Anziani M., Vomero S., De Benedetti P. G., Menziani M. C., Giorgi G., Manzoni C., *J. Med. Chem.* 40, 2910-2921 (1997).
283. Cinone N., Holte H. D., Carotti A., *J. Comput. Aided Mol. Des.* 14, 753-768 (2000).
284. Anzini M., Cappelli A., Vomero S., Seeber M., Menziani M. C., Langer T., Hagen B., Manzoni C., Bourguignon J. J., *J. Med. Chem.* 44, 1134-1150 (2001).
285. Rohren E. M., Turkington T. G., Coleman R. E., *Radiology* 231, 305-332 (2004).
286. Ggallagher B. M., Fowler J. S., uttersen N. I., Macgregor R. R., Wan C. N., Wolf A. P., *J. Nucl. Med.* 19, 1154-1161 (1978).
287. Young H., Baum R., Cremerius U., *European Journal of Cancer* 13, 1773-1782 (1999).
288. Saleem A., Charnley N., Price P., *European Journal of Cancer* 42, 1720-1727 (2006).
289. Kantarcy K., Jack C. R., *Neuroimaging Clin. N. Am.* 13, 197-209 (2003).
290. Klunk W. E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist T. G., Holt D. P., Bergstrom M., Savitcheva I., Huang G. F., Estrada S., Ausen B., Debnath M. L., Barletta J., Price J. C., Sandell J., Lopresti B. J., Wall A., Koivisto P., Antoni G., Mathis C.A., Langstrom B., *Annals of Neurology* 55, 306-319 (2004).
291. Kumar S., Rajshekher G., Prabhakar S., *Neurol. India* 53, 149-155 (2005).
292. Chaveau F., Van Camp N., Dollè F., Kuhnast B., Hinnen F., Damont A., Boutin H., James M., Kassiou M., Tavitian B., *J Nucl Med.* 50, 468-476 (2009).
293. Schimdt M. E., Wang L., *Idrugs* 8, 497-501 (2005).
294. Lind P., Igerc I., Beyer T., Reinprecht P., Hausegger K., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 31, S125-S134 (2004).
295. Kozikowski A. P., Ma D., Brewer J., Sun S., Costa E., Romeo E., Guidotti A., *J. Med. Chem.* 36, 2908-2920 (1993).
296. Trapani G., Franco M., Latrofa A., Ricciardi L., Carotti A., Serra M., Sanna E., Bigio G., Liso G., *J. Med. Chem.* 42, 3934-3941 (1999).
297. Dollè F., Luus C., Reynolds A., Kassiou M., *Curr. Med. Chem.* 16, 2899-2923 (2009).
298. Doorduyn J., Klein H. C., Dierckx R. A., James M., Kassiou M., de Vries E. F. J., *Mol. Imaging Biol.* 11, 386-398 (2009).
299. Martin A., Boisgard R., Theze B., Van Camp N., Kuhnast B., Damont A., Kassiou M., Dollè F., Tavitian B., *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1-12 (2009).
300. James M., Fulton R. R., Vercoullie J., Henderson D. J., Garreau L., Chalon S., Dollè F., Selleri S., Guilloteau D., Kassiou M., *J. Nucl. Med.* 49(5), 814-822 (2008).
301. Chaveaux F., Boutin H., Van Camp N., Dollè F., Tavitian B., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2304-2319 (2008).
302. Hirvonen J., Roivainen A., Virta J., Helin S., Någren K., Rinne J. O., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, (2009) [in press].

303. Zhang L., ZzhengHeng J., Hu J. *J. Org. Chem.* 71, 9845-9848 (2006).
304. De Bao Su, Jang Xing Duan, Qing Yun Chen, *Tetrahedron Letters* 32, 7689-7690 (1991).
305. Adamo M. F. A., Donati D., Sarti-Fantoni P., Bz A., *Science Direct* 49, 941-944 e riferimenti ivi contenuti (2007).
306. Lal G. S., Pez G. P., Pesaresi R. J., Prozonic F. M., Cheng H., *J. Org. Chem.* 64, 7048-54 (1999).
307. Yin L., Liebscher J., *Synthesis* 14, 2329-2334 (2004).
308. Yin L., Liebscher J., *Synthesis* 1, 131-135 (2005).
309. Liu J., Wong C. H., *Tetrahedron Letters* 43, 4037-4039 (2002).
310. Heravi M. M., Behbahani F. K., Oskooie H. A., Shoar R. H., *Tetrahedron Letters* 46, 2543-2545 (2005).
311. Bongini A., Cardillo G., Orena M., Sandri S., *Synthetic Communications* 32(10), 1549-1555 (2002).
312. Reddy M. A., Reddy L. R., Bhanumathi N., Rama R. K., *New J. Chem.* 25, 359-360 (2005).
313. Papadopoulos V., Guarnirei P., Krueger K. E., Guidotti A., Costa E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5113-5117 (1992).
314. Ridge D. N., Hanifin J. W., Harten L. A. Johnson B. D., Menschik J., Nicolau G., Sloboda A. E., Watts D. E., *J. Med. Chem.* 22(11), 1385-1389 (1979).
315. Longo R. S., *J. Am. Chem. Soc.* 69(5), 990-995 (1947).
316. Meyer E., *J. Prakt. Chem.* 52, 110, (1895).
317. Robinson R., Schwarzenbach G., *J. Chem. Soc.* 822-830 (1930).
318. Meyer E., *J. Prakt. Chem.* 2, 90-99 (1914).
319. Horte P. J., Fenwick A., Savioli L., Molyneux D., *The Lancet* 373, 1570-1575 (2009).
320. Nielsen S. F., Christensen S. B., Criciani G., Kharazmi A., Liljefors, *J. Med. Chem.* 41(24), 4819-4832 (1998).
321. G. B. Gaeta, *Parassitologia* 46(1-2), 225-226 (2004).
322. Capelli G., Montars F., Porcellano E., Maioli G., Furnari C., Rinaldi L., Oliva G., Otranto D., *Parasit. Vectors.* 2 (Suppl 1):S8 (2009).
323. Mancianti F., *Parassitologia* 46(1-2), 203-206 (2004).
324. Kaminsky R., *Curr Opin Investig Drugs.* 3(4), 550-554 (2002).
325. Davidson R. N., den Boer M., Ritmeijer K., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103(7), 653-660 (2009).
326. Santos D. O., Coutinho C. E. R., Madeira M. F., Bottino C. G., Vieira R. T., Nascimento S. B., Bernardino A., Bourguignon S. C., Corte-Real S., Pinho R. T., Rodrigues C. R. and Castro H. C., *Parasitol. Res.* 103(1), 1-10 (2008).
327. Girault S., Davioud-Charvet T. E., Maes L., Dubremetz J. F., Debreu M. A., Landry V., Sergheraert C., *Bioorg Med Chem.* 9(4), 837-846 (2001).
328. Augustyns K., Amssoms K., Yamani A., Rajan P. K., Haemers A., *Curr Pharm Des.* 7(12), 1117-1141 (2001).
329. Bressi J. C., Verlinde C. L., Aronov A. M., Shaw M. L., Shin S. S., Nguyen L. N., Suresh S., Buckner F. S., Van Voorhis W. C., Kuntz I. D., Hol W. G., Gelb M. H., *J Med Chem.* 44(13), 2080-2093 (2001).
330. Suresh S., Bressi J. C., Kennedy K. J., Verlinde C. L., Gelb M. H., Hol W. G., *J Mol Biol.* 309(2), 423-435 (2001).
331. Aronov A. M., Gelb M. H., *Bioorg Med Chem Lett.* 8(24), 3505-3510 (1998).
332. Shi W., Basso L. A., Santos D. S., Tyler P. C., Furneaux R. H., Blanchard J. S., Almo S. C., Schramm V. L., *Biochemistry* 40(28), 8204-8215 (2001).
333. Cui L., Rajasekariah G. R., Martin S. K., *Gene* 280(1-2), 153-162 (2001).
334. Landfear S. M., *Biochem. Pharmacol.* 62(2), 149-155 (2001).
335. Martin M. B., Grimley J. S., Lewis J. C., Heath H. T. 3rd, Bailey B. N., Kendrick H., Yardley V., Caldera A. Lira R., Urbina J.A., Moreno S. N., Docampo R., Croft S. L., Oldfield E., *J. Med. Chem.* 44(6), 909-916 (2001).
336. Zuccotto F., Zvelebil M., Brun R., Chowdhury S. F., Di Lucrezia R., Leal I., Maes L., Ruiz-Perez L. M., Gonzalez Pacanowska D., Gilbert I. H., *Eur. J. Med. Chem.* 36(5), 395-405 (2001).
337. McLuskey K., Gibellini F., Carvalho P., Avery M. A., Hunter W. N., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(10), 1780-1785 (2004).
338. Jung M., Lee K., Kim H., Park M., *Curr. Med. Chem.* 11(10), 1265-1284 (2004).

339. Neves-Pinto C., Malta V. R., Pinto Mdo C., Santos R. H., de Castro S. L., Pinto A.V., *J. Med. Chem.* 45(10), 2112-2115 (2002).
340. Del Olmo E., Armas M. G., López-Pérez J. L., Ruiz G., Vargas F., Giménez A., Deharo E., San Feliciano A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(20), 2755-2757 (2001).
341. Chen M., Christensen S. B., Blom J., Lemmich E., Nadelmann L., Fich K., Theander T. G., Kharazmi A., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(12), 2550-2556 (1993).
342. De Fátima A., Marquissolo C., de Albuquerque S., Carraro-Abrahão A. A., Pilli R. A., *Eur. J. Med. Chem.* 41(10), 1210-1213 (2006).
343. Germonprez N., Maes L., Van Puyvelde L., Van Tri M., Tuan D. A., De Kimpe N., *J. Med. Chem.* 48(1), 32-37 (2005).
344. Looker D. L., Marr J. J., Berens R. L., *J. Biol. Chem.* 261(20), 9412-9415 (1986).
345. Marr J. J., *J. Lab. Clin. Med.* 118(2), 111-119 (1991).
346. Avila J. L., Polegre M. A., Robins R. K., *Comp. Biochem. Physiol.* 83(2), 291-294 (1986).
347. El-Kashef H. S., el-Emary T. I., Gasquet M., Timon-David P., Maldonado J., Vanelle P., *Pharmazie* 55(8), 572-576 (2000).
348. Luque F., Fernández-Ramos C., Entrala E., Rosales M. J., Navarro J. A., Romero M. A., Salas J. M., Sánchez-Moreno M., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 126(1), 39-44 (2000).
349. Magán R., Marín C., Rosales M. J., Barrera M. A., Salas J. M., Sánchez-Moreno M., *Pharmacology* 70(2), 83-90 (2004).
350. Magán R., Marín C., Rosales M. J., Barrera M. A., Salas J. M., Sánchez-Moreno M., *Pharmacology* 73(1), 41-48 (2005).
351. Valderrama J. A., Astudillo C., Tapia R. A., Prina E., Estrabaud E., Mahieux R., Fournet A., *Chem. Pharm. Bull.* 50(9), 1215-1218 (2002).
352. Delmas G., Park S., Chen Z. W., Tan F., Kashiwazaki R., Zarif L., Perlin D. S., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(8), 2704-2707 (2002).
353. Sánchez-Delgado R. A., Anzellotti A., *Mini Rev. Med. Chem.* 4(1), 23-30 (2004).
354. Senga K., Novinson T., Springer R. H., Rao R. P., O'Brien D. E., Robins R. K., Wilson H. R., *J. Med. Chem.* 13(3), 312-314 (1975).
355. Boa A. N., Crane J. D., Kowalkzyk R. M., Sultana N. H., *Eur. J. Inorg. Chem.* 5, 872-878 (2005).
356. Chang-Eun Yeom, Mi Jeon Kim, B. Moon Kim, *Tetrahedron* 63, 904-909 (2007).
357. Moura C., Vitor R. F., Maria Leonor, Paulo A., Santos I. C., Santos I., *Dalton Trans.* 47, 5630-5640 (2006).
358. De Luca L., Giacomelli G., Porcheddu A., *Org. Lett.* 4(4), 553-555 (2001).
359. Khurana J. M., Kukreja G., *Synt. Commun.* 32(8), 1265-1269 (2002).
360. Elslager E. F., Weinstein E. A., Worth D. F., *Aminoalkylhydrazines* 7, 493-500 (1964).
361. Altomare A., Burla M. C., Camalli M., Cascarano G. L., Giacovazzo C., Guagliardi A., Moliterni A. G., Polidori G., Spagna R., *J. Appl. Crystallogr.* 32, 115-119 (1999).
362. Sheldrick G. M., *SHELXL-97*, Göttingen, Germany (1997).
363. Burnett M. N., Johnson C. K., *ORTEP-III*: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustration, Report ORNL-6895, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA (1996).

Allegati

Synthesis, in Vivo Evaluation, and Molecular Modeling Studies of New Pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-Oxide Derivatives. Identification of a Bifunctional Hydrogen Bond Area Related to the Inverse Agonism

Gabriella Guerrini,^{*,†} Giovanna Ciciani,[†] Giovanni Cambi,[†] Fabrizio Bruni,[†] Silvia Selli,[†] Chiara Guarino,[†] Fabrizio Melani,[‡] Marina Montali,[§] Claudia Martini,[§] Carla Ghelardini,^{||} Monica Norcini,^{||} and Annarella Costanzo[†]

[†]Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Laboratorio di Progettazione, Sintesi e Studio di Eterocicli Biologicamente attivi (HeteroBioLab), Università degli Studi di Firenze, Via U. Schiff 6, 50019 Polo Scientifico, Sesto Fiorentino–Firenze, Italy, [‡]Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Laboratorio di Molecular Modeling, Cheminformatics and QSAR, Università degli Studi di Firenze, Via U. Schiff 6, 50019 Polo Scientifico, Sesto Fiorentino–Firenze, Italy, [§]Dipartimento di Psichiatria, Neurobiologia, Farmacologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Pisa, via Bonanno 6, 56126 Pisa, Italy, and ^{||}Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica Aiazzi-Mancini, Università degli Studi di Firenze, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy

Received December 18, 2008

A new series of pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]benzotriazine 5-oxide 8-alkoxy-/aryloxy-/arylalkoxy and 8-aryl-/arylalkylderivatives variously substituted at the 3-position were synthesized and binding studies at the benzodiazepine site on GABA_A receptor were carried out. The pharmacological profile was identified for compounds **10**, **11**, **16**(+), **16**(–), and **17** by considering six potential benzodiazepine actions: motor coordination, anticonvulsant action, spontaneous motility and explorative activity, potential anxiolytic-like effects, mouse learning and memory modulation, and finally, ethanol-potentiating action. Compound **17** stands out as the compound that improves mouse memory processes selectively, safely, and in a statistically significant manner. From a ligand-based pharmacophoric model, we identified a hydrogen bond interaction area HBp-3 near the lipophilic area. This new pharmacophoric model allowed us to identify four structural compound typologies and thus to rationalize the affinity data of all compounds.

Introduction

Inotropic GABA receptors (GABA_A^a), like other members of the ligand-gated ion channels (LGICs) superfamily, are considered to be heteropentamers composed of five protein subunits arranged to form a central ion channel. A total of 19 protein subunits, encoded by different genes, are grouped into isoforms $\alpha_{(1-6)}$, $\beta_{(1-3)}$, $\gamma_{(1-3)}$, δ , ϵ , π , θ , and $\rho_{(1-3)}$ and have been cloned and sequenced from the mammalian nervous system. Despite the great repertoire of GABA_A receptors that could exist (more than 2000 different receptors), the majority of GABA_A receptors expressed in the central nervous system are formed by subunits $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (about 60%), with $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ also prevalent (15–20%), assembled in 2:2:1 stoichiometry. The other assembled GABA_A receptor subunits (α_4 – $\beta_n\gamma_n$) are less abundant (about 5%) and with confined distributions. For example, receptors containing the α_5 isoform are localized in the hippocampus, olfactory bulb,

and hypothalamus and are extra synaptic receptors. The α_4 isoform, whose distribution parallels that of δ subunit, is localized in the thalamus and hippocampus basal ganglia and forms extra synaptic receptors.^{1–4} Benzodiazepines (Bzs), which bind the GABA_A receptor at the interface of the α and γ subunit, are known to be positive allosteric modulators at only a subset of GABA_A receptors: α_1 -, α_2 -, α_3 -, and α_5 -containing receptors, respectively. However, different classes of compounds, the nonbenzodiazepine ligands, can interact with the benzodiazepine binding site, acting with different profiles (agonist, antagonist, and inverse agonist) and subtype affinities than the benzodiazepines.^{3,5–7} In an attempt to link distinct pharmacological functions with certain GABA_A receptor subtypes, genetic and medicinal chemistry approaches have been used by researchers.⁸ The genetic approach utilizes transgenic mice with point mutation on the α subunit while the chemistry approach synthesizes ligands endowed with selective affinity or efficacy. These approaches help to explain the important role of $\alpha_{(1-3, 5)}$ -isoform on drugs action. It has been proposed that the α_1 -subunits mediate sedation and that they could be the target for sedative–hypnotic agents. Agonists at α_2 - and/or α_3 -containing GABA_A receptors have been shown to provide anxiolysis. Inverse agonists at the α_5 -isoform could be useful for memory enhancement because these extra synaptic receptors, mainly localized in the hippocampus, play a key role in cognitive processes.^{1,6–17} An interesting new potential role for α_3 - and α_5 -selective agonists has been demonstrated. In particular,

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +39-055-4573766. Fax: +39-055-4573671. E-mail: gabriella.guerrini@unifi.it.

^aAbbreviations: GABA_A, GABA type A receptor; LGICs, ligand-gated ion channels; Bzs, benzodiazepines; SAR, structure–affinity relationships; Bu₄N⁺Br[–], tetrabutylammonium bromide; Pd(PPh₃)₄, tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0); PdCl₂(dppf)CH₂Cl₂, [1,1'-bis(diphenyl phosphino)ferrocene]palladium(II)chloride; PTZ, pentylene-tetrazole; Pp, pharmacophoric point; Lp, lipophilic point; HBp, hydrogen bond interaction point; CGS 9896, 2-(4-chlorophenyl)pyrazolo[4,3-*c*]quinolin-3-one; Diazepam: 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-one.