



A.D. MDLXII

## **Università degli Studi di Sassari**

*Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche*

Indirizzo: Scienze Farmaceutiche

**XXVIII ciclo**

---

***Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a  
piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima  
fosfodiesterasi 10A.***

Direttore della Scuola:

**Prof. Stefano Enzo**

Supervisore:

**Dott.ssa Battistina Asproni**

Dottoranda:

**Dott.ssa Alessia Scampuddu**

## Indice

Capitolo 1: Introduzione	3
1.1. Trasduzione del segnale e fosfodiesterasi	4
1.2. Architettura del sito catalitico delle PDE	11
1.3. Fosfodiesterasi 10A	15
1.3.1. Localizzazione subcellulare delle PDE10A	18
1.3.2. Implicazione delle PDE10A nelle patologie a carico dei gangli della base	20
1.3.3. Schizofrenia	23
1.3.4. PDE10A nei disturbi del movimento	26
1.3.5. Sito catalitico delle PDE10A e progettazione di inibitori	28
Capitolo 2: Chimica	40
Capitolo 3: Biologia	50
Capitolo 4: Parte sperimentale	55
4.1. Chimica	56
4.2. Biologia	119
Bibliografia	120



# Capitolo 1:

## Introduzione

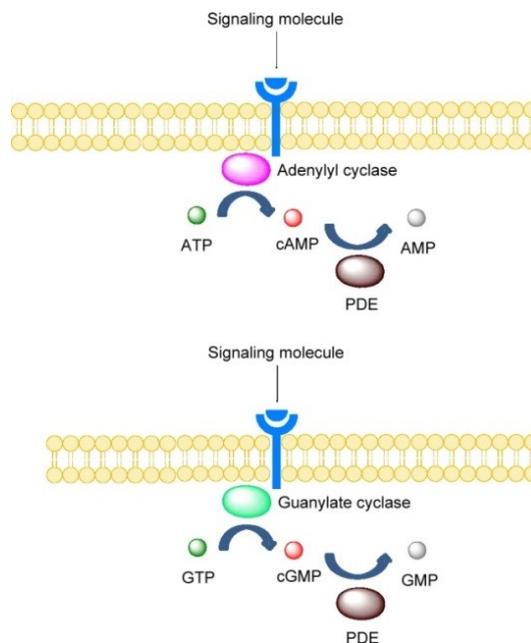
## 1.1. Trasduzione del segnale e Fosfodiesterasi

Per garantire il corretto funzionamento cellulare é necessaria l'integrazione di un gran numero di processi intra- ed intercellulari. Per permettere alle cellule di ricevere tutti gli stimoli e, conseguentemente, di integrare e tradurre tutti i codici, si sono evoluti svariati sistemi di trasduzione del segnale.

Due di questi, ovvero quelli dell'AMP ciclico (cAMP) e del GMP ciclico (cGMP), sono sicuramente tra i primi sistemi di trasduzione del segnale identificati.<sup>1</sup>

I secondi messaggeri adenosina e guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (cAMP e cGMP) mediano la risposta cellulare causata da una grande varietà di ormoni e neurotrasmettitori, e modulano tantissimi processi fisiologici.<sup>2</sup>

La trasmissione del segnale da parte del cAMP e del cGMP *in vivo* coinvolge tre tipi di enzimi: le ciclasi, le fosfodiesterasi dei nucleotidi ciclici (PDE) e le protein-chinasi nucleotidi ciclici dipendenti.



**Figura 1:** Generazione dei nucleotidi ciclici e loro idrolisi (da Chappie et al., 2012)

I due nucleotidi ciclici possono essere generati mediante due vie: una extra- ed una intracellulare.

I segnali extracellulari, come ad esempio ormoni o neurotrasmettitori, possono legarsi alle proteine di membrana e attivare particolari forme di adenilato o guanilato ciclasi.

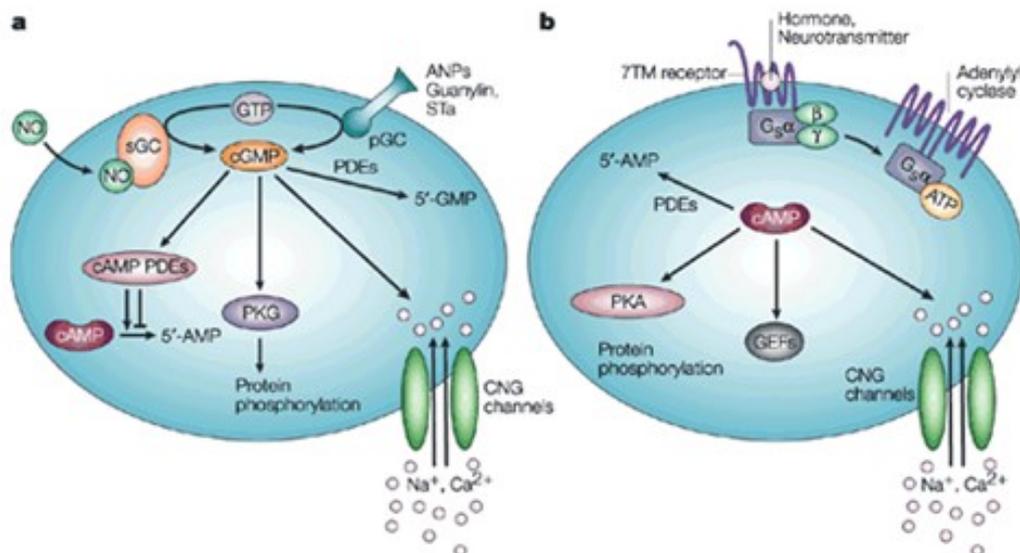
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Questa attivazione sfocia nella generazione di cAMP e cGMP a partire, rispettivamente, dall'ATP e dal GTP.<sup>3</sup>

Esistono anche forme solubili (citosoliche) di adenilato e guanilato ciclasti, che possono essere attivate da messaggeri intracellulari. L'adenilato ciclasti solubile é attivata da segnali calcio-dipendenti, mentre la guanilato ciclasti solubile é attivata dall'ossido nitrico (NO).<sup>4</sup>

Una volta sintetizzati, il cAMP e il cGMP trasducono importanti informazioni tramite uno svariato numero di effettori cellulari. Tra questi ricordiamo le protein-chinasi attivate dal cAMP o dal cGMP (PKA o PKG), canali ionici regolati dai nucleotidi ciclici e due proteine di scambio attivate dal cAMP (EPAC1 e EPAC2).<sup>5</sup> La PKA é in grado di regolare l'espressione genica, tramite la fosforilazione diretta di fattori come CREB (cAMP-responsive element binding protein) e CREM (cAMP-responsive element modulator).<sup>6</sup>

La regolazione di questi segnali é quindi estremamente importante per la modulazione di diverse funzioni cellulari, come la trasduzione dei segnali visivi, la proliferazione e differenziazione cellulare, l'espressione genica, l'infiammazione, l'apoptosi, e di numerose vie metaboliche come la steroidogenesi, la secrezione di insulina e la sintesi del glicogeno, così come la glicogenolisi, la lipogenesi e la lipolisi.<sup>7</sup>



**Figura 2:** Vie di sintesi e regolazione dei secondi messaggeri cAMP (a) e cGMP (b). (Da Beavo et al., 2002)

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Le fosfodiesterasi sono gli unici enzimi in grado di idrolizzare i nucleotidi ciclici ad adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP), tramite idrolisi del loro legame 3',5'-fosfodiesterico.<sup>8</sup>

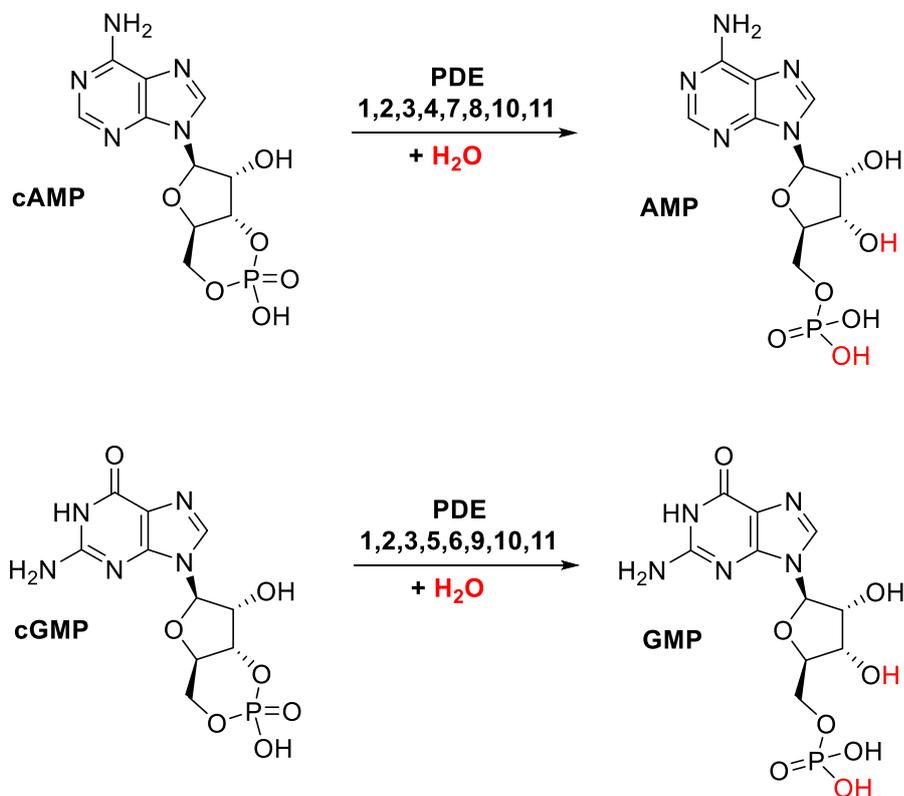


Figura 3: Idrolisi del cAMP e del cGMP ad opera delle fosfodiesterasi.

Alla luce di quanto visto, le PDE giocano un ruolo fondamentale nella regolazione spazio-temporale della concentrazione dei nucleotidi ciclici e nella trasmissione del segnale da parte di tali nucleotidi.

L'attività enzimatica delle fosfodiesterasi nei confronti dei nucleotidi ciclici è stata scoperta nel 1958 da *Sutherland e coll.*, i quali scoprirono anche che la caffeina è un inibitore di tale attività idrolitica.<sup>9</sup>

Queste scoperte preliminari già delineavano il ruolo essenziale delle PDE nella regolazione della concentrazione intracellulare dei nucleotidi ciclici e, conseguentemente, dei loro effetti biologici.

Ad oggi, non sono numerosi gli inibitori delle fosfodiesterasi in uso nella pratica clinica.

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Tuttavia, scoperte recenti hanno rinnovato l'entusiasmo nell'investigazione del loro potenziale terapeutico.

In primo luogo, alcune specifiche PDE hanno mostrato la capacità di poter controllare eventi cellulari tramite la loro integrazione in complessi di regolazione del segnale di tipo multi-molecolare, chiamati "segnalosomi".<sup>10,11</sup>

In aggiunta, è ormai chiara l'evidenza che il "disturbo" nella modulazione di questi segnali, e la risultante disregolazione tramite influenze cellulari, genetiche o epigenetiche, sia associato a vari stati patologici come asma, infiammazione, disfunzione erettile, ipertensione, aritmie cardiache e disfunzioni psichiatriche.<sup>12</sup>

La modulazione di questi enzimi ha permesso infatti lo sviluppo di farmaci di successo per il trattamento di pazienti con disturbi cardiaci (milrinone),<sup>13</sup> disturbo polmonare cronico ostruttivo (COPD) (roflumilast),<sup>14</sup> disfunzione erettile (sildenafil, tadalafil, vardenafil)<sup>15</sup> e ipertensione polmonare (sildenafil).<sup>16</sup> Grazie al successo di queste terapie, l'inibizione delle PDE costituisce un argomento di grande interesse per la comunità scientifica.

I derivati xantینici, inclusi caffeina e teofillina, venivano usati come broncodilatatori, diuretici e come agenti inotropici, prima che venisse identificata la loro attività come inibitori non selettivi delle PDE.<sup>17</sup> In ogni caso, il loro sfavorevole rapporto rischio-beneficio e i loro effetti collaterali considerevoli ne impedirono il successo terapeutico.

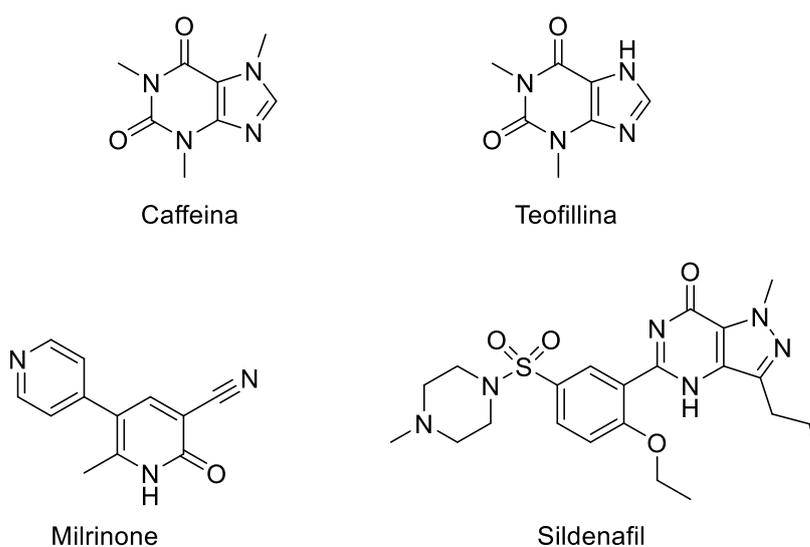


Figura 4: Alcuni inibitori delle PDE

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Negli anni '70 e '80, semplici tecniche di filtrazione su gel e cromatografie a scambio ionico di estratti tissutali rivelarono molteplici picchi relativi all'attività delle PDE, dove ad ogni picco corrispondeva una diversa specificità e affinità per il cGMP e/o il cAMP, così come una diversa sensibilità agli agenti farmacologici al momento disponibili e ad effettori come la calcio/calmodulina (la PDE sensibile alla calcio/calmodulina è oggi nota come PDE1).<sup>18,19</sup>

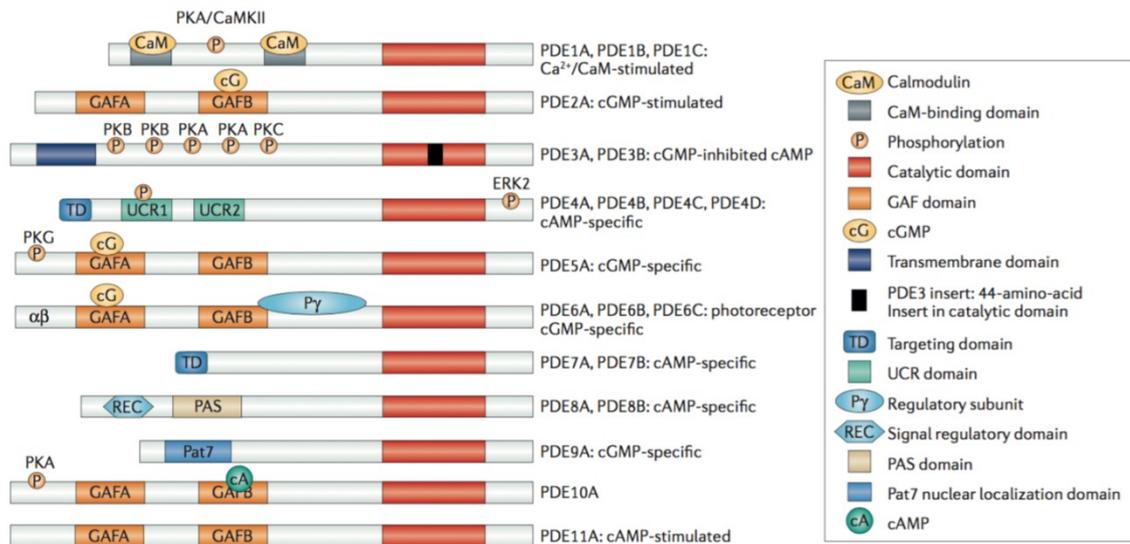
Successivamente, gli agenti farmacologici in uso vennero utilizzati per suddividere le PDE specifiche per il cAMP in cilostamide-sensibili (ora note come PDE3) e Ro20-1724-sensibili (PDE4).<sup>20</sup>

Anche la specificità per il cGMP è stata utilizzata per differenziare altre PDE: si distinsero le PDE la cui attività idrolitica nei confronti del cAMP era inibita dal cGMP (cGMP-inhibited cAMP-hydrolysing PDEs, PDE3),<sup>21</sup> PDE per le quali il cGMP stimola l'attività idrolitica nei confronti del cAMP (cGMP-stimulated cAMP-hydrolysing PDEs, PDE2), e PDE specifiche per il cGMP (PDE5).<sup>22</sup>

Ad oggi, la grande superfamiglia delle PDE viene organizzata in 11 famiglie, strutturalmente correlate ma funzionalmente distinte. Esse differiscono infatti nella loro funzione cellulare, nella struttura primaria, nell'affinità per il cAMP e/o per il cGMP, per le loro proprietà catalitiche, per la risposta a particolari attivatori o inibitori, e nel loro meccanismo di regolazione.

In quanto proteine modulari, le varie famiglie di PDE mostrano un'organizzazione strutturale comune, con uno stesso residuo catalitico C-terminale e differenti regioni regolatorie N-terminali.

Alcune PDE idrolizzano specificamente il cAMP (PDE4, 7 e 8), altre il cGMP (PDE5, 6 e 9), mentre le PDE 1, 2, 3, 10 e 11 sono in grado di idrolizzare entrambi i substrati.



**Figura 5:** Struttura e organizzazione delle 11 famiglie di fosfodiesterasi. (Da Maurice et al., 2014)

Alcune famiglie sono distinte sulla base del loro sottotipo, come le PDE 1 A/B/C, le PDE3 A/B, le PDE 4 A/B/C/D, le PDE7 A/B e le PDE 8 A/B, codificate ciascuna da un gene distinto.

Ci sono inoltre classificazioni basate sulle *splicevariants* di ogni gene, le quali espandono la famiglia delle fosfodiesterasi ad oltre 60 isoforme.

La regione regolatoria ammino-terminale delle PDE contiene degli elementi strutturali determinanti, che indirizzano le PDE verso una specifica sublocalizzazione cellulare.

In molti tipi di cellule è presente più di una famiglia di PDE, anche se in proporzioni, concentrazioni e localizzazioni subcellulari diverse.

Sebbene le PDE esibiscano una larga distribuzione tissutale, molti tipi cellulari sono relativamente ricchi di una specifica famiglia: ad esempio, il fotorecettore PDE6 è quasi esclusivamente espresso solo nei bastoncelli e coni della retina.<sup>3</sup>

PDE family or gene	Tissue expression	Knockout mouse phenotypes
PDE1 (calcium/calmodulin-activated): PDE1A (nine variants), PDE1B (two variants), PDE1C (five variants)	Broad; significant in cardiac and vascular myocytes, central and peripheral neurons, lymphoid (T and B cells) and myeloid cells (macrophages have higher expression levels than monocytes) as well as in testes and sperm <sup>1-3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE1B: increased exploratory behaviour, learning deficits, hyperactivity<sup>174</sup></li> <li>• PDE1C: regulation of olfaction<sup>175</sup></li> </ul>
PDE2 (cGMP-activated): PDE2A (four variants)	Broad; significant in the brain, heart (myocytes), liver, adrenal cortex, endothelium and platelets <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE2A: embryonic death (E17)</li> </ul>
PDE3 (cGMP-inhibited): PDE3A (three variants), PDE3B (one variant)	Broad; significant in cardiac and vascular myocytes, brain, liver, adipose tissues, pancreatic $\beta$ -cells, endothelium, epithelium, oocytes and platelets <sup>1-3,46,66-67</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE3A: female infertility owing to oocyte meiosis arrest<sup>67</sup>; dysregulated vascular myocyte proliferation<sup>121</sup></li> <li>• PDE3B: white adipose tissue acquires brown adipose tissue characteristics<sup>176</sup></li> </ul>
PDE4 (cAMP-specific): PDE4A (seven variants), PDE4B (four variants), PDE4C (seven variants), PDE4D (nine variants)	Broad; significant in cells of the cardiovascular, neural, immune and inflammatory systems <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE4A: no phenotype<sup>177</sup></li> <li>• PDE4B: reduced TNF response to LPA<sup>124</sup></li> <li>• PDE4C: none published</li> <li>• PDE4D: delayed growth, impaired ovulation, reduced postnatal viability and refractory to muscarinic cholinergic stimulation<sup>16,126</sup></li> </ul>
PDE5 (cGMP-activated and cGMP-specific): PDE5A (three variants)	Broad; significant in vascular myocytes, diseased cardiac myocytes, lung, brain, platelets, kidney, gastrointestinal tissues and penis <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• None published</li> </ul>
PDE6 (cGMP-activated and cGMP-specific): PDE6A (one variant), PDE6B (one variant), PDE6C (one variant)	Expression limited to photoreceptors and pineal gland <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• None published</li> </ul>
PDE7 (cAMP-specific, rolipram-insensitive): PDE7A (three variants), PDE7B (four variants)	Broad in tissues including spleen, brain, lung and kidney as well as in lymphoid and myeloid cells <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE7A: normal T cell activation; elevated antibody response to a T cell-dependent antigen<sup>178</sup></li> <li>• PDE7B: none published</li> </ul>
PDE8 (cAMP-specific, rolipram/IBMX-insensitive): PDE8A (five variants), PDE8B (six variants)	Broad; significant in testes (PDE8A) and thyroid (PDE8B) <sup>1-3,46,76</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE8A: increased Leydig testosterone release; increased sensitivity to luteinizing hormone<sup>77</sup>; regulation of excitation-contraction coupling and calcium transients in cardiomyocytes<sup>179</sup></li> <li>• PDE8B: enhanced memory and age-related decline in motor performance<sup>180</sup></li> </ul>
PDE9 (cAMP-specific, IBMX-insensitive): PDE9A (20 variants)	Broad; significant in spleen, brain and intestinal cells <sup>1-3,46</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE9A: on high-fat diet, knockout mice demonstrated reduced insulin resistance, reduced weight gain and lower fat mass<sup>181</sup>; PDE9A deletion or inhibition increases CNS cGMP <i>in vivo</i><sup>182</sup></li> </ul>
PDE10 (cAMP-inhibited): PDE10A (six variants)	Expression limited to brain and testes <sup>1-3,46,183</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE10A: decreased exploratory behaviour, hypoactivity, delayed acquisition of conditioned avoidance behaviour; female PDE10A-null mice are smaller<sup>184</sup></li> </ul>
PDE11 (cGMP-activated): four variants)	Expression limited to prostate, testes and salivary and pituitary gland <sup>1-3,46,185</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PDE11A: enlarged lateral ventricles; abnormal behaviour<sup>186</sup></li> </ul>

**Tabella 1:** Espressione tissutale delle PDE e impatto sui topi knockout (da *Maurice et al.*, 2014)

## 1.2. Architettura del sito catalitico delle fosfodiesterasi.

La struttura del sito catalitico delle fosfodiesterasi, determinata mediante studi di cristallografia ai raggi X, ha mostrato, nell'ambito delle diverse famiglie, una comune topografia, composta da circa 350 amminoacidi ripiegati in 16  $\alpha$ -eliche.<sup>23,24</sup>

Il sito attivo forma una profonda tasca idrofobica contenente dei siti di interazione con due metalli bivalenti, essenziali per l'attività catalitica.<sup>25</sup> Questa tasca presenta 11 residui amminoacidici altamente conservati, come un residuo di glutammina (Gln369 nelle PDE4D2, Gln453 nelle PDE9A2, Gln726 nelle PDE10A2), il quale forma legami a idrogeno con i substrati endogeni e con gli inibitori.<sup>26</sup>

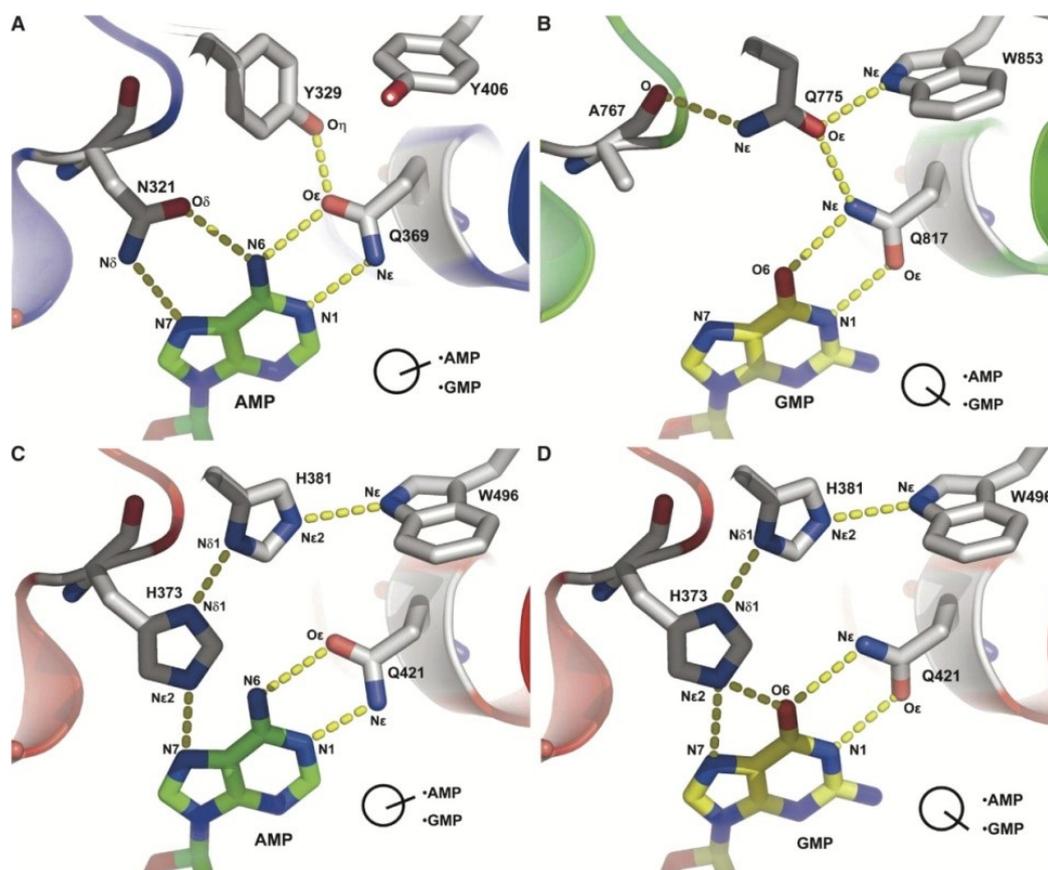
Analisi cristallografiche del complesso enzima-inibitore rivelano inoltre che vi è un altro residuo amminoacidico altamente conservato e fondamentale per l'interazione con gli inibitori, ovvero una fenilalanina.

La formazione di legami idrogeno con la glutammina determina l'orientazione degli inibitori, mentre i residui amminoacidici idrofobici formano una "*hydrophobic clamp*" che blocca gli inibitori nella tasca.

Nella struttura cristallina, il legame con il cAMP presuppone che il residuo di glutammina si comporti allo stesso tempo da accettore e da donatore di legami a idrogeno. Il carbonile accetta un legame idrogeno dal gruppo 6-NH<sub>2</sub> dell'adenina mentre il residuo amminico dona un legame idrogeno all'N<sub>1</sub> dell'anello adeninico.

Per quanto riguarda invece il legame con il cGMP, il gruppo amminico della glutammina dona un legame idrogeno al carbonile in C<sub>6</sub> della guanina mentre il carbonile ammidico dell'amminoacido accetta un legame idrogeno dall'-N<sub>1</sub>H della guanina.

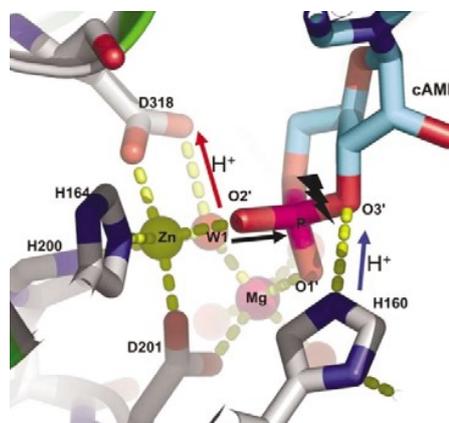
La disposizione spaziale del gruppo ammidico della glutammina è influenzata dall'intorno chimico generato dai vari residui amminoacidici che descrivono la tasca. Se queste interazioni vengono a mancare, il gruppo ammidico della glutammina sarà in grado di ruotare (*switch della glutammina*), adattandosi così ad ogni nucleotide ciclico e perdendo la specificità di substrato.<sup>27</sup>



**Figura 6:** Interazioni presenti nel sito attivo dell'enzima fra il residuo di glutamina (Q) e gli altri residui aminoacidici. In **A** e **B** tali interazioni conferiscono una marcata selettività per l'AMP (PDE4D) e per il GMP (PDE5A), mentre in **C** e **D** (PDE1B) la mancanza di tali interazioni porta alla perdita di selettività. (Da Zhang et al., 2004)

Il sito catalitico delle PDE può quindi essere schematizzato ipotizzando 4 regioni fondamentali:

- Un "metal site" (M): contiene 2 siti di interazione, uno con uno ione  $Zn^{2+}$  e un altro con un secondo metallo, presumibilmente magnesio o manganese. Lo ione zinco è legato a due istidine, due residui di aspartato e a due molecole di acqua. Il secondo metallo è coordinato da un residuo di aspartato e da cinque



**Figura 7:** Idrolisi del cAMP legato alla PDE4. (da Houslay et al., 2005)

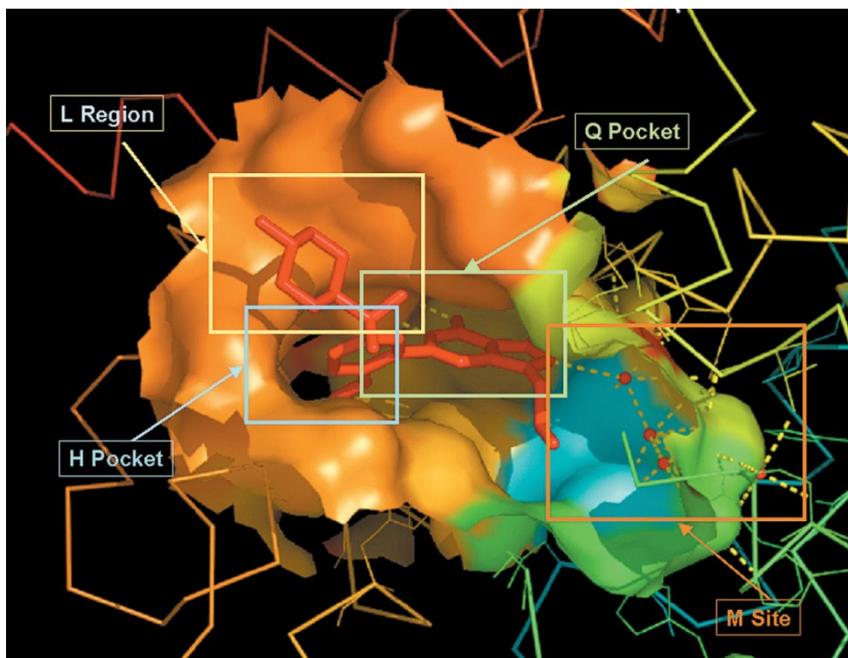
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

molecole di acqua. I due metalli sono in grado di instaurare dei legami con il gruppo fosfato del substrato endogeno, innescando il meccanismo di idrolisi che è illustrato in figura 7.

Il residuo di aspartato è in grado di deprotonare una molecola di acqua: si genera così uno ione ossidrile che attacca il gruppo fosfato. Il residuo di istidina è in grado invece di protonare l'ossigeno in posizione 3' dello zucchero che può quindi funzionare da gruppo uscente.

I residui di questa porzione sono altamente conservati nell'ambito delle diverse famiglie di fosfodiesterasi.

- Un "core pocket", o regione Q, rivestito da alcuni amminoacidi altamente conservati quali glutammina, fenilalanina, valina e tirosina, e ha la funzione di ospitare l'anello purinico del nucleotide.
- Una *P-clamp*, una sorta di "pinza" idrofobica, composta da residui di fenilalanina che bloccano il ligando nel sito attivo;
- Una regione lid (L), chiamata anche *mouth pocket*, che funge da "coperchio", limitando l'ingresso al sito attivo. Quest'ultima regione sembra essere una peculiarità delle PDE5.<sup>28</sup>



**Figura 8:** Rappresentazione schematica del sito attivo occupato dal Sildenafil, che mostra la presenza delle 4 regioni elencate (da Jeon et al., 2005)

Scappuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Oltre agli elementi conservati all'interno delle varie famiglie, sono presenti elementi variabili che consentono la specificità di substrato delle varie PDE, nonché l'affinità e selettività per i vari inibitori.

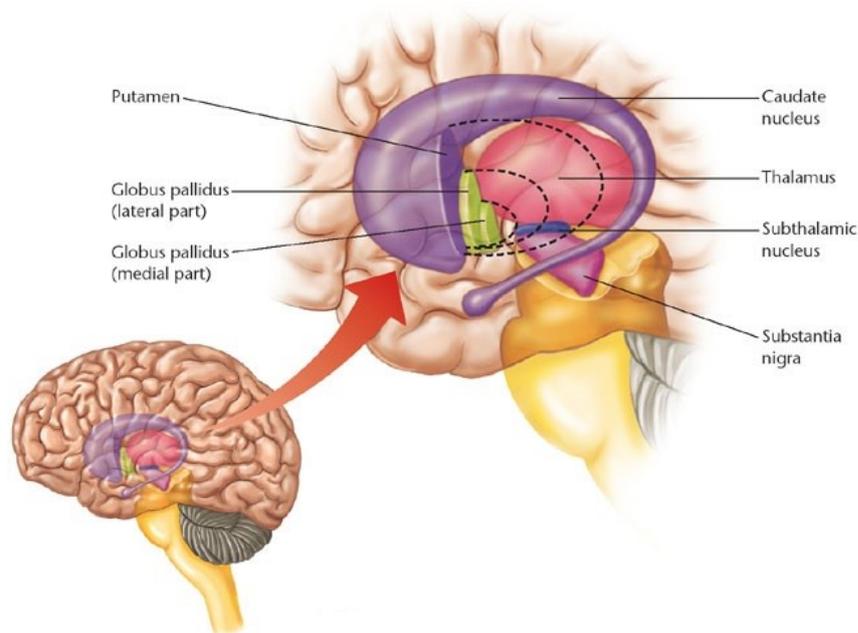
### 1.3. Fosfodiesterasi 10A

Le PDE10A sono state scoperte nel 1999 da tre gruppi di ricerca diversi.<sup>29,30,31</sup>

Ciò che ne fa un target terapeutico di rilevante importanza é la loro caratteristica localizzazione, descritta per numerose specie di mammiferi.

L'espressione dell'mRNA delle PDE10A é infatti limitata esclusivamente al cervello e, in misura nettamente minore, a testicoli, tiroide e reni. A livello cerebrale, studi di immunostochimica hanno rilevato l'espressione delle PDE10A nel corpo striato a livello del nucleo caudato, *nucleus accumbens* e tubercolo olfattorio, nonché nel *globus pallidus* e nella *substantia nigra*.

Il corpo striato si divide in nucleo caudato e putamen, e rappresenta una parte di fondamentale importanza nel circuito dei gangli della base. Gioca infatti un ruolo chiave nella regolazione delle risposte agli stimoli esterni, delle funzioni esecutive e cognitive grazie alle sue connessioni con le aree corticali.



**Figura 9:** Rappresentazione dei Gangli Basali: Corpo Striato, *Globus Pallidus*, *Substantia Nigra*, Nucleo Subtalamico (Modificata da <http://cti.itc.virginia.edu/~psyc220/>)

La peculiare localizzazione anatomica delle PDE10A ne fa quindi un target di primaria importanza per il trattamento dei disturbi che coinvolgono disfunzioni a livello striatale.

Una recente scoperta ha inoltre dimostrato che l'espressione delle PDE10A nel corpo striato del topo è la più alta se comparata a tutte le altre PDE;<sup>32</sup> tale abbondanza relativa è misurabile anche nell'uomo.<sup>33</sup>

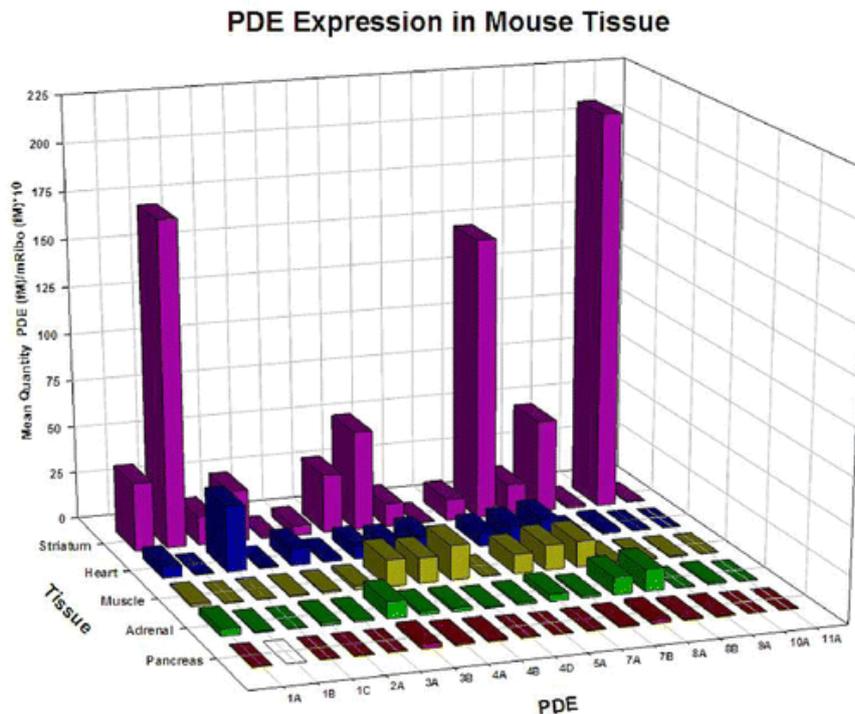


Figura 10: Espressione dell'mRNA per le varie famiglie di PDE nei tessuti (Da Chappie et al., 2014)

Le PDE10A esistono, nell'uomo, in due *splice variants*, PDE10A1 e PDE10A2; la variante A2 è presente nel cervello umano in concentrazione maggiore rispetto alla A1.<sup>34</sup>

Le differenze nella porzione N-terminale delle due *splicevariants* si traducono in una differente localizzazione cellulare (citosolica per le PDE10A1, di membrana per le PDE10A2).<sup>35</sup>

Le PDE10A possiedono due domini GAF (GAF A e GAF B, da *cGMP-specific and -stimulated PDEs*, Anabaena *adenylyl cyclases*, Escherichia coli *transcription factor FhlA*), Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

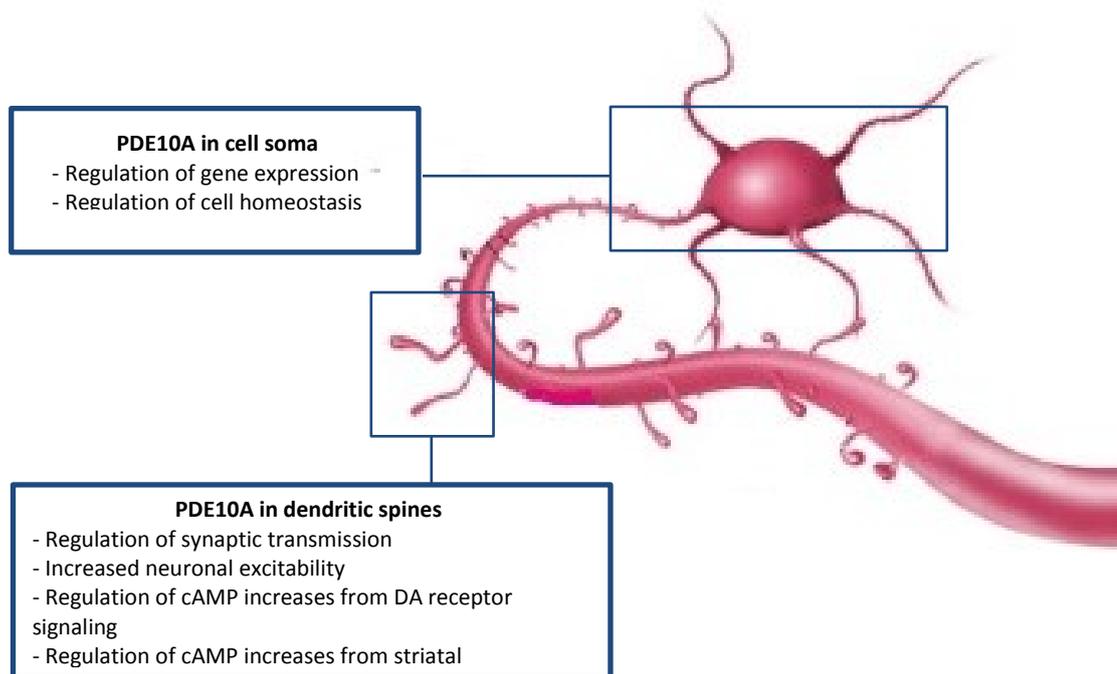
i quali regolano l'attività catalitica delle PDE mediante il legame allosterico con il cGMP.<sup>36,37</sup>

Studi immediatamente successivi alla scoperta delle PDE10A hanno rivelato che l'mRNA e le proteine sono altamente espresse solo in particolari tipi di cellule, ovvero i neuroni spinosi GABAergici di medie dimensioni (*Medium-sized Spiny Neurons, MSNs*), contenuti solo nel corpo striato dei mammiferi.

All'interno di questi neuroni, le PDE10A sono prevalentemente associate alla membrana cellulare e sono localizzate nei dendriti, nelle spine dendritiche e a livello assonale.

E' interessante notare che esse sembrano essere localizzate estremamente vicino alla densità postsinaptica (PSD), dove risiede uno stretto controllo dell'eccitabilità neuronale tramite recettori e canali ionici.<sup>38</sup>

Queste evidenze sperimentali portano alla conclusione che le PDE10A giocano un ruolo fondamentale nella trasmissione sinaptica, regolando in maniera specifica l'eccitabilità neuronale dei MSNs.



**Figura 11:** Rappresentazione schematica della localizzazione neuronale delle PDE10A. A livello delle spine dendritiche, le PDE10A sono coinvolte nel regolamento dell'eccitabilità neuronale tramite la modulazione della trasmissione sinaptica. Nel soma cellulare, le PDE10A giocano un ruolo importante nella trasmissione del segnale, nell'attività della PKA e nell'espressione genica. (Modificata da *Wilson and Brandon, 2015*)

### 1.3.1. Localizzazione subcellulare delle PDE10A.

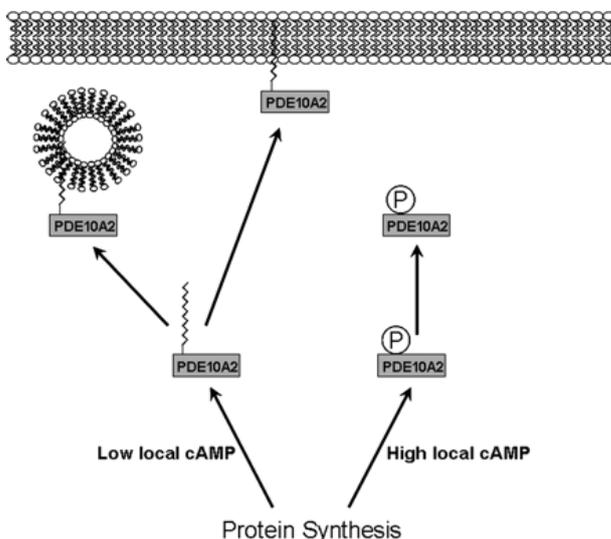
Le diverse *splice-variants* (PDE10A1-18) sono diversamente localizzate a livello subcellulare. Come già detto, la principale variante espressa a livello del corpo striato nell'uomo è la PDE10A2.

La differenza tra queste isoforme risiede nella presenza di 13 amminoacidi nella regione N-terminale, sequenza che ne determina anche la localizzazione a livello subcellulare. Rimuovendo tale sequenza, si ha la completa localizzazione citosolica dell'enzima.

Sono almeno 2 gli amminoacidi chiave coinvolti nella localizzazione delle PDE10A2: una cisteina (Cys11) e una treonina (Thr16).<sup>39</sup>

In primo luogo, la PDE10A2 può essere fosforilata a livello della Thr16 da parte della PKA. Il risultato di questa fosforilazione è lo spostamento dell'enzima dalla membrana al citosol.

In aggiunta, la palmitoilazione della Cys11 si è mostrata essenziale per la localizzazione della PDE10A2 nella membrana plasmatica.



**Figura 12:** Modello proposto per la regolazione della localizzazione della PDE10A in risposta alle variazioni nei livelli di cAMP. (da Charych *et al*, 2010)

Ciò dipende dalla concentrazione di cAMP nel sito di sintesi della PDE10A: in condizioni di elevate concentrazioni di cAMP, la PDE10A2 viene fosforilata a livello della Thr16, poiché tali concentrazioni attivano la PKA. Allo stesso tempo, la fosforilazione della Thr16 impedisce la palmitoilazione della Cys11, e il risultato è un accumulo delle PDE10A a livello citosolico.

In condizioni di basse concentrazioni di cAMP, la PDE10A può essere palmitoilata, facilitando così il trasporto tramite vescicole e permettendo quindi la localizzazione a livello della membrana cellulare.

Un efficiente bilancio tra fosforilazione e palmitoilazione è quindi responsabile della localizzazione subcellulare dell'enzima.

Tutti questi dati suggeriscono che un aumento della concentrazione di cAMP con metodi farmacologici, quali ad esempio l'inibizione dei recettori D<sub>2</sub> con antipsicotici, può alterare l'attivazione della PKA e, di conseguenza, la localizzazione cellulare della PDE10A.

Un utilizzo cronico di un farmaco D<sub>2</sub> antagonista può quindi modificare la localizzazione cellulare dell'enzima e quindi alterare gli effetti farmacodinamici di un inibitore delle PDE10A.<sup>40</sup>

### 1.3.2. Implicazione delle PDE10A nelle patologie a carico dei gangli della base.

Disfunzioni nel circuito dei gangli basali sono implicate in vari disturbi a carico del SNC, tra cui il morbo di Parkinson, la corea di Huntington, la schizofrenia, il disturbo ossessivo-compulsivo.

I MSNs costituiscono il principale sito di input nel circuito dei gangli basali del cervello dei mammiferi.

I gangli basali sono costituiti da una serie di nuclei subcorticali tra loro connessi, i quali integrano gli stimoli corticali glutamatergici con il circuito dopaminergico, permettendo la pianificazione e l'esecuzione di patterns motori e cognitivi, e sopprimendo i patterns indesiderati o irrilevanti.<sup>41</sup>

A questo livello, il circuito dopaminergico è di fondamentale importanza per il controllo delle funzioni psicomotorie.

I recettori dopaminergici sono dei recettori accoppiati a proteina G (GPCR), e vengono suddivisi in D<sub>1</sub>-like (D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>), in grado di stimolare l'adenilato ciclasi tramite G<sub>s</sub>, e D<sub>2</sub>-like (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>), che sono invece in grado di inibirla via G<sub>i/o</sub>.<sup>42,43</sup>

Nel corpo striato, i D<sub>1</sub> e i D<sub>2</sub> sono localizzati in due tipi di MSNs: i primi si trovano nei neuroni GABAergici dinorfinici, appartenenti alla cosiddetta via nigrostriatale (o diretta); i secondi sono localizzati invece a livello dei neuroni GABAergici encefalinergici, facenti parte della via pallidostriatale (o indiretta).<sup>44</sup>

Queste due tipologie neuronali sono in grado di regolare gli impulsi inibitori che provengono dai gangli basali (Segmento interno del Globo Pallido e *Substantia Nigra Pars Reticulata*).

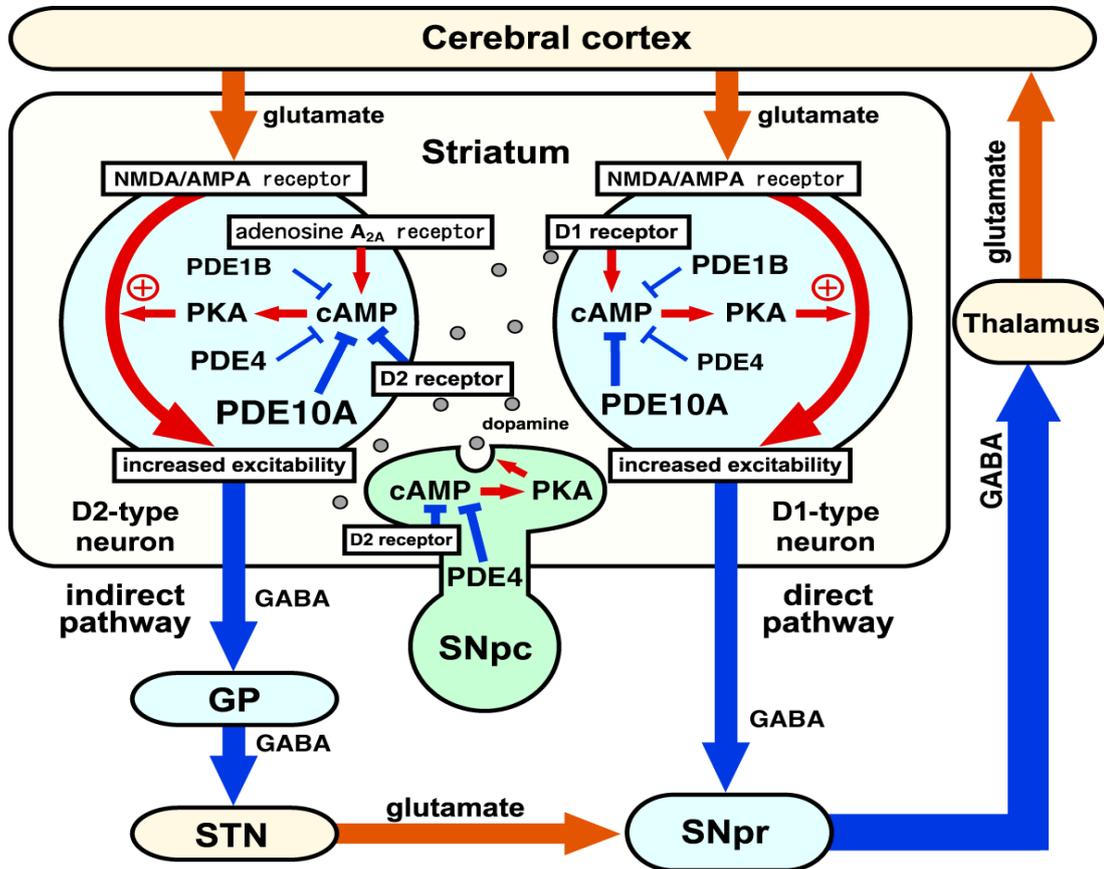
La dopamina, o gli agonisti dopaminergici, promuovono l'attivazione, tramite i recettori D<sub>1</sub>, della cascata cAMP/PKA nella via diretta, mentre i recettori D<sub>2</sub> inibiscono la cascata cAMP/PKA nella via indiretta.

Le PDE10A sono abbondantemente espresse sia nei neuroni GABAergici dinorfinici che in quelli encefalinergici, e sono quindi in grado di regolare la cascata cAMP/PKA, così come l'espressione genica, nei neuroni appartenenti ad entrambe le vie.<sup>45</sup>

Nella via diretta, l'inibizione delle PDE10A attiva la cascata cAMP/PKA, e ciò sfocia in un potenziamento dell'azione dei recettori D<sub>1</sub>. Anche nei neuroni della via indiretta

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

l'inibizione delle PDE10A attiva la cascata cAMP/PKA, ma ciò avviene tramite il potenziamento dell'azione dei recettori adenosinici A<sub>2A</sub> e l'inibizione dell'attività dei recettori D<sub>2</sub>.



**Figura 13:** Ruolo delle Fosfodiesterasi nel controllo dei circuiti dei gangli basali e talamocorticali. I neuroni spinosi di medie dimensioni costituiscono le due vie, diretta e indiretta, inducono effetti opposti nei neuroni "output" a livello del GPi/SNpr. Si hanno come risultato la disinibizione e la pro-inibizione degli outputs neuronali destinati alle aree motorie del talamo e della corteccia. (da Nishi *et al.*, 2011)

Basandoci su questo, l'inibizione delle PDE10A porta all'attivazione della cascata cAMP/PKA nei neuroni della via indiretta, dando luogo all'inibizione dei circuiti gabaergici talamocorticali, mimando un D<sub>2</sub>-antagonista.

Al contrario, l'inibizione delle PDE10A porta all'attivazione anche dei neuroni della via diretta, attivando i circuiti talamocorticali come un D<sub>1</sub>-agonista.

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

In altri termini, l'attivazione della via diretta  $D_1$  aumenta la forza della risposta, mentre l'attivazione della via indiretta  $D_2$  serve a ridurre il "rumore" delle risposte indesiderate.

### 1.3.3. Schizofrenia

La schizofrenia é un grave disturbo mentale, che presenta un'incidenza dell'1% nella popolazione mondiale e colpisce in egual misura uomini e donne. Gli uomini presentano tipicamente il disturbo in gioventù, prima dei 20 anni, mentre le donne lo manifestano in prevalenza tra i 20 e i 30 anni.

La schizofrenia appare come una malattia poligenica, legata sia a fattori ambientali che genetici.

Una storia familiare di schizofrenia rappresenta il fattore di rischio più significativo; altri ipotetici fattori di rischio includono lo status socioeconomico o infezioni prenatali, anche se non ci sono dati certi riguardo queste ipotesi.

Essa è caratterizzata da sintomi positivi e negativi, che influenzano significativamente i pensieri, le percezioni, i dialoghi ed il comportamento del paziente. I sintomi positivi includono allucinazioni visive o uditive, che confluiscono spesso in deliri di tipo paranoide. Quelli negativi invece comprendono inespressività affettiva, perdita del senso del piacere, della volontà, della necessità di rapporti sociali. La schizofrenia é inoltre caratterizzata da pensiero disorganizzato, che si manifesta sia nelle parole che nel comportamento.

Non ci sono singoli segnali o sintomi che possono portare ad una diagnosi di schizofrenia; vari sintomi devono presentarsi per una significativa porzione temporale nell'arco di un mese, ed alcuni devono essere presenti per un minimo di sei mesi.

Esistono 5 tipi di schizofrenia:

- Paranoide: caratterizzata da costanti preoccupazioni e spesso da allucinazioni visive o uditive. Le funzioni cognitive e affettive sono in genere inalterate rispetto ad un soggetto normale;
- Disorganizzata: pensieri, dialoghi e comportamento appaiono confusi, e spesso é presente un appiattimento affettivo;
- Catatonica: presenta immobilità o eccessiva attività motoria, estremo negativismo, e sovente peculiarità nei movimenti volontari.
- Indifferenziata: non sono presenti i sintomi di nessun tipo di schizofrenia sinora elencato;

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

- Residuale: caratterizzato dalla continua presenza di sintomi negativi (es. Appiattimento affettivo e povertà di dialogo) e almeno due sintomi positivi attenuati (es. Comportamento eccentrico, linguaggio disorganizzato).

Questa classificazione é tuttavia limitata dal fatto che, spesso, é difficile catalogare un paziente in una sola schizofrenia. Per questa ragione, é stato proposto un modello con tre tipologie: psicotica, disorganizzata e negativa.<sup>46</sup>

I trattamenti oggi in uso, ovvero gli antagonisti dei recettori D<sub>2</sub> e gli antipsicotici di seconda generazione, sono efficaci nell'alleviare i sintomi positivi della malattia, ma hanno un'efficacia limitata per quanto riguarda i sintomi negativi e cognitivi.

In parallelo, presentano gravi effetti avversi di tipo extrapiramidale (iperprolattinemia e sindrome metabolica, con sostanziale aumento di peso).<sup>47</sup>

L'esatto meccanismo patogenetico della schizofrenia é a tutt'oggi sconosciuto.

I due maggiori sistemi coinvolti sono il sistema dopaminergico e quello glutamatergico. L'ipotesi dopaminergica é supportata dal fatto che i sintomi acuti della schizofrenia possono essere provocati dalle droghe dopaminergiche, e che gli antipsicotici classici, quali l'aloiperidolo, presentano elevata affinità per i recettori D<sub>2</sub>.

L'ipotesi glutamatergica deriva invece dall'evidenza che, in soggetti con storia di abuso di fenciclidina (PCP), si sono notati gli stessi effetti dei pazienti schizofrenici, portando alla conclusione che gli antagonisti NMDA non solo inducono sintomi simili a quelli positivi, ma anche negativi e cognitivi.

In virtù della loro localizzazione e della loro espressione, le PDE10A appaiono come un target intrigante e promettente per lo sviluppo di farmaci con un approccio terapeutico alternativo per il trattamento della schizofrenia.

La prima evidenza farmacologica del potenziale antipsicotico degli inibitori delle PDE10A fu riportata da *Siuciak et al.* nel 2006, i quali descrissero che topi knockout per le PDE10A mostravano una risposta ridotta all'iperattività indotta da MK-801 e fenciclidina<sup>48</sup>. Tale evidenza fu supportata dallo stesso gruppo, il quale caratterizzava anche gli effetti farmacologici e biochimici della papaverina. Inoltre, essi dimostrarono che gli effetti farmacologici erano associati con un aumento delle concentrazioni di cAMP e cGMP nello striato.<sup>38</sup>

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Vari altri composti sono stati utilizzati in modelli animali di schizofrenia: il TP-10 era in grado di invertire l'iperattività indotta da fenciclidina o amfetamina ed inibiva la *conditioned avoidance response*, così come l'MP-10.

MP-10, WEB-3 e WEB-6 si sono inoltre mostrati efficaci nei confronti di modelli animali con sintomi negativi, poiché riducevano l'immobilità del ratto indotta da MK-801 in maniera simile alla clozapina, l'unico antipsicotico con un effetto marcato su questo tipo di sintomi.

Come già accennato, un grave problema degli antipsicotici in uso è la comparsa di effetti avversi di tipo extrapiramidale. Nell'insieme, gli inibitori delle PDE10A non hanno mostrato di indurre catalessia nel roditore, e allo stesso tempo non hanno aumentato i livelli di prolattina nel sangue. In aggiunta, non si è notato significativo aumento di peso nei modelli animali finora analizzati.

Per spiegare gli effetti farmacologici degli inibitori delle PDE10A, si è supposto che essi agiscano attivando entrambe le vie striatali dopaminergiche, in contrasto con gli antipsicotici classici come l'aloiperidolo, che attiva solo la via indiretta (D<sub>2</sub>).

#### 1.3.4. PDE10A nei disturbi del movimento.

Nel contesto biologico delle PDE10A, le patologie a carico del movimento da esaminare sono la corea di Huntington e il morbo di Parkinson.<sup>49</sup>

La Còrea di Huntington (HD) è una malattia neurodegenerativa genetica di tipo autosomico dominante, dovuta ad un'espansione anormale della tripletta CAG nel gene huntingtina (HTT).

Numerosi modelli animali hanno rivelato che, in tale patologia, l'espressione genica delle PDE10A risulta alterata. Inoltre, in alcuni casi di studi post-mortem i livelli di PDE10A risultano diminuiti. *Hebb et al.* sono stati i primi a suggerire che bassi livelli enzimatici di PDE10A possono contribuire ad una aberrante segnalazione da parte di cAMP e cGMP, e questo sfocerebbe in cambiamenti nelle funzioni cellulari che portano ai sintomi motori e psichiatrici tipici della corea di Huntington.<sup>50</sup>

Una visione opposta e, probabilmente, più valida (*Choi et al.*), suggerisce che, poiché ci sono alti livelli di PDE10A nei MSNs, e questi sono danneggiati nella patologia, gli inibitori delle PDE10A potrebbero giocare un ruolo neuroprotettivo. In particolare, un aumento della concentrazione di cAMP sembrerebbe "guidare" le vie di segnalazione regolate dal CREB, che sono alterate nella malattia.<sup>51</sup>

Il primo inibitore delle PDE10A utilizzato in modelli animali di HD è stato il TP-10. Oltre ad una riduzione nei sintomi della malattia, si è osservata una riduzione del danneggiamento cellulare a livello striatale, ed inoltre un aumento della fosforilazione della proteina CREB, a suggerire che un aumento della concentrazione di cAMP potrebbe rallentare la progressione della neurodegenerazione.<sup>52</sup>

Il morbo di Parkinson è una malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla perdita dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra*.<sup>53</sup> Ad oggi sappiamo però che tale patologia è di tipo multifattoriale, ed è caratterizzata dall'accumulo di una proteina, l' $\alpha$ -sinucleina, all'interno dei corpi di Lewy dei neuroni, e dall'insufficiente produzione di dopamina.<sup>54</sup> E' al terzo stadio che la patologia danneggia la *substantia nigra* con conseguente perdita neuronale, e si ha la comparsa dei sintomi: bradicinesia, tremore, rigidità posturale sono i principali. Sovente sono presenti anche disturbi di tipo neuro-psichiatrico, come psicosi, disturbi del sonno e

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

depressione maggiore, che possono comparire negli stadi precoci della malattia, prima dei disturbi di tipo motorio.<sup>55</sup>

La perdita degli inputs dopaminergici dalla *substantia nigra* al corpo striato provoca una serie di cambiamenti anatomici, chimici ed elettrofisiologici nei neuroni striatali, e ciò risulta in uno squilibrio tra il circuito eccitatorio e quello inibitorio.<sup>56</sup> Nello specifico, la perdita dei neuroni dopaminergici causa un'ipoattività a livello della via diretta, dovuta alla perdita della trasmissione corticostriatale dovuta ai recettori D<sub>1</sub>, ed un'iperattività nella via indiretta, dovuta alla perdita del tono inibitorio dei recettori D<sub>2</sub>. Tutto ciò sfocia in un'alterazione del sistema di segnalazione cAMP-dipendente, in un' aumento della trasmissione glutamatergica (per quanto riguarda la via indiretta) e in un'alterata funzionalità dei recettori NMDA.<sup>57</sup>

Vari trattamenti agiscono sulla malattia modulando la trasmissione dopaminergica a livello del corpo striato, provocando una temporanea regressione dei sintomi, ma questi non costituiscono una vera e propria cura per il PD. La somministrazione prolungata di levodopa, precursore della dopamina, induce infatti discinesie, ovvero dei movimenti incontrollati che riducono la qualità di vita del paziente. Da qui l'esigenza di nuovi trattamenti non dopamino-correlati.

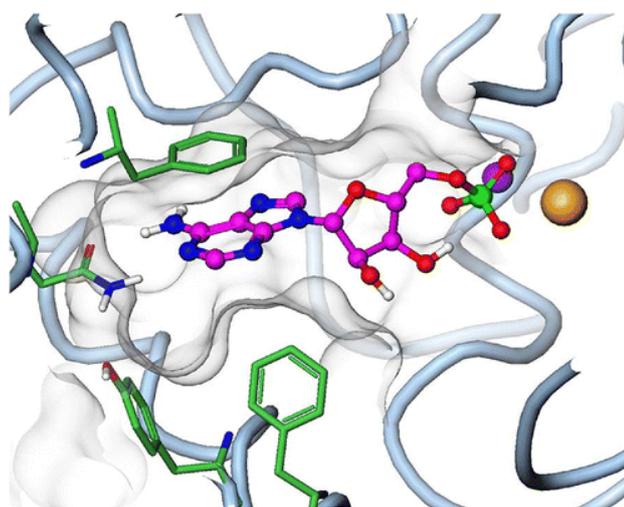
La quantificazione dei livelli di nucleotidi ciclici in ratti con discinesia indotta da levodopa ha mostrato che tali livelli, sia per quanto riguarda il cAMP che il cGMP, sono ridotti nella corteccia, nel corpo striato e nel *globus pallidus*.<sup>58</sup> Sorprendentemente, il pre-trattamento degli animali con inibitori delle PDE5, 6, 9, 10 ha ridotto gli effetti della discinesia indotta da levodopa. Questo suggerisce che l'inibizione delle PDE, con conseguente aumento delle concentrazioni dei nucleotidi ciclici, può dare beneficio ai pazienti con PD. La localizzazione peculiare delle PDE10A fa sì che l'uso di un inibitore può non solo evitare l'abbassamento dei livelli dei nucleotidi ciclici, ma permettere di prolungare il trattamento del paziente con levodopa, se cosomministrato con quest'ultima.

### 1.3.5. Sito catalitico delle PDE10A e progettazione di inibitori.

Per lo sviluppo di nuovi e potenti inibitori delle PDE10A, sono utili le tecniche di structure based drug design (SBDD).

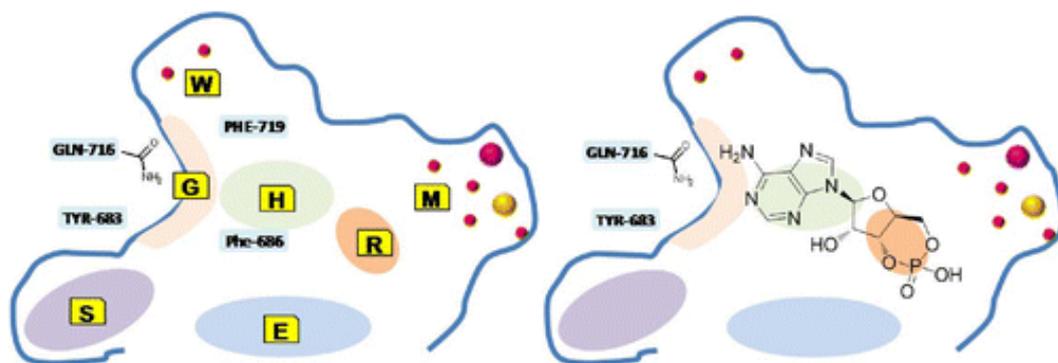
La struttura del sito catalitico delle PDE10A é nota alla comunità scientifica dal 2005.<sup>59</sup> Nel 2008 é stata invece resa nota la struttura cristallina del dominio GAF-B dell'enzima complessato con il cAMP.<sup>60</sup>

Queste scoperte hanno reso possibile lo studio del sito attivo dell'enzima in complesso con i suoi due substrati (cAMP e cGMP) o con i loro prodotti di idrolisi (AMP e GMP) come rappresentato in figura 13.



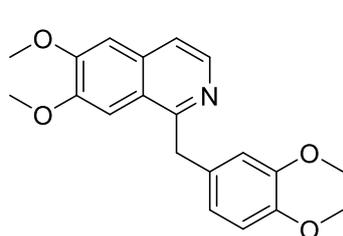
**Figura 14:** AMP co-cristallizzato nel sito catalitico della PDE10A (da Chappie et al., 2012)

La scoperta della papaverina quale inibitore delle PDE10A ha permesso di studiare approfonditamente il sito catalitico dell'enzima co-cristallizzato con svariati altri inibitori. E' stato quindi possibile individuare gli elementi utili per la progettazione di nuovi farmaci, come mostrato in figura 14. Risulta semplice distinguere un sito di interazione con la Glutamina 716 (G), una tasca di selettività (S), una tasca idrofobica (H), due molecole residue di acqua (W), un sito di interazione con il metallo (M), la regione di interazione con il ribosio (R) e una regione di "exo-binding", al di fuori del sito attivo (E).<sup>61</sup>

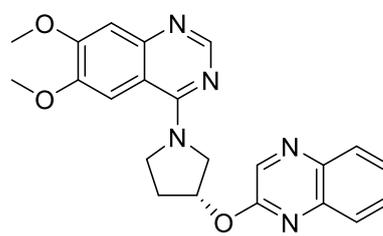


**Figura 15:** Rappresentazione bidimensionale delle regioni utili per lo sviluppo di inibitori delle PDE10A (a sinistra) e rappresentazione del substrato endogeno (cAMP) legato all'enzima. (da Chappie *et al.*, 2012)

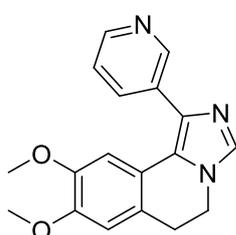
I primi inibitori sintetizzati (Papaverina e congeneri, illustrati in figura)<sup>62,63,64</sup> interagiscono con l'enzima grazie alla presenza di un *core* dialcossibiarilico, il quale instaura legami idrogeno tra i due gruppi alcossilici e la Gln716, e interazioni idrofobiche tra il sistema biarilico planare e la tasca idrofobica presente nel sito attivo.<sup>65,66,67</sup>



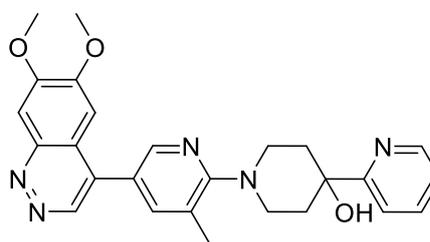
**Papaverina**  
PDE10A IC<sub>50</sub>: 18 nM



**PQ10, Pfizer**  
PDE10A IC<sub>50</sub>: 6nM



**Composto 1 (Merck)**  
PDE10A IC<sub>50</sub>: 29 nM



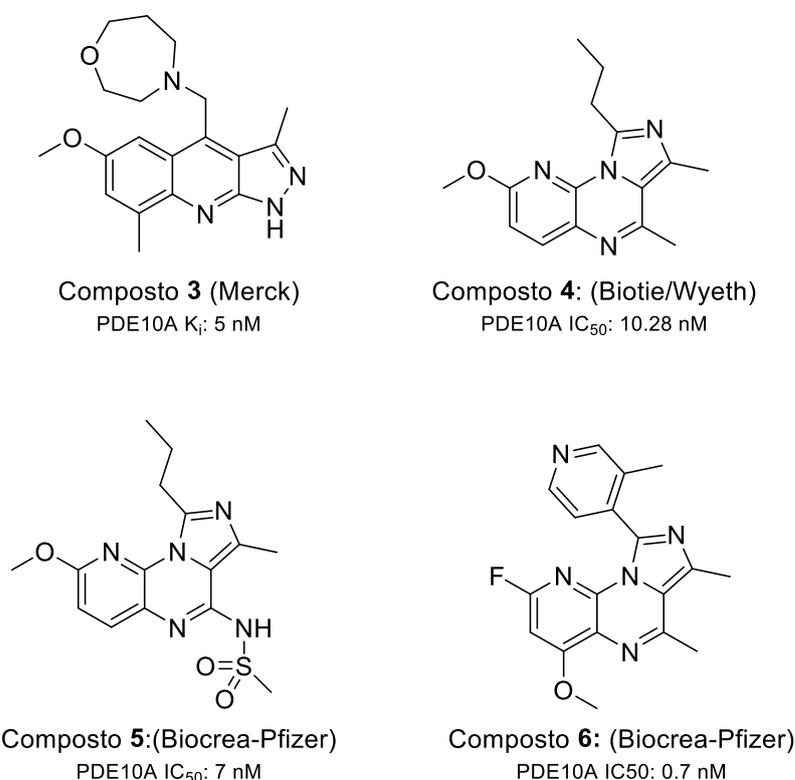
**Composto 2 (Amgen)**  
PDE10A IC<sub>50</sub>: 4.9 nM

**Figura 16:** Derivati a *core* dialcossibiarilico

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Tutte le ottimizzazioni strutturali ispirate a *leads* dialcossibiarilici non hanno avuto un grande riscontro a causa della scarsa selettività isoenzimatica nei confronti della PDE10A, soprattutto se confrontata con l'affinità dei derivati papaverinici verso le PDE3.

Sono stati sviluppati comunque dei *glutamine binders* a struttura alternativa, identificando svariati composti che hanno mostrato un'elevata affinità e selettività verso le PDE10A, grazie all'interazione con un residuo di acqua presente nel sito catalitico.<sup>68,69,70</sup>

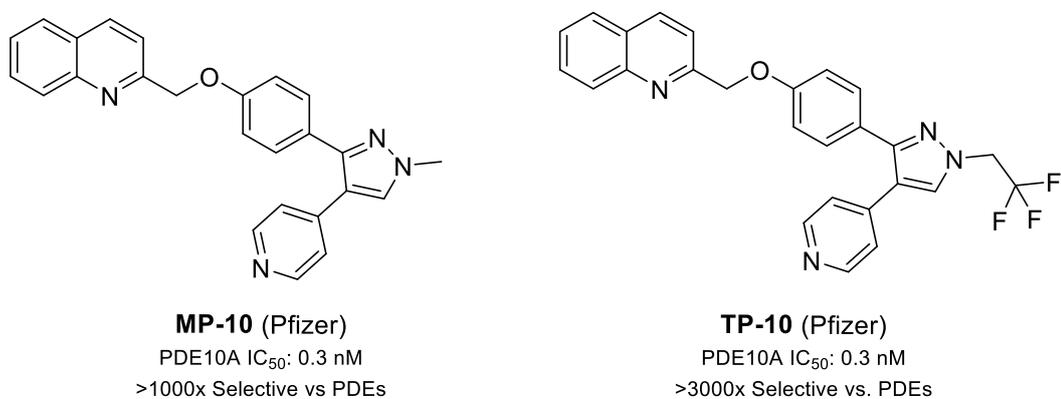


**Figura 17:** Esempi di *glutamine binders*

Presso la Pfizer, si è cercato di trovare un modello di binding alternativo a quello che sfrutta esclusivamente il legame con la glutammina, identificando nei *tyrosine binders* una nuova classe di inibitori. Questi instaurano un legame idrogeno tra gruppi elettron accettori e il gruppo -OH tirosinico dell'enzima. Il residuo tirosinico Tyr683 esiste esclusivamente nelle PDE10A e nelle PDE2A.

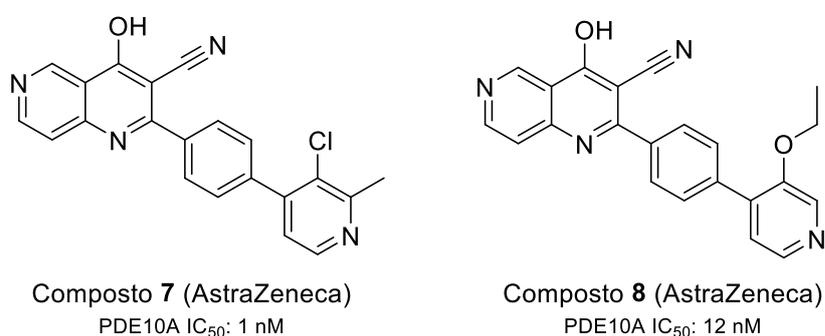
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Sfruttando inoltre la presenza, nel sito catalitico, della “selectivity pocket”, si é giunti ad inibitori con eccellenti profili di selettività (MP10 e TP10)<sup>71,72</sup>.



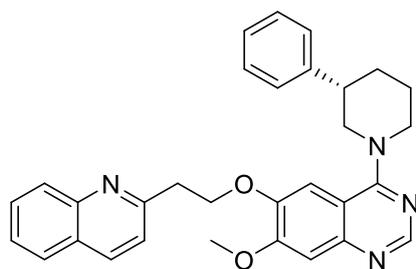
**Figura 18:** Esempi di *Tyrosine binders*

Una seconda famiglia di “*tyrosine binders*” é stata identificata nelle strutture a *core* 1,6-naftiridinico, il quale riveste una funzione analoga al *core* chinolinico del MP10.<sup>73</sup>

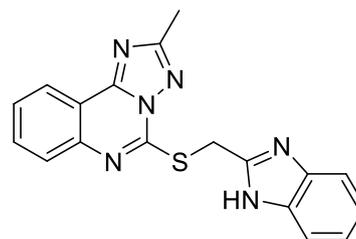


**Figura 19:** *Tyrosine binders* a *core* 1,6-naftiridinico

Infine, fondendo le caratteristiche strutturali dei *glutamine binders* con quelle dei *tyrosine binders*, si é giunti all’identificazione di strutture di tipo misto, le quali presentavano elevate affinità e selettività verso le PDE10A. Riconosciamo tali caratteristiche in alcuni dei composti sintetizzati dalla Pfizer e dalla Lundbeck.<sup>74,75</sup>



Composto **9** (Pfizer)  
PDE10A IC<sub>50</sub>: 12nM



Composto **10** (Lundbeck)  
PDE10A IC<sub>50</sub>=12 nM  
>1000x Selective vs PDEs

Figura 20: Dual glutamine-tyrosine binders

Proprio nella struttura **10** della Lundbeck è stato individuato un potente e selettivo inibitore delle PDE10A. Un'analisi ai raggi X di tale composto co-cristallizzato con il sito di legame dell'enzima ha rivelato che l'azoto in posizione 1 della [1,2,4]triazolo[1,5-c]chinazolina non sembrava partecipare nell'interazione con l'enzima, e poteva quindi essere utilmente rimpiazzato con un atomo di carbonio, migliorando le proprietà fisico-chimiche della molecola con una diminuzione della *Polar Surface Area* (PSA), che rappresenta un parametro critico per l'ottenimento di composti con un'elevata biodisponibilità, ed in particolare atti a permeare la barriera ematoencefalica.

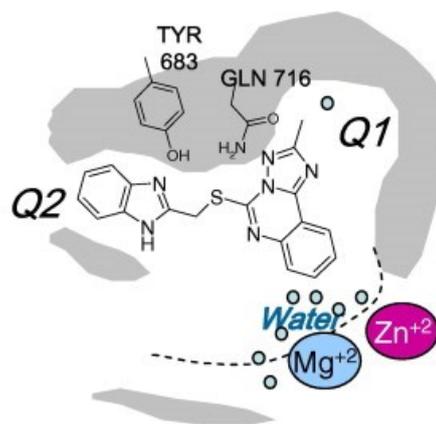
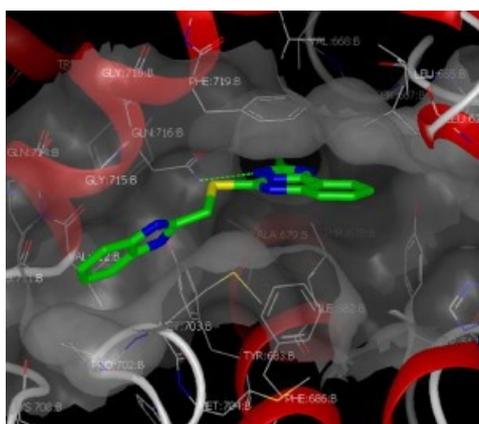
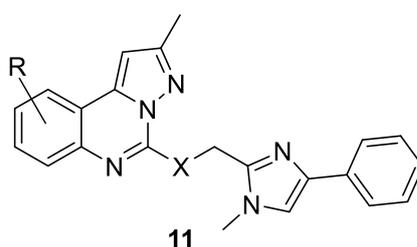


Figura 21: Struttura ai raggi X del composto **10** e sue interazioni con il sito catalitico della PDE10A (da *Asproni et al.*, 2011)

Un'altra intuizione derivata da tale analisi cristallografica è stata quella di rimpiazzare la catena laterale benzimidazolica con una struttura flessibile di tipo fenilimidazolico.

In questo contesto sono quindi state sintetizzate dal gruppo di ricerca coordinato dalla dott.ssa Asproni del Dipartimento di Chimica e Farmacia di Sassari, nuove strutture a piattaforma fenilimidazolo-pirazolo[1,5-c]chinazolinica (**11a-q**), le quali hanno mostrato buoni valori di IC<sub>50</sub>, come riportato nella tabella seguente.<sup>76</sup>

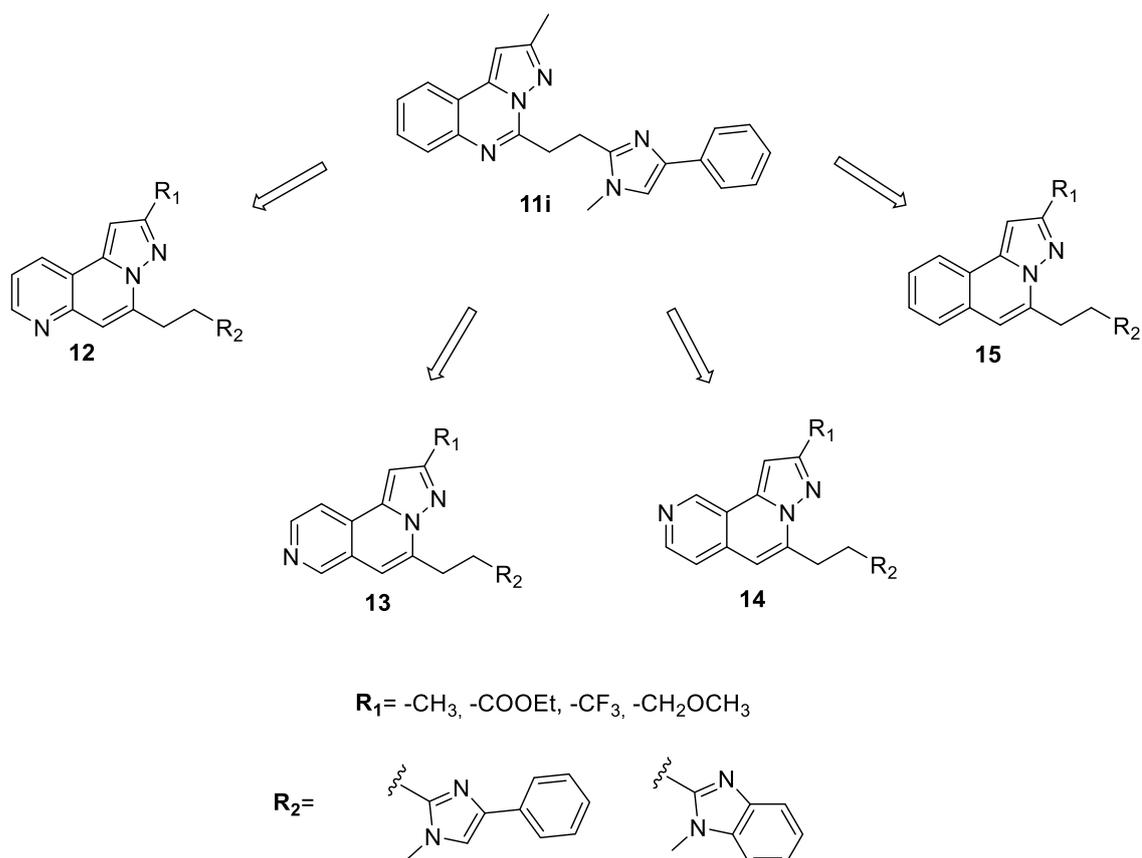
**Tabella 2:** Derivati a piattaforma fenilimidazolo-pirazolo[1,5-c]chinazolinica



Cpd	X	R	PDE10A IC <sub>50</sub> (nM)
11a	S	H	48
11b	S	7-Cl	73
11c	S	8-Cl	130
11d	S	9-Cl	110
11e	S	7-OCH <sub>3</sub>	83
11f	S	8-OCH <sub>3</sub>	100
11g	S	7-CH <sub>3</sub>	160
11h	S	9-CH <sub>3</sub>	76
11i	CH <sub>2</sub>	H	50
11j	CH <sub>2</sub>	7-Cl	52
11k	CH <sub>2</sub>	8-Cl	50
11l	CH <sub>2</sub>	9-Cl	16
11m	CH <sub>2</sub>	7-OCH <sub>3</sub>	37
11n	CH <sub>2</sub>	8-OCH <sub>3</sub>	31
11o	CH <sub>2</sub>	9-OCH <sub>3</sub>	430
11p	CH <sub>2</sub>	7-CH <sub>3</sub>	78
11q	CH <sub>2</sub>	9-CH <sub>3</sub>	16

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Sulla base dei risultati ottenuti, e nel tentativo di ampliare gli studi SAR, lo stesso gruppo di ricerca ha portato a termine la sintesi di nuove strutture a piattaforma pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridinica (**12**), pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridinica (**13**), pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridinica (**14**) e pirazolo[5,1-*a*]isochinolinica (**15**), le quali hanno mostrato valori di IC<sub>50</sub> compresi tra 40 e 1300 nM.<sup>77</sup>

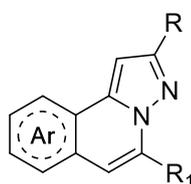


**Schema 1:** Strutture a piattaforma pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridinica (**12**), pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridinica (**13**), pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridinica (**14**) e pirazolo[5,1-*a*]isochinolinica (**15**)

Nell'ambito di questa tesi di dottorato si è scelto, nel corso del primo anno, di sintetizzare nuove piattaforme tricicliche secondo un processo di semplificazione molecolare (*stepping down*). Tali piattaforme recano, in luogo della catena laterale benzimidazolica e fenilimidazolica, un atomo di idrogeno, una catena alifatica (*n*-butile), una alcossilica (metossimetilene) ed una di tipo aromatico (fenile), per verificare l'effetto del sostituente sulla piattaforma pirazolo-naftiridinica e pirazolo-isochinolinica.

Sono quindi state sintetizzate le strutture **16a-d** e **17a-g** elencate in tabella.

**Tabella 3:** strutture a piattaforma pirazolo[5,1-*a*]isochinolinica e pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridinica



**16-17**

Cpd	Ar	R	R <sub>1</sub>
<b>16a</b>		-COOEt	-Ph
<b>16b</b>		-COOEt	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
<b>16c</b>		-CH <sub>3</sub>	-Ph
<b>16d</b>		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
<b>17a</b>		-COOEt	-Ph
<b>17b</b>		-COOEt	-H
<b>17c</b>		-COOEt	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
<b>17d</b>		-COOEt	-nBu

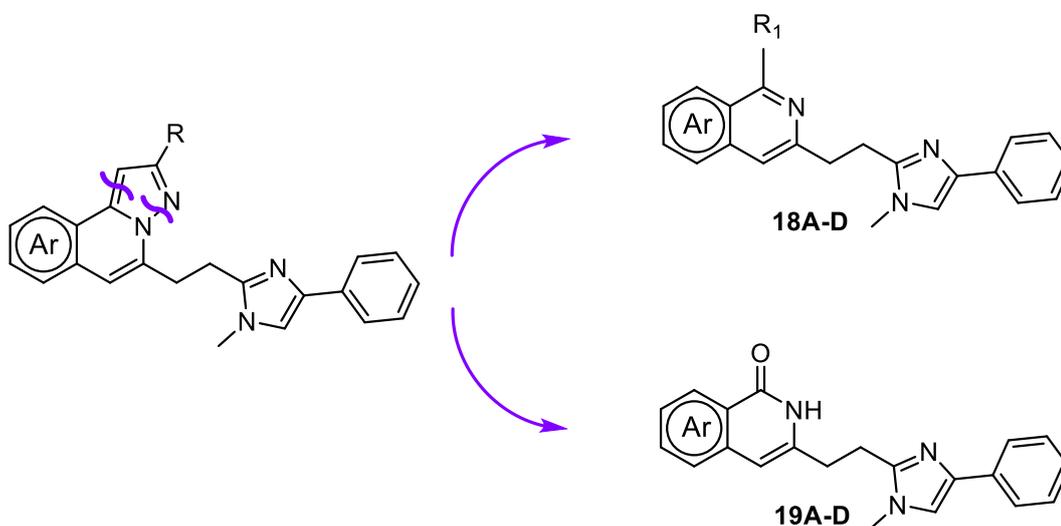
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

17e		-CH <sub>3</sub>	-Ph
17f		-CH <sub>3</sub>	-H
17g		-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>

Nello stesso contesto si è poi deciso di semplificare ulteriormente la piattaforma tricyclica riducendola ad una biciclica di tipo 1,6-naftiridinico (**18A**), 2,6-naftiridinico (**18B**), 2,7-naftiridinico (**18C**) e 1,7-naftiridinico (**18D**), come mostrato in tabella 4.

In aggiunta, sono state sintetizzate 4 ulteriori strutture a scaffold naftiridinonico (**19A-D**, Tabella 5).

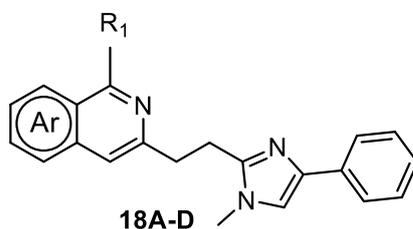
In ogni caso, si è mantenuta la catena laterale di tipo fenilimidazolico, come nello schema illustrato di seguito:



**Schema 2:** approccio di semplificazione molecolare utilizzato

Si sono quindi sintetizzate le strutture elencate nelle tabelle 4 e 5:

**Tabella 4:** strutture a piattaforma 1,6-naftiridinica, 2,6-naftiridinica, 2,7-naftiridinica e 1,7-naftiridinica

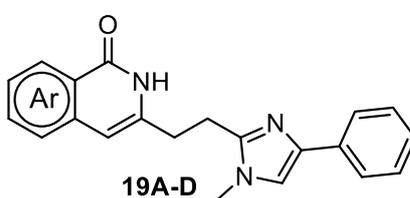


Cpd	Ar	R1
18Aa		-Cl
18Ab		-OCH <sub>3</sub>
18Ac		-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
18Ad		-CH <sub>3</sub>
18Ba		-Cl
18Bb		-OCH <sub>3</sub>
18Bc		-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
18Bd		-CN
18Ca		-Cl
18Cb		-OCH <sub>3</sub>

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

18Cc		-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
18Da		-Cl
18Db		-OCH <sub>3</sub>

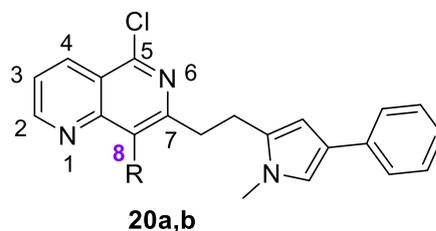
**Tabella 5:** strutture a piattaforma naftiridinonica



Cpd	Ar
19A	
19B	
19D	
19D	

Nel tentativo di funzionalizzare un'ulteriore posizione, si è infine proceduto alla sintesi di derivati recanti un sostituito di tipo aromatico in posizione 8 della 1,6-naftiridina (**20a, b**) come illustrato in tabella 6.

**Tabella 6:** derivati 8-sostituiti

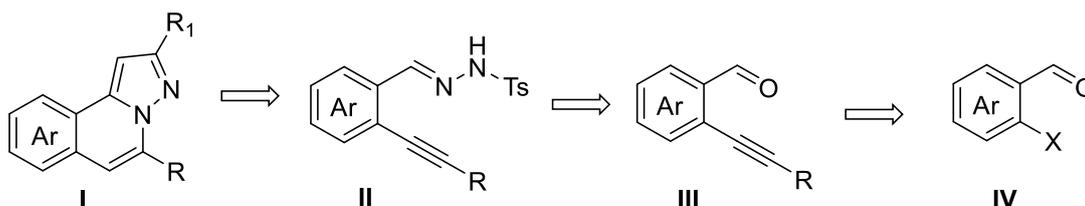


Cpd	R
20a	
20b	

# Capitolo 2

## Chimica

La progettazione delle molecole a struttura tricyclica ha utilizzato l'approccio retrosintetico di seguito illustrato (Schema 3), che prevedeva la ciclizzazione a pirazolonaftiridina o pirazoloisochinolina (**I**) passando per l'intermedio idrazonico (**II**). Questo poteva essere semplicemente ottenuto a partire dalla *o*-alchinilaldeide (**III**) la quale, a sua volta, poteva essere isolata a partire dalla *o*-alogenoaldeide (**IV**) corrispondente.

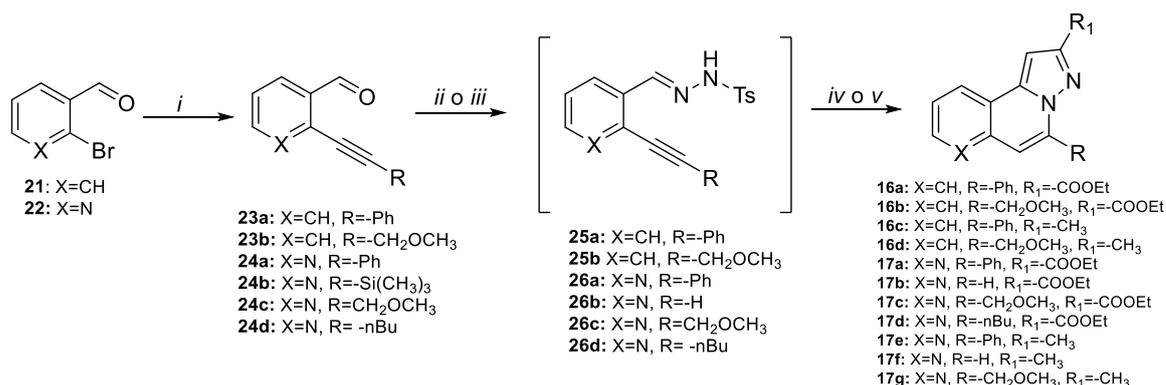


**Schema 3:** analisi retrosintetica per le piattaforme pirazolonaftiridiniche e pirazoloisochinolinarie

Come descritto nello schema 4, la reazione di Sonogashira fra l'*o*-alogenoaldeide **21** o **22** e l'alchino terminale desiderato (fenilacetilene per **23a** e **24a**, trimetilsilil acetilene per **24b**, metil propargil etere per **23b** e **24c**, 1-esino per **24d**) ha fornito con buone rese le *o*-alchinilaldeidi.

L'aldeide è stata quindi fatta reagire con *p*-tosilidrazide in presenza di argento triflato (AgOTf) e DL-prolina (DL-Pro). L'idrazone ottenuto, non isolato, è stato fatto reagire con acetone o etil piruvato e quindi addizionato di carbonato di sodio, per dare le desiderate strutture tricycliche.

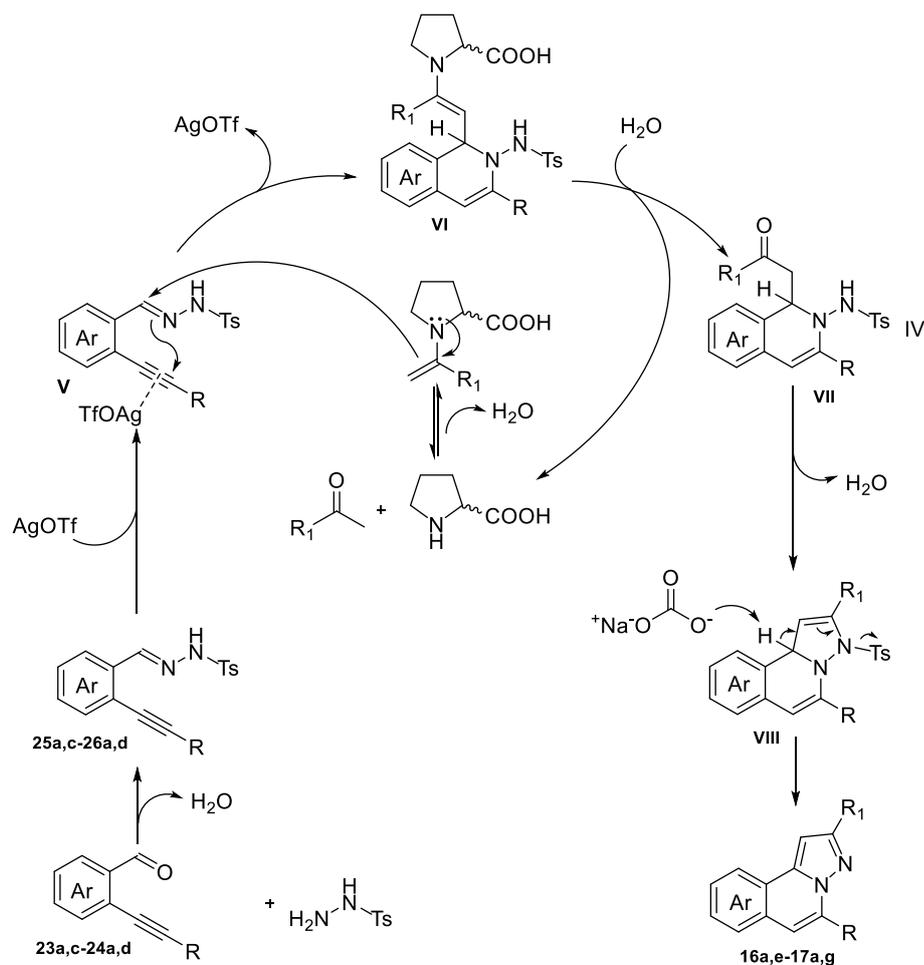
I tricyclic recanti la funzione trimetilsililica non sono stati isolati, poiché la presenza nella miscela di reazione del carbonato di sodio in etanolo ha permesso la desililazione, e quindi l'ottenimento di **17b** e **17f** senza la necessità di ulteriori passaggi.



**Schema 4**

**Reagenti e condizioni:** *i*) alchino, Cul, Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, MW 50 °C, 30'; *ii*) *p*-TsNHNH<sub>2</sub>, AgOTf, DL-Pro, EtOH anidro, t.a., 20'; *iii*) *p*-TsNHNH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro, t.a. 45'; *iv*) etil piruvato o acetone, mw 50 °C, quindi Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 °C, 1h; *v*) AgOTf, mw 70 °C, 1h, quindi etil piruvato o acetone, DBU, 50 °C, 2-8h

Nel dettaglio, la sequenza di reazioni illustrata segue una strategia di sintesi *one pot* precedentemente sviluppata (Schema 5),<sup>77</sup> che prevede un meccanismo di reazione dove la DL-prolina attiva il metilchetone (acetone o etil piruvato) convertendolo nell'enammina. L'argento triflato attiva il triplo legame mentre l'enammina può facilmente attaccare il carbonio idrazonico generando l'intermedio **VI**, il quale, perdendo prolina, evolve nella struttura chetonica **VII**. Quest'ultima, per disidratazione, fornisce il diidropirazolo **VIII** che, per trattamento con carbonato di sodio, aromatizza con la fuoriuscita del gruppo tosilico.

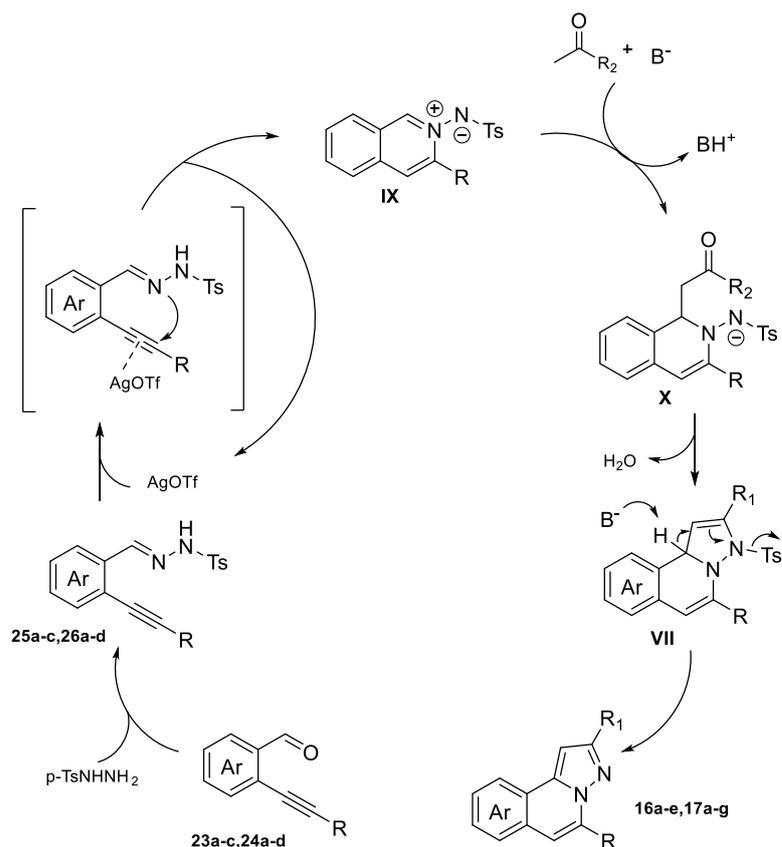


**Scheme 5:** meccanismo di reazione *one-pot* via AgOTf/DL-Pro

In aggiunta, al fine di migliorare le rese nella realizzazione dei tricycl, gli stessi sono stati sintetizzati secondo un'altra strategia *one pot* che non prevedeva l'utilizzo della DL-prolina e utilizzava, come base, il 1,5-diazabicyclo(5.4.0)undec-5-ene (DBU).<sup>78</sup>

Sono quindi stati utilizzati 1.1 equivalenti di *p*-tosilidrazide, AgOTf in concentrazione pari al 10%, 3 equivalenti di DBU e 5 equivalenti di metilchetone, utilizzando come solvente il diclorometano (Schema 4, fasi iii e v).

In questo caso il meccanismo di reazione prevede la formazione dell'intermedio IX, il quale subisce l'attacco del metilchetone nella sua forma enolica generata *in situ*, con conseguente ciclizzazione ed aromatizzazione, come illustrato nello schema 6.

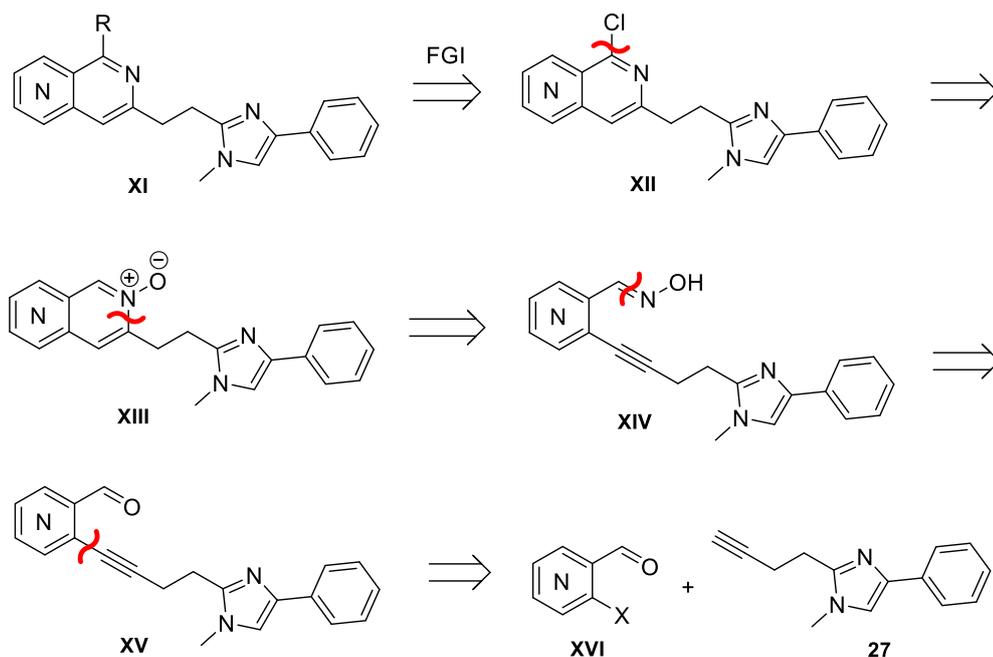


**Schema 6:** meccanismo di reazione via AgOTf/DBU

E' interessante notare come, in generale, la strategia di sintesi che prevede l'utilizzo della DL-prolina si sia rivelata, in termini di rese, sicuramente più utile, pur non notando differenze sostanziali per quanto riguarda la realizzazione delle piattaforme pirazolonaftiridiniche.

Per i dettagli sulle rese si rimanda alla parte sperimentale della tesi.

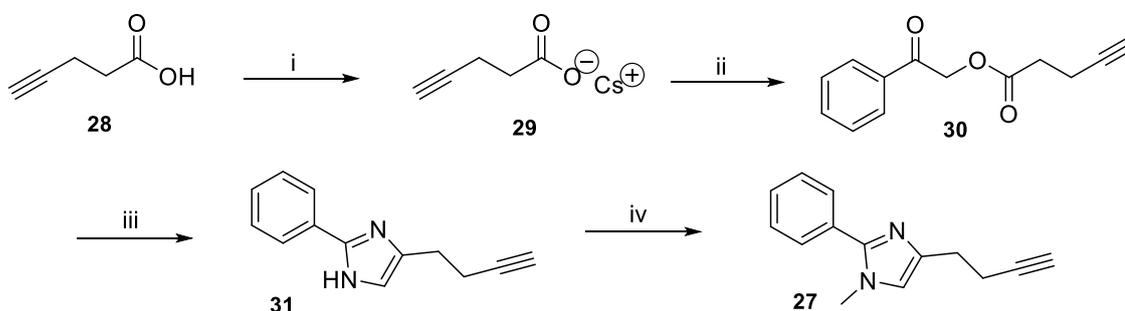
Per quanto riguarda la realizzazione dei derivati a struttura naftiridinica, l'analisi retrosintetica illustrata nello schema 7 mostra un'inversione di gruppo funzionale che permette la realizzazione di svariati composti a partire dal cloroderivato intermedio **XII**. Questo può essere ottenuto per rimozione dell'*N*-ossido **XIII** derivante dalla ciclizzazione dell'ossima **XIV**, ottenibile a sua volta dall'alchinilaldeide **XV**.<sup>79</sup> Quest'ultima può essere sintetizzata tramite reazione di *coupling* tra un'*o*-alogenoaldeide e il 2-(3-butilil)-1-metil-4-fenil-1*H*-imidazolo (**27**).



**Schema 7:** analisi retrosintetica per le piattaforme a struttura naftiridinica

Lo schema 8 mostra la sintesi della catena laterale 2-(3-butinil)-1-metil-4-fenil-1*H*-imidazolica (**27**). È stato utilizzato come prodotto di partenza l'acido 4-pentinoico (**28**), commercialmente disponibile. Questo è stato fatto reagire con carbonato di cesio a dare il corrispondente sale (**29**), il quale, addizionato di fenacilbromuro, ha fornito il chetoestere (**30**), usato come tale nello step successivo di ciclizzazione con acetato d'ammonio in xilene per fornire il fenilimidazolo **31**.

Dopo purificazione tramite flash cromatografia, il composto è stato deprotonato con idruro di sodio e quindi metilato con ioduro di metile a basse temperature per dare la catena laterale desiderata **27**.<sup>77</sup>



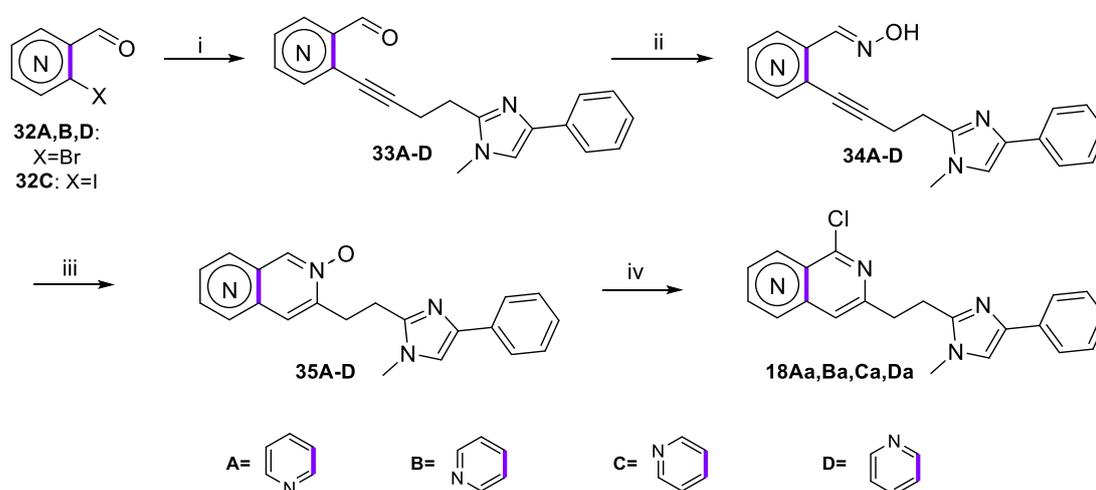
**Schema 8**

**Reagenti e condizioni:** i)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 1h; ii) fenacil bromuro, DMF anidra, t.a., 15'; iii)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , xilene, riflusso, overnight; iv) NaH, THF anidro,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , 30', quindi  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , 5h

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

Come mostrato nello schema 9, la sintesi dei cloroderivati intermedi è partita dalle *o*-alogenoaldeidi **32A,B,D**, disponibili in commercio, o **32C**, sintetizzata secondo letteratura,<sup>77</sup> che sono state sottoposte a reazione di *coupling* in condizioni di Sonogashira per dare le *o*-alchinilaldeidi corrispondenti (**33A-D**). Queste sono state convertite nelle ossime (**34A-D**) utilizzando idrossilammina cloridrato e acetato di sodio, che sono quindi state fatte reagire con carbonato di potassio per dare i corrispondenti *N*-ossidi (**35A-D**), idrolizzati in presenza di POCl<sub>3</sub> per dare gli intermedi chiave desiderati **18Aa, Ba, Ca e Da**.

I cloroderivati sono stati ottenuti in rese variabili a seconda dell' aldeide utilizzata.



**Schema 9**

**Reagenti e condizioni:** i) 2-(3-butinil)-1-metil-4-fenil-1*H*-imidazolo, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, mw 50 °C; ii) NH<sub>2</sub>OH·HCl, AcONa, EtOH anidro, t.a.; iii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, t.a.; iv) POCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 60 °C

I cloroderivati sono stati quindi sottoposti a diverse reazioni nel tentativo di ottenere i derivati sostituiti con vari gruppi.

Il cloro è stato sostituito con funzioni di tipo alcossilico (metossile, etossile), con una funzione nitrilica e con un gruppo metilico. L'intermedio è stato inoltre idrolizzato per ottenere una funzione carbonilica di tipo lattamico.

Per le sostituzioni con il metossile e l'etossile il prodotto di partenza è stato addizionato ad una soluzione di metossido o etossido di sodio generata *in situ* con sodio metallico, e le reazioni sono state portate alla temperatura di riflusso per circa 4

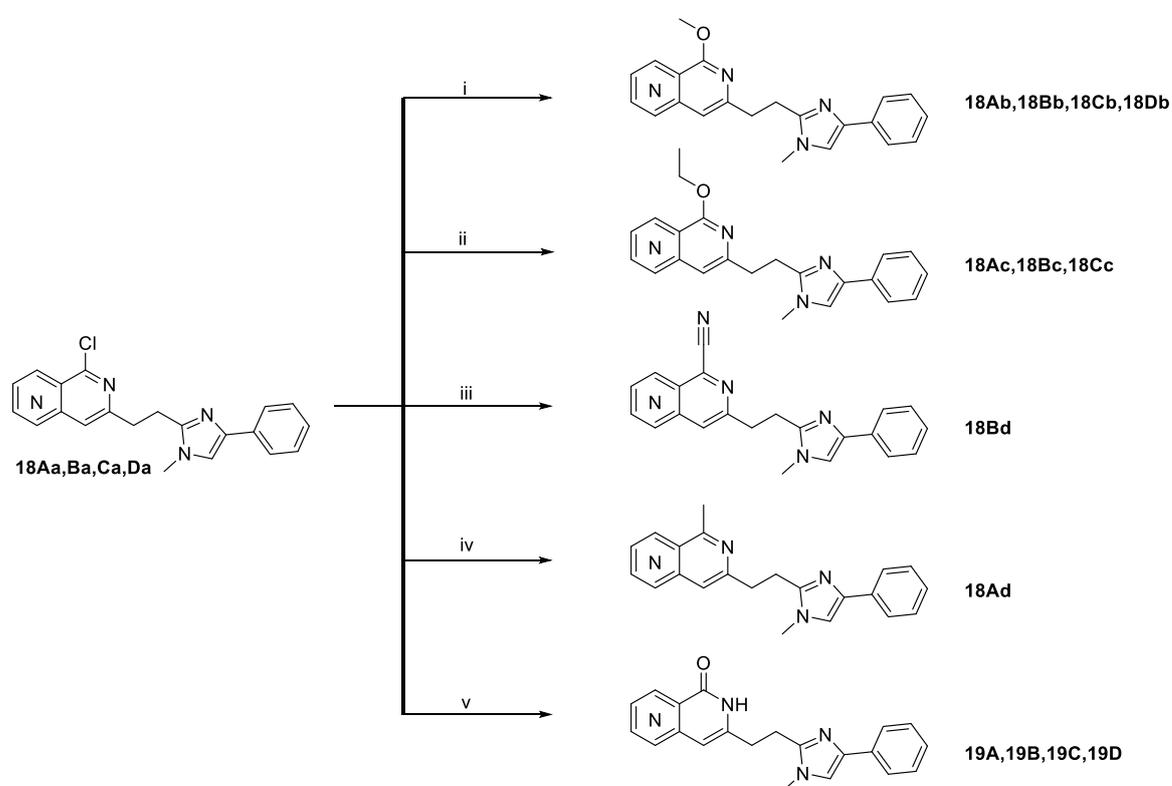
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

ore, ottenendo i derivati con rese variabili (**18Ab**, **18Bb**, **18Cb**, **18Db**, **18Ac**, **18Bc**, **18Cc**).

Per quanto riguarda l'introduzione del gruppo nitrilico si è proceduto semplicemente aggiungendo sodio cianuro ad una soluzione del prodotto di partenza in DMF (**18Bd**).

Il derivato metilico (**18Ad**) è invece stato realizzato facendo reagire il cloderivato con il reattivo di Grignard in condizioni di reazione di Kumada, utilizzando come catalizzatore il (1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocene)palladio(II) dicloruro.

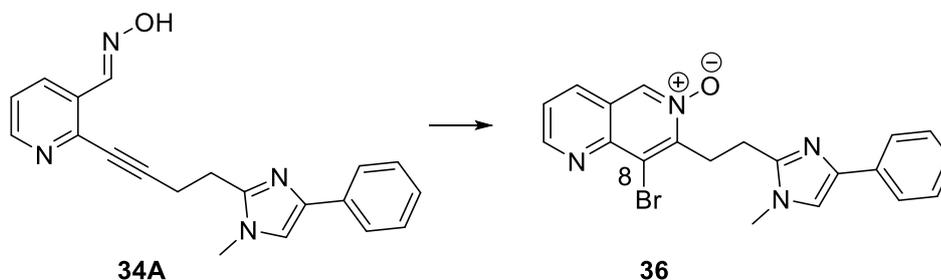
Per l'idrolisi a naftiridinone (**19A**, **19B**, **19C**, **19D**) si è scelto di procedere utilizzando acetato d'ammonio in acido acetico glaciale a 100 °C (Schema 10).



**Schema 10**

**Reagenti e condizioni:** i) Na<sup>0</sup>, CH<sub>3</sub>OH anidro, refluxo, 4h; ii) Na<sup>0</sup>, EtOH anidro, refluxo, 3h; iii) NaCN, DMF, 60 °C, 6h; iv) CH<sub>3</sub>MgBr, PdCl<sub>2</sub>(dppfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), THF anidro, t.a., 4h

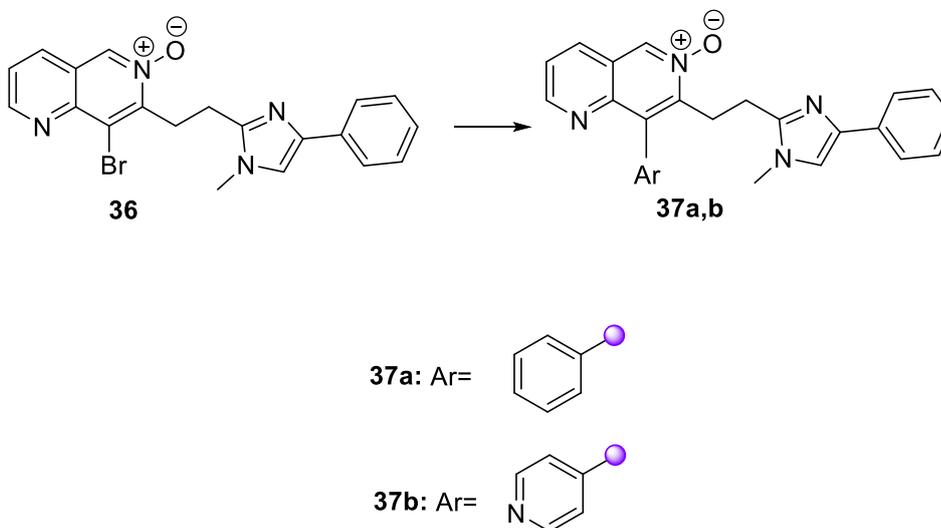
Procedendo con l'ottimizzazione della sintesi e nel tentativo di funzionalizzare un'ulteriore posizione, si è attuata una diversa via sintetica che ha permesso, partendo dall'ossima **34A**, di ottenere in un unico passaggio l'*N*-ossido **36** bromurato in posizione 8 dell'anello piridico, come evidenziato nello schema seguente:



**Schema 11**

**Reagenti e condizioni:** *N*-bromosuccinimide, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0° → t.a, 2h.

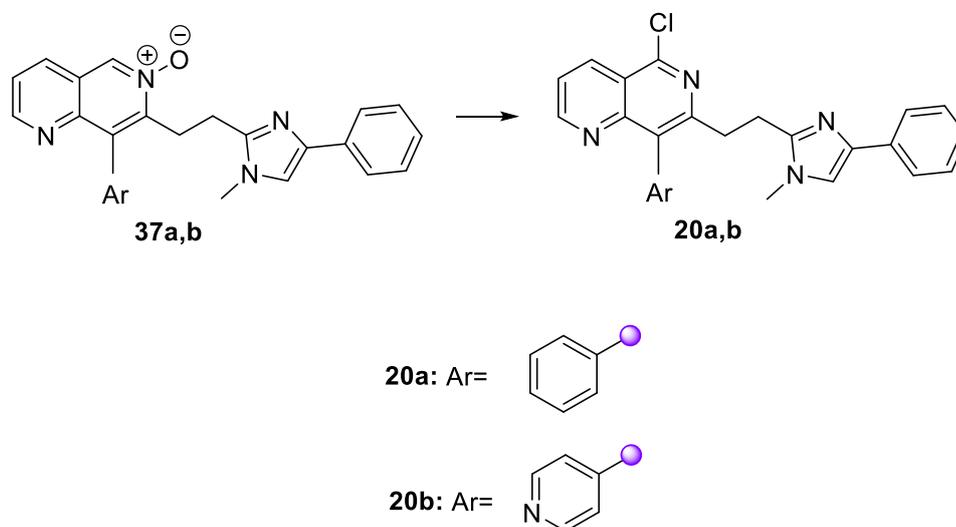
L'*N*-ossido **36** è stato poi sottoposto a reazione di Suzuki per dare i derivati arilsostituiti **37a-b** (Schema 12):



**Schema 12**

**Reagenti e condizioni:** acido fenilboronico o 4-piridilboronico, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, toluene, EtOH, H<sub>2</sub>O, mw, 100 °C, 6h

Si è infine rimosso l'*N*-ossido con POCl<sub>3</sub> in analogia alla sequenza di reazioni già vista, giungendo alla realizzazione dei prodotti illustrati di seguito (Schema 13):



**Schema 13**

**Reagenti e condizioni:** POCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 60°C, 6h

# Capitolo 3

## Biologia

## Risultati biologici.

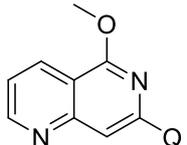
Alcune delle molecole sintetizzate durante il periodo di tesi sono state inviate alla società A/S Lundbeck, con sede a Copenhagen, per la valutazione dell'inibizione enzimatica nei confronti della Fosfodiesterasi 10A.

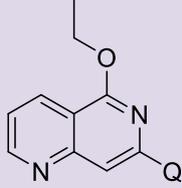
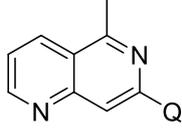
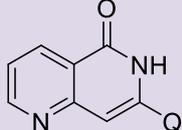
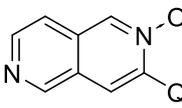
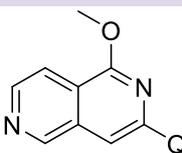
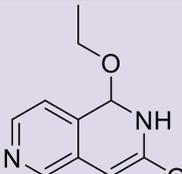
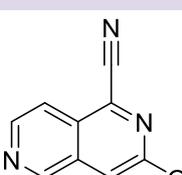
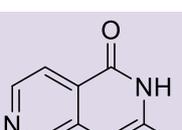
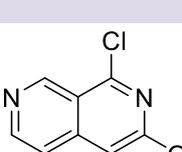
La capacità dei derivati di inibire l'attività idrolitica della PDE10A è stata misurata utilizzando cAMP marcato con trizio in un sistema denominato SPA (Scintillation Proximity Assay), il quale impiega delle microscopiche perle di silicato di ittrio. Il saggio si basa sul fatto che il cAMP mostra una bassa affinità per il silicato di ittrio, mentre il suo prodotto di idrolisi (5'-AMP) presenta un'affinità elevata. Misurando quindi la radioattività residua delle perle di silicato si può stabilire quantitativamente l'inibizione da parte delle molecole in esame nei confronti dell'enzima.

E' stata quindi calcolata la capacità inibente delle molecole e la tabella 7 mostra i valori di IC<sub>50</sub>.

I saggi effettuati, seppure al momento parziali, mostrano come lo scaffold 1,6-naftiridinico sia un più potente inibitore della PDE10, se rapportato a quello 2,6-naftiridinico e 1,7-naftiridinico. Tra le sostituzioni apportate al *core* 1,6-naftiridinico, l'etossile conferisce alla molecola **18Ac** la maggiore capacità inibente.

**Tabella 7:** Valori di IC<sub>50</sub> per le molecole testate.

Cpd	PDE10, IC <sub>50</sub> (nM)	PDE10 %inhib@10000 nM
<b>18Aa</b> 	40	105
<b>18Ab</b> 	53	105

18Ac		24	105
18Ad		nt	-
19A		nt	-
35B		-	27
18Ba		180	104
18Bb		110	105
18Bc		nt	-
18Bd		nt	-
19B		-	68
18Ca		nt	-

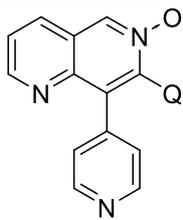
Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

18Cb		nt	-
18Cc		nt	-
19C		nt	-
35D		-	16
18Da		72	105
18Db		120	104
19D		-	59
37a		-	24
20a		1300	94

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

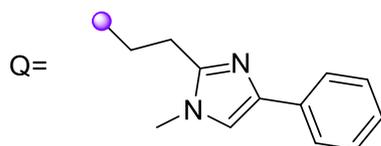
37b



-

70

---



nt= non ancora testate

## **Capitolo 4:**

# **Parte sperimentale**

## 4.1. Chimica

### PROCEDURE GENERALI.

I punti di fusione venivano determinati con l'apparecchio Köfler e non sono corretti.

Per la cromatografia su strato sottile venivano utilizzate lastre di gel di silice del tipo Poligram® SIL N-HR/HV254.

I composti erano purificati per triturazione da opportuni solventi o per flash cromatografia (FC) su gel di silice (SiO<sub>2</sub>) Merck® 60 (230-400 mesh ASTM), eluendo con miscele appropriate di solventi.

Gli spettri infrarossi (IR) venivano registrati in emulsione con nujol su lenti di NaCl, utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT/IR 460 plus e gli assorbimenti venivano indicati in numero d'onda  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>).

Le masse venivano registrate utilizzando l'apparecchio AB Sciex 4000 QTRAP LC-MS per infusione diretta.

Gli spettri NMR venivano registrati a temperatura ambiente con uno spettrofotometro tipo Bruker Avance III 400 Nanobay (frequenza operativa canale del protone: 400.13 MHz, frequenza operativa canale del carbonio 100.6 MHz) e usando come standard interno il TMS. I chemical shifts erano espressi in unità  $\delta$ /ppm e le costanti di accoppiamento J in Hz. Le molteplicità venivano indicate come: s (singoletto), brs (singoletto allargato), d (doppietto), dd (doppio doppietto), t (tripletto), dt (doppio tripletto), q (quadrupletto), quin (quintupletto), sxt (sestupletto), m (multipletto).

I dati spettroscopici concordavano con le strutture attribuite.

Tutte le reazioni che impiegavano reagenti sensibili all'aria o all'umidità venivano eseguite in atmosfera inerte di azoto o di argon.

Le reazioni al microonde erano condotte impiegando l'apparecchio Biotage Initiator.

### Procedure generali per la sintesi dei tricicli 16a-b e 17a-d

A) In una vial sono stati introdotti l'alchinilaldeide corrispondente, la *p*-tosilidrazide (1.06 eq.), la DL-Pro (10%), l'AgOTf (10%) e l'EtOH anidro (5ml/mmol). Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente fino alla scomparsa del prodotto di partenza in TLC.

È stato addizionato il piruvato di etile (10 eq.) e la miscela di reazione è stata riscaldata a 60 °C al microonde fino alla scomparsa dell'idrazone.

È stato quindi aggiunto il carbonato di sodio (6 eq.) e la miscela di reazione è stata portata alla temperatura di 40 °C per 2 ore.

È stata aggiunta acqua e la miscela è stata estratta con diclorometano. La fase organica è stata infine lavata più volte con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a pressione ridotta per ottenere un grezzo da purificare tramite F.C.

B) In una vial sono stati introdotti l'alchinilaldeide corrispondente, la *p*-tosilidrazide (1.1 eq.) e il diclorometano anidro (3ml/mmol).

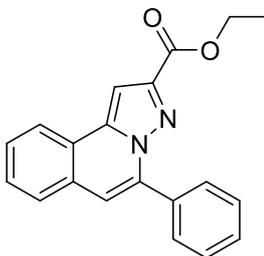
Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente fino alla scomparsa in TLC del prodotto di partenza.

È quindi stato addizionato l'argento triflato (30%) e la miscela è stata riscaldata al mw alla temperatura di 70 °C per 2 ore.

Sono infine stati addizionati il piruvato di etile (5 eq.) e la DBU (3 eq.), e la miscela di reazione è stata riscaldata al microonde alla temperatura di 50 °C fino alla completa conversione nel triciclo.

È stata aggiunta acqua e la miscela è stata estratta con diclorometano. La fase organica è stata infine lavata più volte con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e concentrata a pressione ridotta per ottenere un grezzo da purificare tramite F.C.

### Etil 5-fenilpirazolo[5,1-a]isochinolina-2-carbossilato (16a)



Sintetizzata secondo la procedure generali A e B a partire dall'alchinilaldeide **23a**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 95:5.

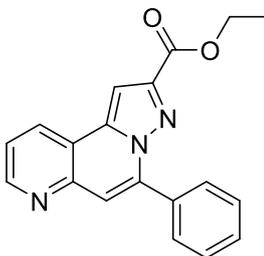
Isolato come solido chiaro.

**Resa:** 42% (A), 30% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.44 (t, 3H, J=6.8 Hz); 4.45 (q, 2H, J=6.8 Hz); 7.21 (s, 1H); 7.45-7.55 (m, 3H); 7.55-7.62 (m, 2H); 7.63 (s, 1H); 7.75-7.80 (m, 1H); 7.90-8.00 (m, 2H); 8.15 (dd, 1H, J=2.4 e 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.27 (CH<sub>3</sub>); 61.02 (CH<sub>2</sub>); 101.17 (CH); 114.89 (CH); 123.57 (CH); 124.21 (C); 127.40 (CH); 127.94 (CH); 128.42 (CH x 2); 128.58 (CH); 129.16 (C); 129.54 (CH); 129.64 (CH x 2); 133.03 (C); 138.66 (C); 140.36 (C); 144.36 (C); 162.86 (C)

**Etil 5-fenilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato (17a)**



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **24a**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1

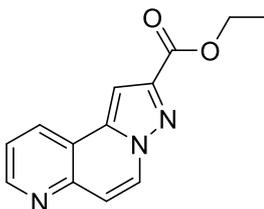
Isolato come solido chiaro.

**Resa:** 70% (A), 66% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.44 (t, 3H, J=8 Hz); 4.46 (q, 2H, J=8 Hz); 7.49 (s, 1H); 7.50-7.58 (m, 4H); 7.68 (s, 1H); 7.96-8.02 (m, 2H); 8.42 (dd, 1H, J=1.2 e 8.0 Hz); 8.92 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.27 (CH<sub>3</sub>); 61.71 (CH<sub>2</sub>); 102.00 (CH); 116.09 (CH); 119.76 (C); 122.36 (CH); 128.54 (CH x 2); 129.62 (CH x 2); 130.09 (CH); 131.26 (CH); 132.41 (C); 139.56 (C); 145.04 (C); 146.21 (C); 151.27 (C); 162.60 (C)

### Etil pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato (17b)



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **24b**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1

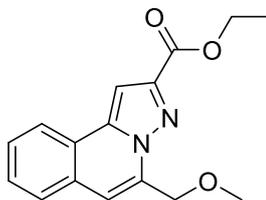
Isolato come solido chiaro.

**Resa:** 68%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.48 (t, 3H, J=7.2 Hz); 4.52 (q, 2H, J=7.2 Hz); 7.40 (d, 1H, J= 7.2 Hz); 7.55 (dd, 1H, J=1.2 e 7.6 Hz); 7.59 (s, 1H); 8.41 (dd, 1H, 1.2 e 7.6 Hz); 8.51 (d, 1H, J=7.6 Hz); 8.92 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.56 (CH<sub>3</sub>); 61.68 (CH<sub>2</sub>); 101.73 (CH); 116.36 (CH); 120.48 (C); 122.76 (CH); 129.98 (CH); 131.51 (CH); 138.48 (C); 145.41 (C); 145.84 (C); 151.14 (C); 162.36 (C)

**Etil 5-(metossimetil)pirazolo[5,1- $\alpha$ ]isochinolina-2-carbossilato (16b)**



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **23b**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 9:1

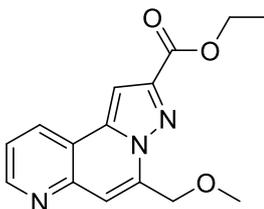
Isolata come solido giallo.

**Resa:** 34% (A), 18% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ /ppm):** 1.47 (t, 3H, J=8.0 Hz); 3.65 (s, 3H); 4.50 (q, 2H, J=8.0 Hz); 5.08 (s, 2H); 7.29 (s, 1H); 7.58 (s, 1H); 7.59-7.63 (m, 2H); 7.75-7.80 (m, 1H); 8.12-8.15 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ /ppm):** 14.41 (CH<sub>3</sub>); 59.56 (CH<sub>3</sub>); 61.36 (CH<sub>2</sub>); 68.77 (CH<sub>2</sub>); 100.61 (CH); 111.12 (CH); 123.67 (CH); 123.85 (C); 127.39 (CH); 127.78 (CH); 128.63 (CH); 128.82 (C); 135.49 (C); 139.69 (C); 144.39 (C); 162.86 (C)

**Etil 5-(metossimetil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato (17c)**



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **24c**.

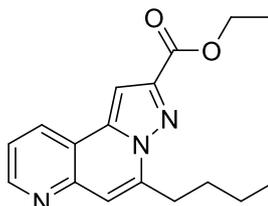
Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1

Isolato come solido chiaro.

**Resa:** 40% (A); 41% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.47 (t, 3H, J= 7 Hz); 3.66 (s, 3H); 4.51 (q, 2H, J= 7Hz); 5.10 (s, 2H); 7.49-7.53 (m, 1H); 7.63 (s, 1H); 8.41 (d, 1H, J= 7.6); 8.93 (dd, 1H, J= 1.4 e 4.4 Hz)

**Etil 5-butilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato (17d)**



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **24d**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 7:3

Isolato come solido giallo chiaro.

**Resa:** 78%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.02 (t, 3H, J=7.02 Hz); 1.50 (t, 3H, J=7.6 Hz); 1.50-1.52 (m, 2H); 1.80-2.00 (m, 2H); 3.30 (t, 2H, J=7.6 Hz); 4.50 (q, 2H, J=7.2 Hz); 7.25 (s, 1H); 7.47 (dd, 1H, J=4.4 e 8.0 Hz); 7.61 (s, 1H); 8.38 (dd, 1H, J=1.2 e 8.0 Hz); 8.87 (d, 1H, J=3.2 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.10 (CH<sub>3</sub>); 14.40 (CH<sub>3</sub>); 22.28 (CH<sub>2</sub>); 28.44 (CH<sub>2</sub>); 30.16 (CH<sub>2</sub>); 61.43 (CH<sub>2</sub>); 101.82 (CH); 113.12 (CH); 119.15 (C); 121.76 (CH); 131.18 (CH); 138.76 (C); 144.04 (C); 144.71 (C); 146.22 (C); 151.00 (C); 162.59 (C)

### Procedure generali per la sintesi dei tricicli 16c,d e 17e-g

A) In una vial sono stati introdotti l'alchinilaldeide corrispondente, la *p*-tosilidrazide (1.06 eq.), la DL-Pro (10%), l'AgOTf (10%) e l'EtOH anidro (5ml/mmol). Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente fino alla scomparsa del prodotto di partenza in TLC.

È stato addizionato l'acetone anidro (10 eq.) e la miscela di reazione è stata riscaldata a 60 °C al microonde fino alla scomparsa dell'idrazone.

È stato quindi aggiunto il carbonato di sodio (6 eq.) e la miscela di reazione è stata portata alla temperatura di 40 °C per 2 ore.

È stata aggiunta acqua e la miscela è stata estratta con diclorometano. La fase organica è stata infine lavata più volte con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a pressione ridotta per ottenere un grezzo da purificare tramite F.C.

B) In una vial sono stati introdotti l'alchinilaldeide corrispondente, la *p*-tosilidrazide (1.1 eq.) e il diclorometano anidro (3ml/mmol).

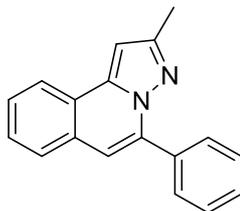
Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente fino alla scomparsa in TLC del prodotto di partenza.

È quindi stato addizionato l'argento triflato (30%) e la miscela è stata riscaldata al mw alla temperatura di 70 °C per 2 ore.

Sono infine stati addizionati l'acetone anidro (5 eq.) e la DBU (3 eq.), e la miscela di reazione è stata riscaldata al microonde alla temperatura di 50 °C fino alla completa conversione nel triciclo.

È stata aggiunta acqua e la miscela è stata estratta con diclorometano. La fase organica è stata infine lavata più volte con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a pressione ridotta per ottenere un grezzo da purificare tramite F.C.

### 2-metil-5-fenilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina (16c)



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **23a**.

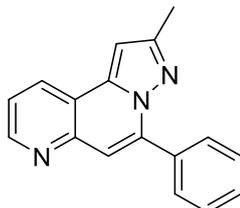
Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 9:1

Isolato come olio giallo scuro.

**Resa:** 21% (A), 11% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ /ppm):** 2.52 (s, 3H); 6.88 (s, 1H); 6.96 (s, 1H); 7.40-7.60 (m, 5H); 7.62-7.75 (m, 1H); 7.85-7.95 (m, 2H); 8.00-8.10 (m, 1H)

## 2-metil-5-fenilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina (17e)



Sintetizzata secondo le procedure generali A e B a partire dall'alchinilaldeide **24a**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1

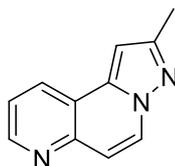
Isolato come solido arancio scuro.

**Resa:** 37% (A), 40% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.53 (s, 3H); 6.93 (s, 1H); 7.24 (s, 1H); 7.44 (dd, 1H, J=4.4 e 8.8 Hz); 7.50-7.56 (m, 3H); 8.33 (dd, 1H, J=1.2 e 8.0 Hz); 8.84 (dd, 1H, J=1,6 e 4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 29.93 (CH<sub>3</sub>); 98.91 (CH); 112.84 (CH); 119.24 (C); 121.56 (CH); 128.34 (CH x 2); 129.41 (CH x 2); 129.75 (CH); 123.28 (CH); 139.34 (C); 142.07 (C); 145.59 (C); 150.57 (CH); 151.40 (C)

## 2-metilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina (17f)



Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'alchinilaldeide **24b**.

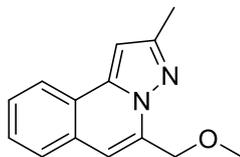
Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 4:6

Isolato come solido giallo.

**Resa:** 64%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.53 (s, 3H); 6.83 (s, 1H); 7.19 (d, 1H, J=7.6 Hz); 7.48 (dd, 1H, J=4.8 e 8.0 Hz); 8.35 (t, 3H, J=7.8 Hz); 8.85 (d, 1H, J=4.4 Hz)

**5-(metossimetil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina (16d)<sup>77</sup>**



Sintetizzata secondo le procedure generali A e B a partire dall'alchinilaldeide **23b**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 9:1

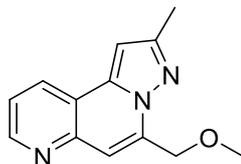
Isolato come solido giallino.

**Resa:** 71% (metodo A) e 58% (metodo B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.55 (s, 3H); 3.62 (s, 3H); 4.98 (s, 2H); 6.82 (s, 1H); 7.05 (s, 1H); 7.48-7.55 (m, 2H), 7.67-7.73 (m, 1H), 8.05-8.50 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.18 (CH<sub>3</sub>); 59.30 (CH<sub>3</sub>); 69.18 (CH<sub>3</sub>); 97.48 (CH); 108.14 (CH), 123.47 (CH); 123.51 (C); 126.90 (CH); 127.03 (CH); 127.70 (CH); 128.92 (C); 134.96 (C); 139.80 (C); 159.71 (C)

5-(metossimetil)-2-metilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina (17g)<sup>77</sup>



Sintetizzata secondo la procedure generali A e B a partire dall'alchinilaldeide **24c**.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt.

Isolato come solido giallino.

**Resa:** 77% (A), 50% (B)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.56 (s, 3H); 3.63 (s, 3H); 5.00 (s, 2H); 6.87 (s, 1H); 7.32 (s, 1H); 7.44 (dd, 1H, J= 4.8 e 8.2 Hz); 8.32 (d, 1H, J=7.6 Hz); 8.85 (d, 1H, J=3.4 Hz)

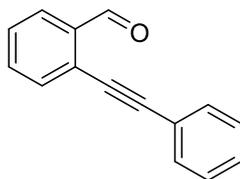
### **Procedura generale per la sintesi delle alchiniladeidi 23a,b e 24a-d**

In una vial sono stati introdotti l'*o*-alogenoaldeide corrispondente, lo ioduro di rame (7%), il Pd(PPh)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> (3%), l'alchino (2 eq.) e la trietilammina (1.5 eq.).

Il tutto è stato fatto reagire al microonde alla temperatura di 50 °C per 30 minuti.

Alla miscela è stato addizionato etere etilico; il precipitato formatosi è stato filtrato su celite ed il filtrato è stato lavato con NH<sub>4</sub>Cl sat. ed acqua, anidrificato e concentrato per ottenere un grezzo scuro che viene purificato tramite F.C.

## 2-(feniletinil)benzaldeide (23a)<sup>80</sup>



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromobenzaldeide e dal fenilacetilene.

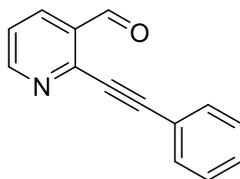
Purificata tramite F.C. EtP/AcOEt 95:5

Isolato come olio giallo-arancio.

**Resa:** 80%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 7.30-7.70 (m, 8H); 7.96 (d, 1H, J=7.8 Hz); 10.66 (s, 1H)

## 2-(feniletinil)nicotinaldeide (24a)



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromopiridincarbossaldeide e dal fenilacetilene.

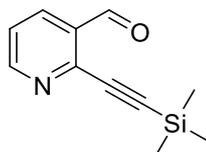
Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 6:4

Isolato come olio arancio.

**Resa:** 72%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 7.38-7.43 (m, 4H); 7.65 (dd, 2H, J= 1.6 e 7.6 Hz); 8.22 (d, 1H, J=2 e 8.0 Hz); 8.83 (d, 1H, J=2 e 4.8 Hz); 10.68 (s, 1H)

## 2-((trimetilsilil)etinin)nicotinaldeide (24b)<sup>79</sup>



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromopiridincarbossaldeide e dal trimetilsililacetilene.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 8:2

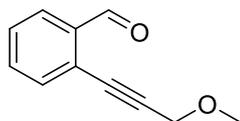
Isolato come olio arancio.

**Resa:** 81%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 0.32 (s, 9H); 7.40 (dd, 1H, J=4.8 e 7.6 Hz); 8.18 (dd, 1H, J=1.6 e 8.0 Hz); 8.78 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz); 10.57 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 0.51 (CH<sub>3</sub> x 3); 99.80 (C); 102.82 (C); 123.59 (CH); 131.95 (C); 134.95 (CH); 146.26 (C); 154.32 (CH); 190.99 (CH)

## 2-(3-metossiprop-1-in-1-il)benzaldeide (23c)<sup>77</sup>



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromobenzaldeide e dal metil propargil etere.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 95:5

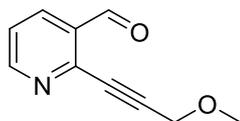
Isolato come olio giallo chiaro.

**Resa:** 84%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.48 (s, 3H); 4.40 (s, 2H); 7.44-7.46 (m, 1H); 7.55-7.58 (m, 2H); 7.92 (d, 1H, J=7.6 Hz); 10.53 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 58.02 (CH<sub>3</sub>); 60.36 (CH<sub>2</sub>); 82.08 (C); 92.23 (C); 126.22 (C); 127.27 (CH); 128.87(CH); 133.51 (CH); 133.82 (CH); 136.14 (C); 191.45 (CH)

## 2-(3-metossiprop-1-in-1-il)nicotinaldeide (24c)<sup>77</sup>



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromopiridincarbossaldeide e dal metil propargil etere.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 7:3

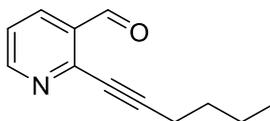
Isolato come olio arancio.

**Resa:** 81%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.50 (s, 3H); 4.44 (s, 2H); 7.42 (dd, H, J=5.6 e 8.0 Hz); 8.20 (dd, 1H, J=2 e 8.0 Hz); 8.79 (dd, 1H, J=2.0 e 4.8 Hz); 10.56 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 52.11 (CH<sub>3</sub>); 60.19 (CH<sub>2</sub>); 81.72 (C); 92.33 (C); 123.73 (CH); 132.18 (C); 134.83 (CH); 145.41 (C); 154.59 (CH); 190.59 (CH)

## 2-(1-esin-1-il)nicotinaldeide (24d)



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromopiridincarbossaldeide e dal 1-esino.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 9:1

Isolato come olio arancio.

**Resa:** 74%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 0.96(t, 3H, J=7.2 Hz); 1.51 (sxt, 2H, J=7.2); 1.67 (quint, 2H, J=7.2 Hz); 2.55 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.35 (dd, 1H, J=4.8 e 8 Hz); 8.15 (dd, 1H, J=2 e 8.0 Hz); 8.75 (dd, 1H, J=2 e 4.8 Hz); 10.55 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 13.57 (CH<sub>3</sub>); 19.25 (CH<sub>2</sub>); 22.13 (CH<sub>2</sub>); 29.70 (C); 30.22 (CH<sub>2</sub>); 98.99 (C); 122.93 (CH); 131.83 (C); 134.59 (CH); 146.72 (C); 154.29 (CH); 191.43 (CH)

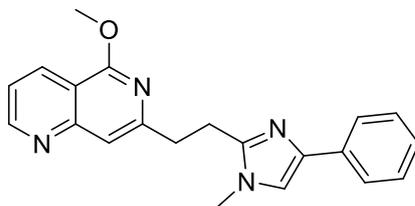
### **Procedure generali per la sintesi delle naftiridine 18Ab, 18Bb, 18Cb, 18Db**

In atmosfera inerte, in un pallone a due colli munito di refrigerante, è stato solubilizzato il sodio metallico (13.5 eq) in metanolo anidro (10 ml/mmol).

È stata quindi addizionata goccia a goccia una soluzione del cloderivato in metanolo anidro. Il tutto è stato lasciato in agitazione a riflusso per 4 ore.

Il metanolo è stato evaporato, il residuo ripreso con acqua ed estratto con diclorometano, e il solvente organico è stato infine anidrificato e concentrato.

**5-metossi-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina (18Ab)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificata tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

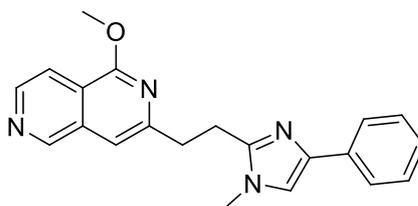
Isolato come olio giallo che solidifica.

**Resa:** 68%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.22-3.25 (m, 2H); 3.28-3.33 (m, 2H); 3.58 (s, 3H); 4.13 (s, 3H); 7.07 (s, 1H); 7.21 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.32-7.41 (m, 4H); 7.73 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.48 (d, 1H, J=8.0 Hz); 8.95 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.57 (CH<sub>2</sub>); 32.70 (CH<sub>3</sub>); 36.54 (CH<sub>2</sub>); 53.93 (CH<sub>3</sub>); 113.64 (C); 113.82 (CH); 116.26 (CH); 121.05 (CH); 124.76 (CH x 2); 126.30 (CH); 128.50 (CH x 2); 132.66 (CH); 134.49 (C); 140.14 (C); 148.36 (C); 153.52 (C); 154.30 (CH); 155.41 (C); 160.54 (C)

**1-metossi-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina (18Bb)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

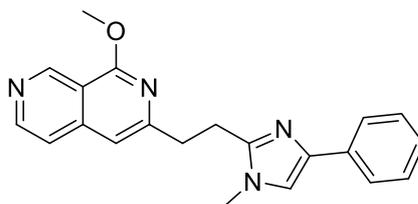
Isolato come olio giallo che solidifica.

**Resa:** 64%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.22 (t, 2H, J=8.8 Hz); 3.31 (t, 2H, J=8.8 Hz); 3.54 (s, 3H); 4.14 (s, 3 H), 7.05 (s, 1H); 7.16 (s, 1H); 7.21 (t, 1H, J=7.6 Hz); 7.36 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.74 (d, 2H, J= 8.0 Hz); 7.92 (d, 1H, J=5.6 Hz); 8.60 (d, 1 H, J=5.6 Hz); 9.11 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.59 (CH<sub>2</sub>); 32.67 (CH<sub>3</sub>); 36.48 (CH<sub>2</sub>); 53.87 (CH<sub>3</sub>); 110.45 (CH); 116.23 (CH); 116.40 (CH); 121.27 (C); 124.74 (CH x 2); 126.45 (CH); 128.53 (CH x 2); 133.07 (C); 134.46 (C); 140.17 (C); 144.17 (CH); 148.25 (C); 150.47 (CH); 153.08 (C); 159.79 (C)

**1-metossi-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,7-naftiridina (18Cb)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

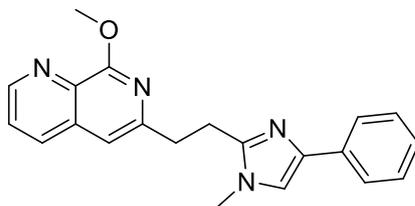
Isolato come olio giallo che solidifica.

**Resa:** 63%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.20-3.32 (m, 4H); 3.57 (s, 3H); 4.18 (s, 3H); 7.05 (s, 1H); 7.07 (s, 1H); 7.24 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.38 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.47 (d, 1H, J=5.6 Hz); 7.76 (d, 2H, J=7.72 Hz); 8.65 (d, 1H, J=5.6 Hz); 9.54 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.37 (CH<sub>2</sub>); 32.66 (CH<sub>3</sub>); 36.70 (CH<sub>2</sub>); 53.78 (CH<sub>3</sub>); 110.91 (CH); 113.85 (C); 116.23 (CH); 118.59 (CH); 124.73 (CH x 2); 126.45 (CH); 128.44 (CH x 2); 134.45 (C); 140.16 (C); 141.93 (C); 147.61 (CH); 148.18 (C); 149.21 (CH); 156.40 (C); 161.20 (C)

**8-metossi-6-(2-(1-metil-4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridina (18Db)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

Isolato come olio giallo che solidifica.

**Resa:** 60%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.20-3.32 (m, 4H); 3.53 (s, 3H); 4.22 (s, 3H); 7.05 (d, 2H, J=8.4 Hz); 7.21 (t, 1H, J=7.6 Hz); 7.36 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.53 (dd, 1H, J=4 e 8.0 Hz); 7.74 (d, 2H, J=7.6 Hz); 7.99 (d, 1H, J=8.0 Hz); 8.90 (d, 1H, J=4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.57 (CH<sub>2</sub>); 32.69 (CH<sub>3</sub>); 36.39 (CH<sub>2</sub>); 54.22 (CH<sub>3</sub>); 111.81 (CH); 116.20 (CH); 124.73 (CH x 2); 125.31 (CH); 126.48 (CH); 128.52 (CH x 2); 133.56 (C); 133.97 (C); 134.32 (CH); 134.49 (C); 140.12 (C); 148.37 (C); 149.85 (CH); 152.02 (C); 160.16 (C)

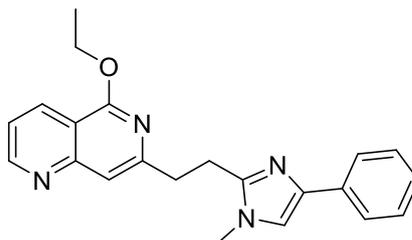
### **Procedure generali per la sintesi delle naftiridine 18Ac, Bc, Cc**

In atmosfera inerte, in un pallone a due colli munito di refrigerante, è stato solubilizzato il sodio metallico (13.5 eq) in etanolo anidro (10 ml/mmol).

È stata quindi addizionata goccia a goccia una soluzione del cloderivato in metanolo anidro. Il tutto è stato lasciato in agitazione a reflusso per 2 ore.

Il metanolo è stato evaporato, il residuo ripreso con acqua ed estratto con diclorometano, e il solvente organico è stato infine anidrificato e concentrato.

**5-etossi-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina (18Ac)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

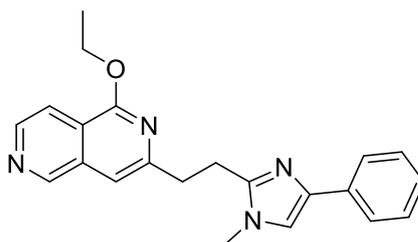
Isolato come olio giallo che solidifica.

**Resa:** 25%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.42 (t, 3H, J=6.8 Hz); 3.12-3.18 (m, 2H); 3.19-3.25 (m, 2H); 3.50 (s, 3H); 4.51 (q, 2H, J=6.8 Hz); 6.99 (s, 1H); 7.13 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.25-7.32 (m, 4H); 7.67 (d, 2H, J=7.2 Hz); 8.43 (d, 1H, J=8.0 Hz); 8.88 (d, 1H, J=4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.56 (CH<sub>3</sub>); 26.58 (CH<sub>2</sub>); 32.75 (CH<sub>3</sub>); 36.70 (CH<sub>2</sub>); 62.38 (CH<sub>2</sub>); 113.53 (CH); 113.71 (C); 116.27 (CH); 120.95 (CH); 124.77 (CH x 2); 126.40 (CH); 128.57 (CH x 2); 132.77 (CH); 134.45 (C); 140.10 (C); 148.39 (C); 153.52 (C); 154.21 (CH); 155.46 (C); 160.28 (C)

**1-etossi-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina (18Bc)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

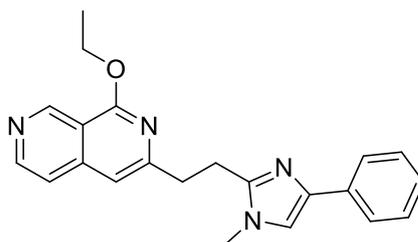
Isolato come olio giallo.

**Resa:** 34%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.52 (t, 3H, J=6.8 Hz); 3.20-3.35 (m, 4H); 3.56 (s, 3H); 4.61 (q, 2H, =6.8 Hz); 7.07 (s, 1H); 7.17 (s, 1H); 7.25-7.28 (m, 1H); 7.38 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.77 (d, 2H, J=7.2 Hz); 7.97 (d, 1H, J=6.0 Hz); 8.62 (d, 1H, J=4.8 Hz); 9.13 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.51 (CH<sub>3</sub>); 26.52 (CH<sub>2</sub>); 32.71 (CH<sub>3</sub>); 36.50 (CH<sub>2</sub>); 62.35 (CH<sub>2</sub>); 110.21 (CH); 116.20 (CH); 116.48 (CH); 121.36 (C); 124.78 (CH x 2); 126.58 (CH); 128.56 (CH x 2); 133.10 (C); 134.18 (C); 139.93 (C); 144.09 (CH); 148.27 (C); 150.44 (CH); 153.01 (C); 159.51 (C)

**1-etossi-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-yl)etil)-2,7-naftiridina (18Cc)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 2:8

Isolato come olio giallo.

**Resa:** 34%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.54 (t, 3H, J=6.8 Hz); 3.20-3.33 (m, 4H); 3.56 (s, 3H); 4.64 (q, 2H, J=6.8 Hz); 7.02 (s, 1H); 7.07 (s, 1H); 7.20-7.25 (m, 1H); 7.38 (t, 2H, J=6.8 Hz); 7.45 (d, 1H, J=6.8 Hz); 7.76 (d, 2H, J=7.2 Hz), 8.64 (d, 1H, J=5.2 Hz); 9.56 (s, 1H)

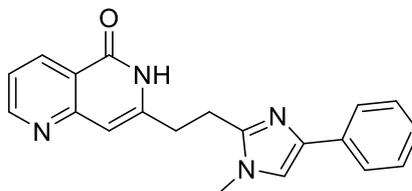
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 14.52 (CH<sub>3</sub>); 26.41 (CH<sub>2</sub>); 32.65 (CH<sub>3</sub>); 36.73 (CH<sub>2</sub>); 62.31 (CH<sub>2</sub>); 110.62 (CH); 113.88 (C); 116.23 (CH); 118.54 (CH); 126.43 (CH x 2); 127.74 (CH); 128.52 (CH x 2); 134.47 (C); 140.16 (C); 141.90 (C); 147.55 (CH); 148.20 (C); 149.29 (CH); 156.45 (C); 160.93 (C)

### **Procedura generale per la sintesi dei naftiridinoni 19A-D**

Ad una soluzione del cloroderivato in acido acetico glaciale (3.4 ml/mmol) è stato addizionato l'acetato d'ammonio (6.55 eq).

La miscela di reazione è stata portata alla temperatura di 100 °C e lasciata in agitazione per 8 ore. È stato aggiunto ghiaccio, la soluzione è stata estratta con diclorometano e la fase organica è stata lavata più volte con acqua, anidrificata e concentrata.

**7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridin-5(6H)-one (19A)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. Esano/AcOEt 2:8

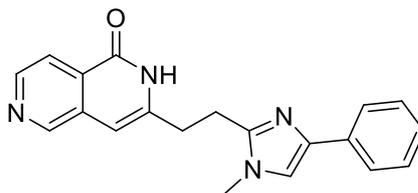
Isolato come solido bianco.

**Resa:** 21%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.05-3.10 (m, 2H); 3.18-3.23 (m, 2H); 3.61 (s, 3H); 6.58 (s, 1H); 7.12 (s, 1H); 7.25-7.30 (m, 1H); 7.32 (dd, 1H, J=4.4 e 8.0 Hz); 7.44 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.91 (d, 2H, J= 8.0 Hz); 8.63 (d, 1H, J=8.0 Hz); 8.85 (d, 1H, J=4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.96 (CH<sub>2</sub>); 30.23 (CH<sub>2</sub>); 32.84 (CH<sub>3</sub>); 105.86 (CH); 116.71 (CH); 120.98 (CH); 121.16 (C); 125.06 (CH X 2); 127.01 (CH); 128.82 (CH x 2); 133.38 (C); 135.83 (CH); 139.89 (C); 145.77 (C); 147.46 (C); 154.36 (CH); 154.99 (C); 163.43 (C)

**3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridin-1(2H)-one (19B)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. Esano/AcOEt 2:8

Isolato come solido bianco.

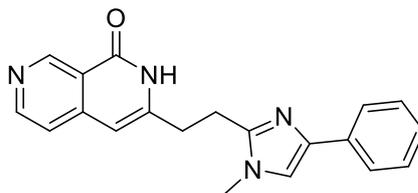
**Resa:** 43%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.04-3.09 (m, 2H); 3.15-3.20 (m, 2H), 3.60 (s, 3H); 6.36 (s, 1H); 7.10 (s, 1H); 7.28-7.30 (m, 1H); 7.44 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.90 (d, 2H, J=8.0 Hz); 8.12 (d, 1H, J=5.2 Hz); 8.60 (d, 1H, J=5.2 Hz), 8.89 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.96 (CH<sub>2</sub>), 30.22 (CH<sub>2</sub>); 32.85 (CH<sub>3</sub>); 101.15 (CH); 116.74 (CH); 119.78 (CH); 125.04 (CH x 2); 127.05 (CH); 128.82 (CH x 2); 130.13 (C); 132.94 (C); 133.17 (C); 139.94 (C); 143.63 (C); 145.55 (CH); 147.40 (C); 149.24 (C); 162.35 (C)

**IR:** 1684 cm<sup>-1</sup>

**3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,7-naftiridin-1(2H)-one (19C)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. Esano/AcOEt 2:8

Isolato come solido bianco.

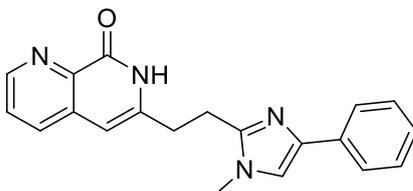
**Resa:** 43%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.97-3.03 (m, 2H); 3.06-3.12 (m, 2H); 3.53 (s, H); 6.18 (s, 1H); 7.03 (s, 1H); 7.16-7.21 (m, 1H); 7.35-7.41 (m, 3H); 7.82 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.57 (d, 1H, J=5.2 Hz); 9.47 (s, 1H); 13.08 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.76 (CH<sub>2</sub>); 30.39 (CH<sub>2</sub>); 32.82 (CH<sub>3</sub>); 102.09 (CH); 116.73 (CH); 118.75 (CH); 120.41 (C); 125.04 (CH x 2); 127.03 (CH); 128.56 (CH x 2); 131.93 (CH); 139.95 (C); 143.74 (C); 147.25 (C x 2); 150.64 (CH); 151.05 (CH); 162.82 (C)

**IR:** 1668 cm<sup>-1</sup>

**6-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridin-8(7H)-one (19D)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. Esano/AcOEt 2:8

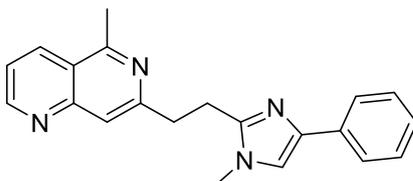
Isolato come solido bianco.

**Resa:** 41%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.04-3.09 (m, 2H); 3.13-3.17 (m, 2H); 3.60 (s, 3H); 6.27 (s, 1H); 7.07 (s, 1H); 7.22-7.25 (m, 1H); 7.40 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.48 (dd, 1H, J=4.4 e 8.0 Hz); 7.79 (d, 1H, J=8.0 Hz); 7.87 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.80 (d, 1H, J=4.0 Hz); 12.89 (brs, 1H, exc. D<sub>2</sub>O)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.87 (CH<sub>2</sub>); 30.56 (CH<sub>2</sub>); 32.87 (CH<sub>3</sub>); 102.45 (CH); 116.69 (CH); 125.07 (CH x 2); 126.46 (CH); 126.76 (CH); 128.69 (CH x 2); 133.68 (C); 133.99 (CH); 134.54 (C); 139.89 (C); 141.41 (C); 142.79 (C); 147.22 (C); 148.78 (CH); 162.53

### 5-metil-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina



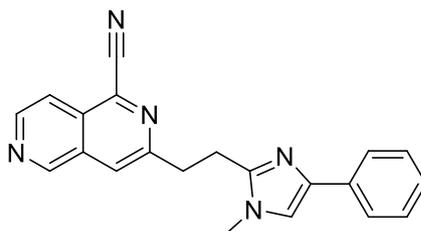
In atmosfera inerte, ad una soluzione del cloroderivato (**18Aa**) in THF anidro (10 ml/mmol) sono stati addizionati il PdCl<sub>2</sub>(dppfCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (10% p/p) ed il metilmagnesio bromuro 1.4 M in toluene/THF (11 eq.). La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 4 ore, addizionata di NaHCO<sub>3</sub>, estratta con diclorometano e lavata con acqua e brina.

Il grezzo ottenuto è stato cromatografato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7 per ottenere un olio giallo chiaro.

**Resa:** 21%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.66-3.75 (m, 4H); 3.77 (s, 3H); 3.84 (s, 3H); 7.04 (s, 1H); 7.35-7.45 (m, 4H); 7.69 (s, 1H); 7.77 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.42 (t, 2H, J=8.0 Hz)

### 3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina-1-carbonitrile (18Bd)



Ad una soluzione del cloroderivato (**18Ba**) in DMF (5 ml/mmol) è stato addizionato il cianuro di sodio (4.6 eq.). La reazione è stata lasciata in agitazione a 60 °C per 4 ore, addizionata di NaHCO<sub>3</sub>, estratta con diclorometano e lavata con acqua e brina.

Il grezzo ottenuto è stato cromatografato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7 per ottenere un solido bruno.

**Resa:** 21%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.26-3.33 (m, 2H); 3.48-3.55 (m, 2H); 3.61 (s, 3H); 7.05 (s, 1H); 7.20-7.36 (m, 1H); 7.37 (t, 2H, J=2.0 Hz); 7.68 (s, 1H); 7.74 (d, 2H, J=7.2 Hz); 8.03 (d, 1H, J=5.2 Hz); 8.75 (d, 1H, J=5.2 Hz); 9.26 (s, 1H)

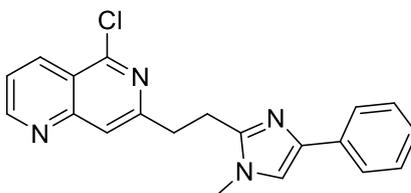
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.02 (CH<sub>2</sub>); 32.85 (CH<sub>3</sub>); 35.71 (CH<sub>2</sub>); 116.31 (CH); 117.74 (CH); 117.87 (CH); 124.74 (CH x 2); 126.66 (CH); 127.97 (C); 128.58 (CH x 2); 132.60 (C); 133.33 (C); 133.97 (C); 136.27 (C); 139.83 (C); 145.40 (CH); 147.63 (C); 150.30 (C); 151.71 (CH); 155.37 (C)

### **Procedura generale per la sintesi dei cloroderivati 18Aa, 18Ba, 18Ca, 18Da**

Ad una sospensione dell'*N*-ossido corrispondente in acetonitrile (1 ml/mmol) è stato aggiunto, goccia a goccia, il POCl<sub>3</sub> (10 eq.). La soluzione ottenuta è stata portata a 60 °C e lasciata reagire per 8 ore.

L'acetonitrile ed il POCl<sub>3</sub> sono stati evaporati a pressione ridotta, è stato aggiunto ghiaccio al pallone e si è basificato con NaHCO<sub>3</sub> al 10%. La miscela è stata quindi estratta con diclorometano, e la fase organica anidrificata e concentrata per ottenere un grezzo purificato tramite F.C.

**5-cloro-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina (18Aa)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7

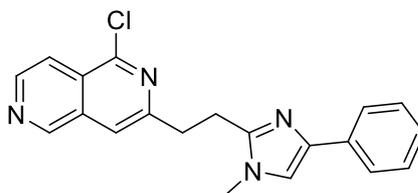
Isolato come solido giallino.

**Resa:** 40%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.50-3.55 (m, 2H); 3.48-3.53 (m, 2H); 3.61 (s, 3H); 7.04 (s, 1H); 7.20 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.34 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.54 (dd, 1H, J=4.4 e 8.4 Hz); 7.73 (d, 2H, J=8.0 Hz); 7.78 (s, 1H); 8.57 (d, 1H, J=8.4 Hz); 9.07 (d, 1H, J=4.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.12 (CH<sub>2</sub>); 32.84 (CH<sub>3</sub>); 35.84 (CH<sub>2</sub>); 116.33 (CH); 120.72 (CH); 121.19 (CH); 122.86 (CH); 124.76 (CH x 2); 126.49 (CH); 128.52 (CH x 2); 134.21 (C); 134.60 (CH); 139.98 (C); 147.70 (C); 150.69 (C); 152.63 (C); 155.41 (CH); 157.43 (C)

**1-cloro-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina (18Ba)<sup>77</sup>**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7

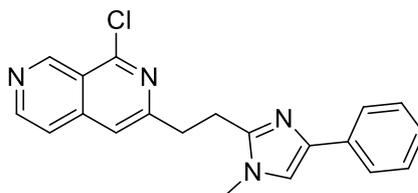
Isolato come solido giallo oro.

**Resa:** 30%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.15-3.20 (m, 2H); 3.40-3.48 (m, 2H); 3.50 (s, 3H); 6.95 (s, 1H); 7.14 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.28 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.58 (s, 1H); 7.65 (d, 2H, J=7.6 Hz); 7.94 (d, 1H, J=6.0 Hz); 8.65 (d, 1H, J=5.6 Hz); 9.18 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.94 (CH<sub>2</sub>); 32.90 (CH<sub>3</sub>); 35.69 (CH<sub>2</sub>); 116.27 (CH); 117.79 (CH); 117.91 (CH); 124.77 (CH x 2); 124.74 (CH); 127.94 (C); 128.60 (CH x 2); 132.61 (C x 2); 145.43 (CH); 147.53 (C x 2); 150.23 (C); 151.74 (CH); 155.31 (C)

**1-cloro-3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,7-naftiridina (18Ca)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7

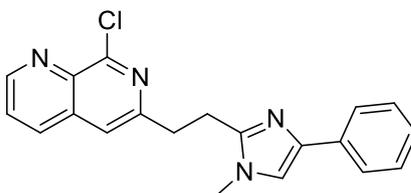
Isolato come solido giallo.

**Resa:** 30%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.24-3.31 (m, 2H); 3.44-3.52 (m, 2H); 3.60 (s, 3H); 7.03 (s, 1H); 7.22 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.36 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.51 (s, 1H); 7.56 (d, 1H, J=5.6 Hz); 7.73 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.73 (d, 1H, J=5.6 Hz); 9.67 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.81 (CH<sub>2</sub>); 32.88 (CH<sub>3</sub>); 35.93 (CH<sub>2</sub>); 116.29 (CH); 117.86 (CH); 118.82 (CH); 120.89 (C); 124.75 (CH x 2); 126.66 (CH); 128.58 (CH x 2); 134.02 (C); 139.94 (C); 141.60 (C); 147.62 (C); 147.87 (CH); 151.33 (CH); 151.68 (C); 158.02 (C)

**8-cloro-6-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridina (18Da)**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 3:7

Isolato come solido giallo chiaro.

**Resa:** 32%

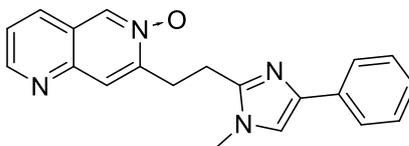
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.34-3.38 (m, 2H); 3.53-3.58 (m, 2H); 3.66 (s, 3H); 7.04 (s, 1H); 7.21-7.25 (m, 1H); 7.39 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.58 (s 1H); 7.65 (dd, 1H, J=4.4 e 8.4 Hz); 7.77 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.13 (d, 1H, J=8.0 Hz); 9.08 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 24.55 (CH<sub>2</sub>); 33.87 (CH<sub>3</sub>); 35.12 (CH<sub>2</sub>); 116.18 (CH); 119.51 (CH); 125.29 (CH x 2); 125.98 (CH); 128.16 (CH); 128.93 (CH x 2); 133.75 (C x 2); 139.40 (CH); 147.73 (C x 2); 152.11 (CH); 152.92 (C); 153.01 (C); 159.81 (C)

### **Procedure generali per la preparazione degli *N*-ossidi 35A-D**

- A) Ad una soluzione dell'ossima corrispondente in etanolo (5 ml/mmol) è stato addizionato il carbonato di potassio (1.5 eq.). La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 3 ore, fino alla formazione di un sospensione color giallo intenso. Il solvente è stato evaporato, il residuo ripreso con diclorometano e la fase organica lavata con acqua e NaCl sat., anidrificata e concentrata per dare un solido utilizzato senza purificazione nello step successivo.
- B) Ad una soluzione dell'alchinilaldeide corrispondente in etanolo anidro è stata addizionata l'idrossilammina cloridrata (1.5 eq.) e l'acetato di sodio (1.5 eq.). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente, fino alla scomparsa in TLC del prodotto di partenza, corrispondente alla formazione dell'ossima. È stato quindi addizionato carbonato di potassio (3 eq.) e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente fino alla completa conversione dell'ossima in *N*-ossido.

**7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina 6-ossido (35A)**



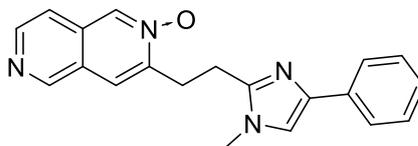
Sintetizzata secondo la procedura generale A a partire dall'ossima **34A**.

Isolato come solido giallo.

**Resa:** 88%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.20-3.30 (m, 2H); 3.45-3.60 (m, 2H); 3.72 (s, 3H); 7.09 (s, 1H); 7.05-7.10 (m, 1H); 7.15-7.20 (m, 2H); 7.47 (dd, 1H, J=4.4 e 8 Hz); 7.74 (d, 2H, J=14.0 Hz); 7.95-8.05 (m, 2H); 8.82 (s, 1H); 8.93 (d, 1H, J=4.4 Hz)

**3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina 2-ossido (35B)**<sup>77</sup>



Sintetizzata secondo la procedura generale B a partire dall'alchiniladeide **33B**.

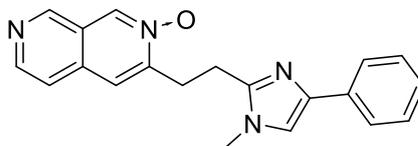
Isolato come solido giallo scuro.

**Resa:** 79%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.22-3.28 (m, 2H); 3.51-3.57 (m, 2H), 3.65 (s, 3H); 7.06 (s, 1H); 7.22 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.35-7.40 (m, 2H); 7.48 (d, 1H, J= 5.6 Hz); 7.71 (t, 2H, J=8 Hz); 7.99 (s, 1H); 8.59 (d, 1H, J=5.6 Hz); 9.16 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 18.95 (CH<sub>2</sub>); 25.65 (CH<sub>2</sub>); 32.99 (CH<sub>3</sub>); 74.51 (C); 99.34 (C); 116.55 (CH); 119.12 (CH); 119.61 (CH); 121.68 (C); 124.59 (C); 124.90 (CH x 2); 126.93 (CH); 128.63 (CH x 2); 140.90 (C); 146.55 (C); 149.03 (CH); 154.88 (CH); 191.16 (CH)

**3-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,7-naftiridina 2-ossido (35C)**



Sintetizzata secondo la procedura generale A partire dall'ossima **34C**.

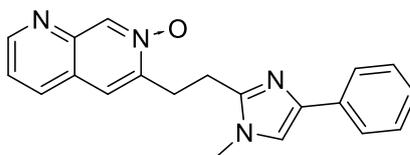
Isolato come solido giallo scuro.

**Resa:** 79%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.18-3.24 (m, 2H); 3.44-3.49 (m, 2H); 3.58 (s, 3H); 6.99 (s, 1H); 7.12-7.18 (m, 1H); 7.29 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.47 (d, 1H, J=5.2 Hz); 7.65 (d, 2H, J=7.2 Hz); 7.76 (s, 1H); 8.52 (d, 1H, J=5.6 Hz); 8.84 (s, 1H); 9.07 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 23.91 (CH<sub>2</sub>); 30.17 (CH<sub>2</sub>); 32.73 (CH<sub>3</sub>); 116.55 (CH); 118.58 (CH); 123.16 (CH); 124.17 (C); 124.64 (CH x 2); 126.07 (CH); 126.52 (CH x 2); 131.24 (C); 134.37 (C); 135.95 (CH); 140.14 (C); 145.74 (CH); 147.16 (C); 148.87 (CH); 152.56 (C)

**6-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridina 7-ossido (35D)**



Sintetizzata secondo la procedura generale B partire dall'alchinilaldeide **33D**.

Isolato come solido giallo scuro.

**Resa:** 81%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.23-3.25 (m, 2H); 3.43-3.46 (m, 2H); 3.64 (s, 3H); 7.00 (s, 1H); 7.15-7.19 (m, 1H); 7.31 (t, 2H, J=7.2 Hz); 7.35-7.40 (m, 1H); 7.68 (d, 2H, J=7.2 Hz); 7.76 (s, 1H); 7.99 (d, 1H, J=8.4 Hz), 8.86 (brs, 1H); 9.00 (s, 1H)

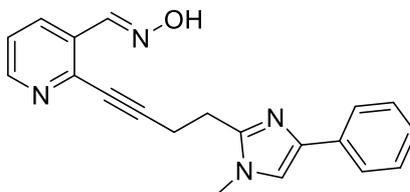
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 23.79 (CH<sub>2</sub>); 29.92 (CH<sub>2</sub>); 32.97 (CH<sub>3</sub>); 97.17 (C); 116.51 (C); 123.27 (CH); 123.33 (CH); 124.78 (CH x 2); 124.90 (CH); 126.90 (CH); 134.12 (CH x 2); 138.18 (CH); 144.28 (C); 147.40 (C); 148.62 (C); 148.65 (C); 153.22 (CH)

### **Procedura generale per la preparazione delle ossime 34A e 34C**

In atmosfera inerte, ad una soluzione dell'aldeide corrispondente in etanolo anidro (15 ml/mmol), sono stati addizionati l'idrossilammina cloridrato (1.5 eq.) e l'acetato di sodio (1.5 eq.). Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente per circa 2 ore, e comunque fino alla formazione di un precipitato bianco.

La soluzione etanolica è stata evaporata, il residuo è stato ripreso con etere etilico e lavato più volte con acqua. La fase organica è stata anidrificata e concentrata per dare un solido bianco da usare senza purificazione per la reazione successiva.

**2-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)nicotinaldeide ossima (34A)**



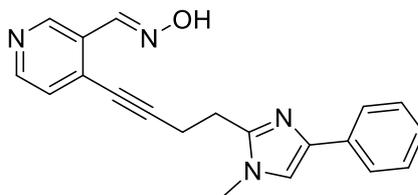
Sintetizzata secondo la procedura generale.

Isolata come solido chiaro.

**Resa:** 84%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.27-3.32 (m, 2H); 3.50-3.54 (m, 2H); 3.70 (s, 3 H); 7.07 (s, 1H); 7.32-7.37 (m, 2H); 7.45 (dd, 1H, J=4.4 e 8.4 Hz); 7.72 (t, 3H, J=7.2 Hz); 7.99-8.05 (m, 2H); 8.84 (s, 1H); 8.91 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz)

**4-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)nicotinaldeide ossima (34C)<sup>77</sup>**



Sintetizzata secondo la procedura generale.

Isolata come solido beige.

**Resa:** 76%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.95-3.08 (m, 4H); 3.67 (s, 3H); 7.32 (t, 3H, J=7.2 Hz); 7.38 (d, 1H, J=4.0 Hz); 7.52 (s, 1H); 7.72 (d, 2H, J=7.6 Hz); 8.38 (s, 1H); 8.49 (d, 1H, J=4.4 Hz); 8.93 (s, 1H); 11.82 (s, 1H).

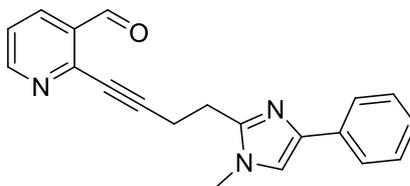
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 17.92 (CH<sub>2</sub>); 24.97 (CH<sub>2</sub>); 32.40 (CH<sub>3</sub>); 75.93 (C); 100.75 (C); 117.59 (CH); 124.00 (CH x 2); 125.85 (CH); 128.38 (CH x 2); 128.62 (C); 129.23 (C); 134.65 (C); 138.33 (C); 140.42 (CH); 144.22 (CH); 146.18 (CH); 146.45 (C); 149.42 (CH)

### **Procedura generale per la preparazione delle aldeidi 33A-D**

In una vial sono stati inseriti l'aldeide di partenza, l'alchino **27** (1.2 eq.), la trietilammina (1.5 eq.), il CuI (7%), il Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub> (3%) e la DMF anidra (10 ml/mmol). La reazione è stata condotta al microonde alla temperatura di 50 °C per 30', e comunque fino alla scomparsa dell'aldeide di partenza in TLC.

La miscela di reazione è stata diluita con etere etilico, filtrata su celite, ed il filtrato è stato anidrificato e concentrato per dare un olio grezzo scuro.

**2-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)nicotinaldeide (33A)**



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 2-bromopiridincarbossaldeide.

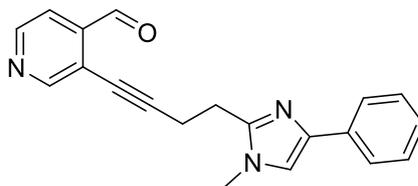
Isolato come olio giallo.

**Resa:** 74%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.09-3.15 (m, 4H); 3.68 (s, 3H); 7.10 (s, 1H); 7.21 (t, 1H, J=7.6 Hz); 7.35 (t, 3H, J=8.0 Hz); 7.73 (d, 2H, J=7.2 Hz); 8.14 (dd, 1H, J=2.0 e 8.0 Hz); 8.74 (dd, 1H, J=1.6 e 4.4 Hz); 10.45 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 18.76 (CH<sub>2</sub>); 25.62 (CH<sub>2</sub>); 32.94 (CH<sub>3</sub>); 96.80 (C); 116.75 (CH); 123.05 (CH); 124.79 (CH x 2); 126.63 (CH); 128.55 (CH x 2); 131.90 (C); 134.12 (C); 134.76 (CH); 140.30 (C); 146.14 (C); 146.45 (C); 154.30 (CH); 191.22 (CH)

**3-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)isonicotinaldeide (33B)<sup>77</sup>**



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 3-bromoisonicotinaldeide.

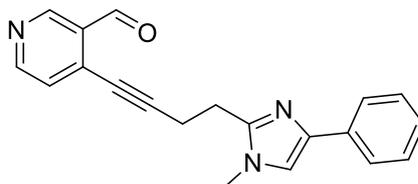
Isolato come olio giallo.

**Resa:** 69%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.00-3.10 (m, 4H); 3.63 (s, 3H); 7.06 (s, 1H); 7.29 (t, 3H, J=7.6 Hz); 7.56 (d, 1H, J=4.8 Hz); 7.67 (d, 2H, J=7.2 Hz); 8.59 (d, 1H, J=4.8 Hz); 8.72 (s, 1H), 10.33 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 24.28 (CH<sub>2</sub>); 30.29 (CH<sub>2</sub>); 32.93 (CH<sub>3</sub>); 116.57 (CH); 123.47 (CH); 124.10 (C); 124.73 (CH x 2); 125.70 (CH); 126.46 (CH); 128.53 (CH x 2); 132.06 (CH); 134.37 (C); 140.13 (C); 143.88 (C); 147.32 (C); 151.77 (C); 152.79 (CH)

**4-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)nicotinaldeide (33C)**



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 4-iodonicotinaldeide.

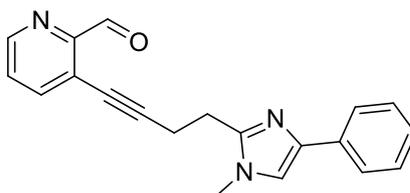
Isolato come olio giallo.

**Resa:** 77%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.07-3.12 (m, 4H); 3.67 (s, 3H); 7.12 (s, 1H); 7.23 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.33-7.39 (m, 3H); 7.74 (d, 2H, J=8.4 Hz); 8.69 (d, 1H, J=4.8 Hz); 9.03 (s, 1H); 10.43 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 18.87 (CH<sub>2</sub>); 25.59 (CH<sub>2</sub>); 32.84 (CH<sub>3</sub>); 75.47 (C); 101.91 (C); 116.61 (CH); 124.72 (CH x 2); 126.16 (CH); 126.89 (CH); 128.55 (CH x 2); 130.13 (C); 134.11 (C); 134.31 (C); 140.35 (C); 146.30(C); 149.49 (CH); 153.65 (CH); 190.77 (CH)

### 3-(4-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)but-1-in-1-il)picolinaldeide (33D)



Sintetizzata secondo la procedura generale a partire dalla 3-bromopicolinaldeide.

Isolata come olio giallo.

**Resa:** 80%

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):** 3.04-3.13 (m, 4H); 3.68 (s, 3H); 7.10 (s, 1H); 7.35 (t, 3H,  $J=7.6$  Hz); 7.40 (dd, 1H,  $J=4.8$  e 8.0 Hz), 7.73 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz); 7.82 (d, 1H,  $J=7.6$  Hz); 8.69 (d, 1H,  $J=4.4$  Hz); 10.30 (s, 1H)

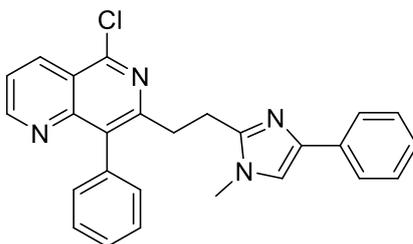
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta/\text{ppm}$ ):** 19.15 ( $\text{CH}_2$ ); 25.79 ( $\text{CH}_2$ ); 32.93 ( $\text{CH}_3$ ); 76.29 (C); 99.06 (C); 116.56 (CH); 122.11 (C); 124.72 (CH x 2); 126.55 (CH); 128.55 (CH x 2); 134.28 (C); 140.29 (C); 141.78 (CH); 146.80 (C); 148.71 (CH); 151.88 (C); 191.05 (CH)

### **Procedura generale per la preparazione dei derivati 20a e 20b**

Ad una soluzione dell'*N*-ossido corrispondente in acetonitrile (10 ml/mmol) è stato addizionato POCl<sub>3</sub> (5 eq.).

La miscela di reazione è stata refluita per 8 ore, trascorse le quali sono stati evaporati sotto vuoto il POCl<sub>3</sub> ed il solvente, il residuo è stato ripreso con diclorometano, lavato con NaHCO<sub>3</sub> sol. 10% ed acqua, anidrificato e concentrato per dare un grezzo purificato tramite F.C.

**5-cloro-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-8-fenil-1,6-naftiridina (20a)**



Sintetizzato secondo la procedura generale.

Isolato come olio scuro.

**Resa:** 19%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.32-3.35 (m, 2H); 3.37 (s, 3H); 3.53-3.58 (m, 2H); 7.09-7.14 (m, 1H); 7.19 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.30 (d, 2H, J=7.2 Hz); 7.40-7.48 (m, 5H); 7.56 (dd, 1H, J=4.0 e 8.8 Hz); 7.83 (s, 1H); 8.39 (d, 1H, J=8.8 Hz); 9.09 (d, 1H, J=4.4 Hz)

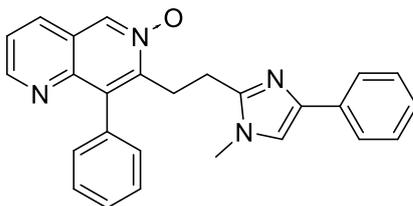
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 26.96 (CH<sub>2</sub>); 31.29 (CH<sub>3</sub>); 35.95 (CH<sub>2</sub>); 120.71 (CH); 121.21 (C); 122.86 (CH); 126.04 (CH); 126.86 (CH x 2); 128.07 (CH x 2); 128.36 (CH); 128.61 (C); 128.91 (CH x 2); 130.89 (CH x 2); 131.37 (C); 134.64 (CH); 134.86 (C); 136.61 (C); 146.98 (C); 150.71 (C); 152.68 (C); 155.41 (CH); 157.73 (C)

### **Procedura generale per la preparazione degli N-ossidi 37a e 37b**

In una vial sono stati inseriti l'N-ossido bromurato 36 solubilizzato in toluene (15 ml/mmol), l'acido boronico corrispondente (1.1 eq.), il Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (5%), il carbonato di sodio (2.2 eq.) ed una soluzione 1:2 di acqua ed etanolo (8 ml/mmol). Il tutto è stato fatto reagire al mw alla temperatura di 100 °C per 6 ore.

La miscela è stata ripresa con diclorometano e la fase organica è stata lavata più volte con acqua e brina per ottenere un grezzo da purificare tramite F. C.

**7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-8-fenil-1,6-naftiridina 6-ossido (37a)**



Sintetizzato secondo la procedura generale utilizzando l'acido fenil boronico.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 9:1

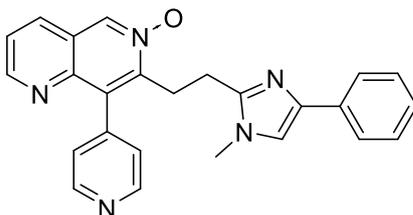
Isolato come olio scuro.

**Resa:** 15%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.33-3.38 (m, 2H); 3.47 (s, 3H); 3.58-3.62 (m, 3H); 7.20 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.31 (d, 2H, J=7.2 Hz); 7.40-7.51 (m, 7H); 8.02 (d, 1H, J=8.4 Hz); 8.08 (s, 1H); 8.83 (s, 1H); 8.94 (d, 1H, J=4.0 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 24.76 (CH<sub>2</sub>); 30.24 (CH<sub>2</sub>); 31.02 (CH<sub>3</sub>); 122.28 (C); 123.48 (CH); 124.15 (C); 125.56 (CH); 126.09 (CH); 126.78 (CH x 2); 128.10 (CH x 2); 128.41 (CH); 128.94 (CH x 2); 130.86 (CH x 2); 131.30 (C); 132.09 (CH); 134.84 (CH), 136.11 (C); 143.94 (C); 146.61 (C); 151.92 (C); 152.82 (CH); 158.91 (C)

**7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-8-(piridin-4-il)-1,6-naftiridina 6-ossido (37b)**



Sintetizzato secondo la procedura generale x utilizzando l'acido fenil boronico.

Purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 7:3

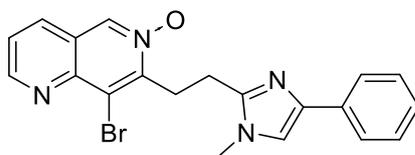
Isolato come olio scuro.

**Resa:** 11%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.32-3.37 (m, 2H); 3.57 (s, 3H); 3.55-3.60 (m, 2H); 7.17-7.26 (m, 4H); 7.27 (s, 1H); 7.35 (t, 1H, J=7.2 Hz); 7.41 (d, 1H, J=8.0 Hz); 7.45-7.52 (m, 1H); 7.73 (d, 1H, J=7.6 Hz); 8.00-8.09 (m, 2H); 8.66 (brs, 1H); 8.81-8.85 (m, 1H); 8.92-8.97 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 29.69 (CH<sub>2</sub>); 30.11 (CH<sub>2</sub>); 31.37 (CH<sub>3</sub>); 123.58 (CH); 124.14 (C); 124.74 (CH); 125.61 (CH); 126.25 (C); 126.52 (CH); 126.99 (CH); 127.35 (CH x 2); 128.35 (CH x 2); 128.55 (CH); 132.15 (CH); 133.98 (C); 136.22 (CH); 138.52 (C); 139.27 (C); 143.91 (C); 148.12 (C); 150.37 (CH); 151.57 (C); 152.93 (CH)

### 8-bromo-7-(2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)etil)-1,6-naftiridina 6-ossido



Ad una soluzione dell'ossima **34A** in diclorometano anidro è stata addizionata, a 0 °C, la N-bromosuccinimide (1.1 eq.). Trascorse 2 ore, alla reazione è stato aggiunto sodio tiosolfato sol. 0.1M.

La fase organica è stata separata e lavata con NaHCO<sub>3</sub> sol. satura e brina, anidrificata e concentrata, per dare un solido bruno da utilizzare come tale per la reazione successiva.

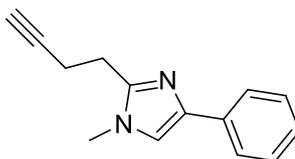
**Resa:** 90%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 3.30-3.35 (m, 2H); 3.50-3.56 (m, 2H); 3.69 (s, 3H); 7.29 (s, 1H); 7.41 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.47 (dd, 1H, J=4.0 e 8.0 Hz); 7.93 (d, 2H, J=8.0); 7.99-8.05 (m, 2H); 8.82 (s, 1H); 8.93 (d, 1H, J=4.0 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 25.13 (CH<sub>2</sub>); 29.92 (CH<sub>2</sub>); 31.96 (CH<sub>3</sub>); 100.27 (C); 123.55 (CH); 124.14 (C); 125.70 (CH); 126.64 (CH x 2); 127.05 (CH); 128.30 (CH x 2); 132.14 (CH); 133.33 (C); 136.17 (CH); 137.05 (C); 143.87 (C); 147.48 (C); 151.38 (C); 152.89 (CH)

**LC-MS m/z:** 409.1 (M<sup>+</sup>)

## 2-(but-3-in-1-yl)-1-metil-4-fenil-1H-imidazolo (**27**)<sup>77</sup>



In atmosfera inerte, in un pallone a due colli è stato solubilizzato il fenilimidazolo **27** in THF anidro (8ml/mmol). La soluzione è stata raffreddata a -10 °C, ed è stato aggiunto, a spatolate, il sodio idruro (1.5 eq.). Trascorsa mezz'ora è stato gocciolato lo ioduro di metile (1.1 eq.) e la miscela è stata lasciata in agitazione alla stessa temperatura per 6 ore. Il THF è stato evaporato sotto vuoto, il residuo ripreso con AcOEt e la fase organica lavata con acqua e brina, anidrificata e concentrata.

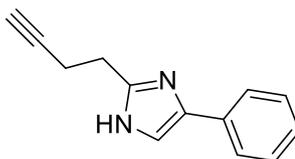
Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1 per ottenere un olio arancio molto denso.

**Resa:** 80%

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 1.99 (t, 1H, J=2.8 Hz); 2.71 (dt, 2H, J=2.8 e 7.6 Hz); 2.96 (t, 2H, J=7.2 Hz); 3.65 (s, 3H); 7.06 (s, 1H); 7.17-7.22 (m, 1H); 7.34 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.71 (dd, 2H, J=1.2 e 8.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 17.92 (CH<sub>2</sub>); 26.06 (CH<sub>2</sub>); 32.93 (CH<sub>3</sub>); 69.21 (CH); 83.29 (C); 116.51 (CH); 124.72 (CH x 2); 126.50 (CH); 128.52 (CH x 2); 134.34 (C); 140.20 (C); 147.06 (C)

### 2-(but-3-in-1-il)-4-fenil-1H-imidazolo (31)<sup>77</sup>



In un pallone sono stati inseriti l'acido 4-pentinoico ed il carbonato di cesio (0.5 eq.), solubilizzati in una soluzione 1:1 di acqua ed etanolo (4 ml/mmol). Il tutto è stato lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora; il solvente è stato rimosso a pressione ridotta ed il sale ottenuto solubilizzato in DMF (1ml/mmol) ed addizionato goccia a goccia di una soluzione di fenacil bromuro (1 eq.) in DMF. La sospensione ottenuta è stata agitata a temperatura ambiente per 15 minuti, la DMF è stata evaporata ed il residuo ripreso con AcOEt. Il solido ottenuto è stato filtrato su celite e la soluzione anidrificata e concentrata, per dare un solido arancio da riprendere con xilene (2 ml/mmol). È stato quindi addizionato acetato d'ammonio (15 eq.) ed il pallone è stato collegato al refrigerante tramite trappola di Dean-Stark. La miscela è stata portata alla temperatura di riflusso e lasciata in agitazione per 5 ore. Lo xilene è stato quindi evaporato sotto vuoto, il residuo ripreso con AcOEt, la fase organica lavata più volte con NaHCO<sub>3</sub> sol. 10% e acqua ed infine anidrificata e concentrata, per dare un grezzo da purificare tramite F.C. EtP/AcOEt 1:1.

Il prodotto è stato isolato come solido arancio bassofondente.

**Resa:** quantitativa

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 2.11 (t, 1H, J=2.4 Hz); 2.63 (dt, 2H, J=2.4 Hz e 6.8 Hz); 3.01 (t, 2H, J=6.8 Hz); 7.20-7.24 (m, 2H); 7.36 (t, 2H, J=7.6 Hz); 7.66 (d, 2H, J=4.0 Hz); 9.76 (brs, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ/ppm):** 17.81; 27.68; 70.08; 83.70; 124.71; 126.81; 128.71; 147.31

## 4.2. Biologia

### MATERIALI E METODI PER IL SAGGIO DI INIBIZIONE ENZIMATICA.

La PDE10A cataliticamente attiva è stata ottenuta come segue:

La PDE10A umana (amminoacidi 14-779 ottenuti dalla sequenza con numero di accesso NP\_006652) è stata amplificata a partire dall'RNA totale presente nel cervello attraverso il protocollo standard RT-PCR clonando la sequenza nei siti BamH1 e Not1 del pFastBac-HTb (Invitrogen).

L'espressione della PDE10A nelle cellule Sf9 derivate dal lepidottero *Spodoptera frugiperda* è stata indotta utilizzando il sistema Bac-toBac<sup>®</sup> Baculovirus Expression System (Gibco).

Le cellule sono state coltivate ad una temperatura di 27 °C utilizzando come mezzo di coltura Sf-900 II Serum-Free, contenente 50 unità/mL di penicillina e 50 g/mL di streptomina. Le cellule sono state infettate con una concentrazione di virus di 1ml su 25ml di coltura. Dopo 72h, le cellule sono state raccolte e sottoposte a lisi mediante un tampone (costituito da 50nM Tris8.0 + 1nM MgCl<sub>2</sub> + PI + 0.5% triton) per 15 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugate a 20,000g per 20minuti. La PDE10A è stata parzialmente purificata mediante Q Sepharose<sup>®</sup> e le frazioni più attive sono state riunite.

Il saggio sulla PDE10A è stato eseguito preparando campioni da 60 µl contenenti una quantità fissa di enzima (sufficiente a idrolizzare il 20-25% dei nucleotidi ciclici), un buffer (50mM HEPES 7.6, 10mM di MgCl<sub>2</sub>, 0,02% Tween20), 0,1mg/ml di BSA, 225pCi del nucleotide ciclico triziato, <sup>3</sup>H-cAMP, fino ad ottenere una concentrazione di 5nM, e quantità variabili di inibitori.

Le reazioni sono state avviate mediante aggiunta dei nucleotidi ciclici e condotte per 1 ora a temperatura ambiente prima di essere terminate mediante miscelazione con 15 µl di silicato di ittrio (8mg/ml) in perle (Amersham).

Dopo 1 ora al buio i granuli sono stati controllati con un contatore Wallac 1450Microbeta. I segnali misurati sono stati convertiti in attività relativa paragonandoli ad un controllo non-inibibile(100%) e i valori di IC<sub>50</sub> sono stati calcolati usando l'estensione Xlfit di EXCEL.

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

## Bibliografia

---

<sup>1</sup> Ashman, D.F.; Lipton, R.; Melicow, M.M.; Price, T.D. Isolation of adenosine 3',5' monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 330-334.

<sup>2</sup> Sutherland E.W. Studies on the mechanism of hormone action. *Science* **1972**, *177*, 401-408

<sup>3</sup> Beavo, J. A.; Brunton, L. L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 710–718.

<sup>4</sup> Derbyshire, E.; Marletta, M. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 533-599

<sup>5</sup> Holz, G. G. Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor–Mediated Signal Transduction in the Pancreatic  $\beta$ -Cell. *Diabetes* **2004**, *53*, 5–13.

<sup>6</sup> Walker, W. H.; Habener, J. F. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* **1996**, *7*, 133-138.

<sup>7</sup> Conti, M.; Beavo, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *76*, 481-511

<sup>8</sup> Francis, S.; Blount, M.; Corbin, J. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanism and physiological functions. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 651-690

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

<sup>9</sup> Rall, T.; Sutherland, E. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **1958**, *232*, 1065-1076

<sup>10</sup> Houslay, M. D.; Baillie, G. S.; Maurice, D. H. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 950-966

<sup>11</sup> Brunton, L.; Hayes, J.; Mayer, S. Functional compartmentation of cyclic cAMP and protein kinase in heart. *Adv. Cycl. Nucleotide Res.* **1981**, *14*, 391-397

<sup>12</sup> Keravis, T.; Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic development. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *81*, 533-559

<sup>13</sup> Packer, M.; Carver, J. R.; Rodeheffer, R. J.; Ivanhoe, R. J.; DiBianco, R.; Zeldis, S. M.; Hendrix, J. H.; Bommer, W. J.; Elkayam, U.; Kukin, M. L.; Mallis, G. I.; Sollano, J. A.; Shannon, J.; Tandon, P. K.; DeMets, D. L. Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. *N Engl J Med* **1991**, *325*, 1468-1475

<sup>14</sup> Boswell-Smith, V.; Spina, D.; PDE4 inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COPD-focus on roflumilast. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2007**, *2*, 121-129

<sup>15</sup> Doggrell, S. A. Comparison of clinical trials with sildenafil, vardenafil and tadalafil in erectile dysfunction. *Expert Opin Pharmacother.* **2005**, *6*, 75-84.

<sup>16</sup> Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* **1996**, *8*, 47-52.

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

- 
- <sup>17</sup> Schudt, C.; Hatzelmann, A; Beume, R.; Tenor, H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 1-46
- <sup>18</sup> Thompson, W.; Terasaki, W.; Epstein, P.; Strada, S. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. *Adv. Cycl. Nucleotide Res.* **1979**, *10*, 69-92
- <sup>19</sup> Thompson, W.; Appleman M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase & cyclic AMP. *Ann. NY Acad. Sci.* **1971**, *185*, 36-41
- <sup>20</sup> Yamamoto, T. et al. Selective inhibition of two cAMP PDEs partially purified from calf liver. *Biochem.* **1983**, *258*, 14173-14177
- <sup>21</sup> Weishaar, R.; Cain, M.; Bristol, J. A. A new generation of phosphodiesterase inhibitors: multiple molecular forms of phosphodiesterase and the potential for drug selectivity. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 537-545
- <sup>22</sup> Lugnier, C.; Schoeffter, P.; Le Bec, A.; Strouthou, E.; Stoclet, J. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 1743-1751
- <sup>23</sup> Ke, H.; Wang, H. Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 391-403
- <sup>24</sup> Pandit, J.; Forman, M. D.; Fennell, K. F.; Dillman, K. S.; Menniti, F. S. Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from X-ray structure of a near full-length construct. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 18225-18230

- 
- <sup>25</sup> Ke, H.; Wang, H.; Ye, M. Structural insight into the substrate specificity of phosphodiesterases. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *204*, 121-132
- <sup>26</sup> Card, J. J. Et al. Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases. *Structure*, **2004**, *12*, 2233-2247
- <sup>27</sup> Zhang, K.; Card, G.; Suzuki, Y.; Artis, D. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 279-286
- <sup>28</sup> Jeon, Y. H.; Heo, Y. S.; Kim, C. M.; Hyun, Y. L.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1198–1220
- <sup>29</sup> Loughney, K.; Snyder, P. B.; Uher, L.; Rosman, G. J.; Ferguson, K.; Florio, V. A. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*, **1999**, *234*, 109– 117
- <sup>30</sup> Fujishige, K.; Kotera, J.; Michibata, H.; Yuasa, K.; Takebayashi, S.; Okumura, K.; Omori, K. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A) *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18438– 18445
- <sup>31</sup> Soderling, S. H.; Bayuga, S. J.; Beavo, J. A. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7071– 7076
- <sup>32</sup> Seeger, T. F.; Bartlett, B.; Coskran, T. M.; Culp, J. S.; James, L. C.; Krull, D. L.; Lanfear, J.; Ryan, A. M.; Schmidt, C. J.; Strick, C. A.; Varghese, A. H.; Williams, R. D.; Wylie, P. G.; Menniti, F. S. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain *Brain Res.* **2003**, *985*, 113– 126

- 
- <sup>33</sup> Lakics, V.; Karran, E. H.; Boess, F. G. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues *Neuropharmacology* **2010**, 59, 367– 374
- <sup>34</sup> Kotera, J.; Fujishige, K.; Yuasa, K.; Omori, K. Characterization and phosphorylation of PDE10A2, a novel alternative splice variant of human phosphodiesterase that hydrolyzes cAMP and cGMP *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 261, 551– 557
- <sup>35</sup> Kotera, J.; Sasaki, T.; Kobayashi, T.; Fujishige, K.; Yamashita, Y.; Omori, K. Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 4366– 4375
- <sup>36</sup> Clementi, E.; Bagetta, G.; Nisoli, E.; Nistico, G. Farmacologia dell'ossido nitrico. In *Farmacologia generale e molecolare*, Ed. 3a; Paoletti, R.; Nicosia, S.; Clementi, F.; Fumagalli, G.; UTET: **2004**, 580-598.
- <sup>37</sup> Heikaus, C. C.; Pandit, J.; Klevit, R. E. Cyclic Nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights *Structure* **2009**, 17, 1551– 1557
- <sup>38</sup> Xie, Z.; Adamowicz, W. O.; Eldred, W. D.; Jakowski, A. B.; Kleiman, R. J.; Morton, D. G.; Stephenson, D. T.; Strick, C. A.; Williams, R. D.; Menniti, F. S. Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience*, **2006**, **139**, 597-607
- <sup>39</sup> Charych, E. I.; Jiang, L.-X.; Lo, F.; Sullivan, K.; Brandon, N. J. Interplay of palmitoylation and phosphorylation in the trafficking and localization of phosphodiesterase 10A: implications for the treatment of schizophrenia *J. Neurosci.* **2010**, 30, 9027– 9037

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

<sup>40</sup> Dlaboga, D.; Hajjhussein, H.; O'Donnell, J. M. Chronic haloperidol and clozapine produce different patterns of effects on phosphodiesterase-1B, -4B, and -10A expression in rat striatum. *Neuropharmacology*, **2008**, *54*, 745-754

<sup>41</sup> Gerfen, C. R.; Surmeier, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 441-466

<sup>42</sup> Keibian, J. W.; Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **1979**, *277*, 93-96

<sup>43</sup> Jackson, D. M.; Westlind-Danielsson, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 291-270

<sup>44</sup> Hersch, S. M.; Ciliax, B.; Gutekunst, C. A.; rees, H. D.; Heilman, C. J.; Yung, K. K.; Bolam, J. P.; Ince, E.; Yi, H.; Levey, A. I. Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 5222-5237

<sup>45</sup> Nishi, A.; Kuroiwa, M.; Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P.; Bateup, H. S.; Shuto, T.; Sotogaku, N.; Fukuda, T.; Heintz, N.; Greengard, P.; Snyder, G. L. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKAsignaling in the striatum. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10460-10471

<sup>46</sup> Schultz, S. H.; North, S. W.; Shields, C. G. Schizophrenia: a review. *American Family Physician*, **2007**, *75*, 1821-1829

<sup>47</sup> Kingell, K. Schizophrenia drug gets negative results for negative symptoms. *Nature Reviews/Drug Discovery* **2014**, *13*, 244-245

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

- 
- <sup>48</sup> Siuciak, J. A.; Chapin, D. S.; Harms, J. F.; Lebel, L. A.; McCarthy, S. A.; Chambers, L.; Shrikhande, A.; Wong, S.; Menniti, F.S.; Schmidt, C. J. Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 386-396
- <sup>49</sup> Siuciak, J. A.; McCarthy, S.A.; Chapin, D. S.; Fujiwara, R. A.; James, L. C.; Williams, L. D.; Stock, J.L.; McNeish, J. D.; Strick, C. A.; Menniti, F. S.; Schmidt, C. J. Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: Evidence for altered striatal function, *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 374-385
- <sup>50</sup> Hebb, A. L.; Robertson, H. A.; Denovan-Wright, E. M. Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms. *Neuroscience* **2004**, *123*, 967-981
- <sup>51</sup> Choi, Y. S.; Lee, B.; Cho, H. Y.; Reyes, I. B.; Pu, X. A.; Saido, T. C.; Hoyt, K. R.; Obrietan, K. CREB is a key regulator of striatal vulnerability in chemical and genetic models of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *36*, 259-268
- <sup>52</sup> Giampà, C.; Laurenti, D.; Anzilotti, S.; Bernardi, G.; Menniti, F. S.; Fusco, F. R. Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13417
- <sup>53</sup> Hornykiewicz, O. Parkinson's disease and its chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24*, 1061-1065
- <sup>54</sup> Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Del Tredici, K.; Braak, H. 100 years of Lewi pathology. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 13-24

---

<sup>55</sup> Schapira, A. H.; Tolosa, E- Molecular and clinical prodrome of Parkinson's disease: implications for treatment. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 309-317

<sup>56</sup> Albin, R. L.; Young, A. B.; Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 366-375

<sup>57</sup> Surmeier, D. J.; Ding, J.; Day, M.; Wang, Z.; Shen, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends. Neurosci.* **2007**, *30*, 228-235

<sup>58</sup> Park, D. J.; Campbell, P. W.; Mudrakola, V. et al. Inhibition of phosphodiesterase 10A modulates levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian rats. *Society for Neuroscience Abstract*, **2011**, 37

<sup>59</sup> Pandit, J. Crystal Structure of Catalytic Domain of Rat 3',5'-Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE10A) Inhibitor Complex and Uses in the Discovery of Psychotherapeutic Drugs. US2005202550A1, **2005**; 72 pp.

<sup>60</sup> Handa, N.; Mizohata, E.; Kishishita, S.; Toyama, M.; Morita, S.; Uchikubo-Kamo, T.; Akasaka, R.; Omori, K.; Kotera, J.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Crystal structure of the GAF-B domain from human phosphodiesterase 10A complexed with its ligand, cAMP. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 19657-19664

<sup>61</sup> Chappie, T. A.; Helal, C. J.; Hou, X. Current Landscape of Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibition *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7299–7331

<sup>62</sup> Pandit, J. (Pfizer, Inc.). Crystal structure of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE10A) and uses thereof. Patent US20050202550

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

<sup>63</sup> Andersen, O. A.; Schonfeld, D. L.; Toogood-Jonson, I.; Felicetti, B.; Albrecht, C.; Fryatt, T.; Whittaker, M.; Hallett, D.; Barker, J. Cross-linking of protein crystals as an aid in the generation of binary protein-ligand crystal complexes, exemplified by the human PDE10A-papaverine structure. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2009**, *65* (pt. 8), 872-874

<sup>64</sup> Chappie, T.; Humphrey, J.; Menniti, F.; Schmidt, C. PDE10A inhibitors: An assessment of the current CNS drug discovery landscape. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2009**, *12*, 458-467

<sup>65</sup> Chappie, T. A.; Humprey, J. M.; Allen, M. P.; Kimberly, G. E.; Fox, C. B.; Lebel, L. A.; Liras, S.; Marr E. S.; Menniti, F. S.; Pandit, J.; Schmidt, C. J.; Tu, M.; Williams, R. D.; Yang, F. V. Discovery of a Series of 6,7-Dimethoxy-4-pyrrolidylquinazoline PDE10A Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 182-185

<sup>66</sup> Ho, G. D.; Michael, S. W.; Bercovici, A.; Tulshian, D.; Greenlee, W. J.; Van Rijn, R.; Hruza, A.; Xiao, L.; Rindgen, D.; Mullins, D.; Guzzi, M.; Zhang, X.; Bleickardt, C.; Hodgson, R. The SAR development of dihydroimidazoisoquinoline derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors for the treatment of schizophrenia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 458-467

<sup>67</sup> Kehler, J.; Nielsen, J.; Christoffersen, C. T.; Ritzen, A.; Langgaard, M.; Steiniger-Brach, B.; Kreilgaard, M. Discovery and SAR exploration of quinazoline and cyanoisoquinoline inhibitors of phosphodiesterase 10A (PDE10A). *243<sup>rd</sup> Natl. Meet. ACS (March 25-29, San Diego)*, **2012**, Abst. MEDI 24

<sup>68</sup> Yang, S.-W.; Smotrski, J.; McElroy, W. T.; Tan, Z.; Ho, G.; Tulshian, D.; Greenlee, W. J.; Guzzi, M.; Zhang, X.; Mullins, D.; Xiao, L.; Hruza, A.; Chan, T.-M.; Rindgen, D.; Bleickardt, C.; Hodgson, R. Discovery of orally active pyrazoloquinolines as potent

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

PDE10 inhibitors for the management of schizophrenia *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 235– 239

<sup>69</sup> Malamas, M. S.; Ni, Y.; Erdei, J.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.-J.; Grunwald, C.; Fan, K. Y.; Parris, K.; Langen, B.; Egerland, U.; Hage, T.; Marquis, K. L.; Grauer, S.; Brennan, J.; Navarra, R.; Graf, R.; Harrison, B. L.; Robichaud, A.; Kronbach, T.; Pangalos, M. N.; Hoefgen, N.; Brandon, N. J. Highly Potent, Selective, and Orally Active Phosphodiesterase 10A Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5188-5196

<sup>70</sup> Höfgen, N.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.J.; Grunwald, C.; Langen, B.; Egerland, U.; Tremmel, P.; Pangalos, M. N.; Marquis, K. L.; Hage, T.; Harrison, B. L.; Malamas, M. S.; Brandon, N. J.; Kronbach, T. Discovery of imidazo[1,5-a]pyrido[3,2-e]pyrazines as a new class of phosphodiesterase 10A inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4399-4411

<sup>71</sup> Verhoest, P. R.; Chapin, D. S.; Corman, M.; Fonseca, K.; Harms, J. F.; Hou, X.; Marr, E. S.; Menniti, F. S.; Nelson, F.; O'Connor, R.; Pandit, J.; Proulx-LaFrance, C.; Schmidt, A. W.; Schmidt, C. J.; Suiciak, J. A.; Liras, S. Discovery of a novel class of phosphodiesterase 10A inhibitors and identification of clinical candidate 2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy-methyl]-quinoline (PF-2545920) for the treatment of schizophrenia *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5188– 5196

<sup>72</sup> Schmidt, C. J.; Chapin, D. S.; Cianfrogna, J.; Corman, M. L.; Hajos, M.; Harms, J. F.; Hoffman, W. E.; Lebel, L. A.; McCarthy, S. A.; Nelson, F. R.; Proulx-LaFrance, C.; Majchrzak, M. J.; Ramirez, A. D.; Schmidt, K.; Seymour, P. A.; Siuciak, J. A.; Tingley, F. D., III; Williams, R. D.; Verhoest, P. R.; Menniti, F. S. Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 681– 690

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

<sup>73</sup> Bauer, U.; Giordanetto, F.; Bauer, M.; O'Mahony, G.; Johansson, K. E.; Knecht, W.; Hartleib-Geschwindner, J.; Carlsson, E. T.; Enroth, C. Discovery of 4-hydroxy-1,6-naphthyridine-3-carbonitrile derivatives as novel PDE10A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1019-1022

<sup>74</sup> Helal, C. J.; Kang, Z.; Hou, X.; Pandit, J.; Chappie, T. A.; Humphrey, J. M.; Marr, E. S.; Fennell, K. F.; Chenard, L. K.; Fox, C.; Schmidt, C. J.; Williams, R. D.; Chapin, D. S.; Siuciak, J.; Lebel, L.; Menniti, F.; Cianfrogna, J.; Fonseca, K. R.; Nelson, F. R.; O'Connor, R.; MacDougall, M.; McDowell, L.; Liras, S. Use of structure-based design to discover a potent, selective, in vivo active phosphodiesterase 10A inhibitor lead series for the treatment of schizophrenia *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4536– 4547

<sup>75</sup> Kehler, J.; Ritzen, A.; Langgård, M.; Petersen, S. L.; Farah, M. M.; Bundgaard, C.; Christoffersen, C. T.; Nielsen, J.; Kilburn, J. P. Triazoloquinazolines as a novel class of phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitors *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3738– 3742

<sup>76</sup> Asproni, B.; Murineddu, G.; Pau, A.; Pinna, G. A.; Langgård, M.; Christoffersen, C. T.; Nielsen, J.; Kehler, J. Synthesis and SAR study of new phenylimidazole-pyrazolo[1,5-c]quinazolines as potent phosphodiesterase 10A inhibitors *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 642– 649

<sup>77</sup> Dore, A.; Asproni, B.; Scampuddu, A.; Pinna, G. A.; Christoffersen, C. T.; Langgaard, M.; Kehler, J. Synthesis and SAR study of novel tricyclic pyrazoles as potent phosphodiesterase 10A inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 181-193

<sup>78</sup> Chen, Z.; Yang, X.; Wu, J. AgOTf-catalyzed tandem reaction of *N'*-(2-alkynylbenzylidene)hydrazide with alkyne. *Chem. Commun.* **2009**, *23*, 3469-3471

Scampuddu Alessia, *Sintesi, studi SAR e valutazione biologica di nuove molecole a piattaforma naftiridinica quali inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A*. Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, Indirizzo Scienze Farmaceutiche, XXVIII ciclo, Università degli Studi di Sassari

---

<sup>79</sup> Numata, A.; Yoshinori, K.; Takao, S. General synthetic method for naphthyridines and their *N*-oxides containing isoquinolinic nitrogen *Synthesis*, **1999**, *2*, 306-311

<sup>80</sup> Sakamoto, T.; Kondo, Y.; Miura, N.; Hayashi, K.; Yamanak Condensed heteroaromatic ring systems. XI: A facile synthesis of isoquinoline *N*-oxides *Heterocycles* **1986**, *24*, 2311-2314