



Università degli Studi di Sassari

**Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche –Indirizzo di Scienze Farmaceutiche**

**XXVI CICLO**

**Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

**Presentata da: Dr.ssa Marilena Pira**

**Coordinatore della scuola: Prof. Stefano Enzo**

**Relatore: Dr. Gabriele Murineddu PhD**

Anno Accademico 2012-2013



Università degli Studi di Sassari

**Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche –Indirizzo di Scienze Farmaceutiche**

**XXVI CICLO**

**Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

**Presentata da: Dr.ssa Marilena Pira**

**Coordinatore della scuola: Prof. Stefano Enzo**

**Relatore: Dr. Gabriele Murineddu PhD**

Anno Accademico 2012-2013

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

<b>1.0</b>	<b>Introduzione</b> .....	<b>4</b>
1.1	<i>I cannabinoidi:</i> .....	4
1.2	<i>Cannabinoidi e obesità</i> .....	13
<b>2.0</b>	<b>Derivati <math>\alpha</math>-ariltiofenici</b> .....	<b>20</b>
2.1	<i>Introduzione</i> .....	20
2.2	<i>Sintesi</i> .....	21
2.3	<i>Determinazione dei coefficienti di ripartizione Ottanolo/Acqua e predizione in silico dell'attraversamento della BBB.</i> .....	23
2.4	<i>Valutazione in vitro ed ex vivo dei composti 1a-c e 2a-d.</i> .....	29
2.4.1	<i>Esperimenti di Radioreceptor Binding.</i> .....	29
2.4.2	<i>Determinazione dell'attività con il metodo degli organi isolati.</i> .....	30
2.4.3	<i>Determinazione dell'attività mediante test su linee cellulari.</i> .....	32
2.5	<i>Test in vivo su modelli animali di obesità</i> .....	36
2.5.1	<i>Trattamento in acuto</i> .....	38
2.5.2	<i>Trattamento in cronico su topi C57BL/6J-DIO</i> .....	39
2.5.3	<i>Studi sui meccanismi molecolari di azione</i> .....	43
2.6	<i>Conclusioni</i> .....	55
<b>3.0</b>	<b>Derivati piridinici</b> .....	<b>56</b>
3.1	<i>Introduzione</i> .....	56
3.2	<i>Sintesi</i> .....	58
3.4	<i>Conclusioni</i> .....	65
<b>4.0</b>	<b>Derivati <math>\alpha</math>-bromo-pirrolici</b> .....	<b>56</b>
4.1	<i>Introduzione</i> .....	66
4.2	<i>Progettazione del processo sintetico</i> .....	66
4.3	<i>Conclusioni</i> .....	69
<b>5.0</b>	<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>70</b>
5.1	<i>Radioligand Binding Assays</i> .....	70
5.2	<i>Saggi in vitro su linee cellulari. Determinazione dell'espressione della P-ERK 1/2</i> .....	70
5.3	<i>Studio in vivo su modelli animali di obesità</i> .....	72
5.3.1	<i>Animali</i> .....	72
5.3.2	<i>Trattamento cronico</i> .....	73
5.3.3	<i>Determinazione dei parametri ematici</i> .....	73
5.3.4	<i>Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA.</i> .....	73
5.3.5	<i>Real Time PCR</i> .....	74

5.3.6 <i>Analisi statistiche</i> .....	74
5.4 <i>Chimica</i> .....	74
6.0 <i>Sintesi e caratterizzazione</i> .....	76
6.1 <i>Derivati <math>\alpha</math>-aril-tienilici</i> .....	76
6.2 <i>Derivati piridinici</i> .....	98
7.0 <i>Bibliografia</i> .....	120

## **1.0 Introduzione**

### **1.1 I cannabinoidi:**

I cannabinoidi sono composti derivati dalla Cannabis Sativa, comunemente conosciuta come marijuana. La più antica testimonianza dell'uso di cannabis è data 2737 a.C. e, benché non si abbia una precisa documentazione storica nei secoli successivi, si ritiene che il suo uso come sostanza psicotropa abbia subito una progressiva diffusione dalla Cina all'India e quindi all'Africa Settentrionale<sup>[1]</sup>. L'uso della cannabis come sostanza psicoattiva fu introdotto in Europa in tempi abbastanza recenti, probabilmente ad opera di Napoleone, che, interessato alle sue proprietà analgesiche e sedative, favorì la diffusione della Cannabis indica, più ricca di principi attivi stupefacenti rispetto alla Cannabis sativa, che era invece maggiormente diffusa in Europa.

Il primo a dimostrare scientificamente e a divulgare il valore curativo della cannabis fu Sir William B. O'Shaughnessy intorno al 1840<sup>[2]</sup>. In seguito, fino agli inizi del XX secolo, in Europa e negli Stati Uniti vengono pubblicati numerosi articoli sui molteplici usi terapeutici della cannabis. Agli inizi del 1900 il suo uso raggiunse una tale diffusione da essere inserita nella farmacopea ufficiale americana. Nel 1937 negli USA, la cannabis viene inserita nell'elenco degli stupefacenti, perciò la coltivazione e l'uso, anche a scopo terapeutico, diventano illegali. Di conseguenza anche in Europa l'utilizzo diminuisce drasticamente ed anche il numero di pubblicazioni sull'argomento si riduce fino ad azzerarsi per interi decenni<sup>[1,2]</sup>.

Nonostante l'antichissima esperienza dell'uomo riguardo gli effetti della cannabis, le conoscenze chimiche e fisiologiche relative ai cannabinoidi sono relativamente recenti.

Nella marijuana sono stati individuati almeno 66 composti, detti fitocannabinoidi, tra i quali i tetraidrocannabinoli (THC) ed in particolare il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) scoperto nel 1964 da Gaoni e Mechoulam, sono considerati i più attivi<sup>[1,3]</sup>. Ad essi sono infatti correlate le proprietà che hanno portato all'uso della marijuana come agente terapeutico di origine naturale, come l'effetto analgesico, l'attività antinfiammatoria, la riduzione della pressione sanguigna ed intraoculare, l'attività antiemetica, ma anche gli effetti negativi, con particolare riferimento alla distorsione psicologica della percezione, alla perdita della coordinazione motoria, all'euforia e all'effetto sedativo<sup>[4]</sup>. Il  $\Delta^9$ -THC è contenuto principalmente nelle

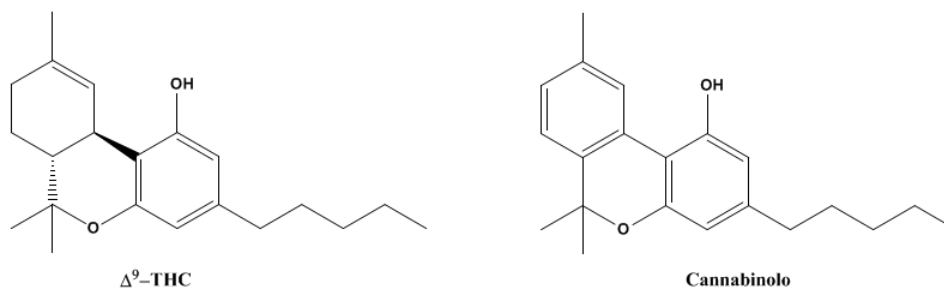
Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

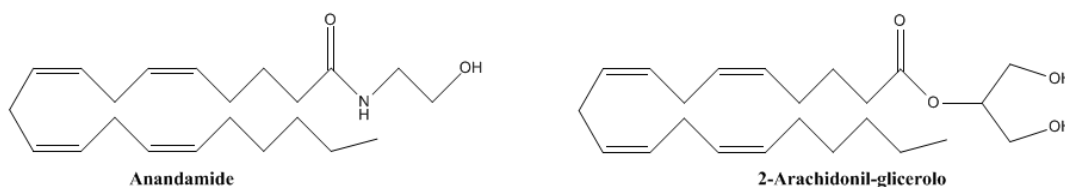
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

parte aeree delle piante di *Cannabis indica L.* La via più comune di assunzione è attraverso il fumo di sigarette alla *Cannabis* attraverso il quale viene assorbito il 20% del contenuto di principio attivo. L'interazione dei recettori per i cannabinoidi con i ligandi come il THC, inoltre, provoca il rilascio di dopamina a livello del sistema limbico di gratificazione<sup>[5]</sup>.



La scoperta del  $\Delta^9$ -THC ha gettato le basi per l'identificazione, negli anni novanta, di un intero sistema cannabinoide endogeno di segnalazione, noto come il sistema degli endocannabinoidi (ECS), costituito da due tipi di recettori, indicati come CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, oltre che dai loro ligandi endogeni, l'anandamide (AN) e il 2-arachidonil-glicerolo (2-AG), detti endocannabinoidi, e dalle loro molteplici vie metaboliche per la sintesi, la degradazione ed il reuptake. I cannabinoidi esogeni derivati dalle piante, e poi sintetizzati chimicamente, sono stati importanti per scoprire i bersagli a cui essi si legavano e quindi per l'identificazione delle molecole endogene presenti nell'organismo<sup>[3]</sup>.



L'azione farmacologica dei cannabinoidi appare quindi direttamente correlata alla loro affinità verso le due classi di recettori specifici sopra citati, che appartengono alla famiglia dei recettori di membrana accoppiati alla proteina G (G protein-coupled receptors). Questi recettori differiscono per la sequenza amminoacidica, il meccanismo di signaling e la

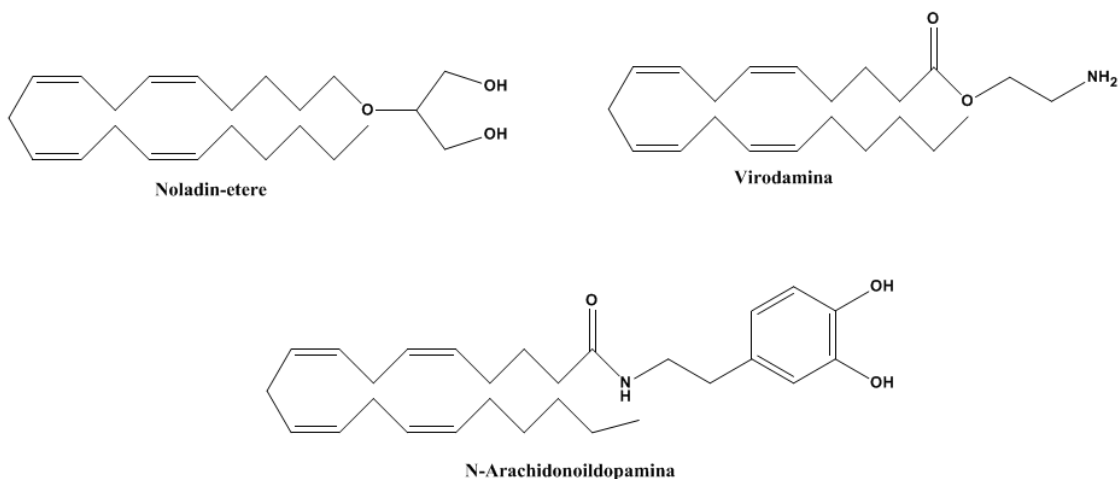
distribuzione nei tessuti. I tipi di recettori cannabinoidi sono identificati con l'abbreviazione CB e numerati in ordine di scoperta con un pedice.

I recettori CB<sub>1</sub> sono presenti in differenti specie di mammiferi e nell'uomo, mostrando un'elevata similitudine interspecie, che per esempio tra ratto, topo e uomo è compresa tra il 97 ed il 99%. I recettori CB<sub>1</sub> si sono rivelati tra i più abbondanti recettori presenti nel sistema nervoso centrale, con massima espressione nei nuclei della base, nell'ippocampo, nel cervelletto, nella corteccia cerebrale e nel *nucleus accumbens*<sup>[2,3]</sup>. Una minore concentrazione è invece localizzata in altre aree quali il tronco encefalico, in cui sono localizzati i centri regolatori della respirazione e della funzione cardiaca. Basse densità recettoriali sono state identificate anche in alcuni tessuti periferici. I recettori CB<sub>1</sub> sono costituiti da sette segmenti transmembrana con le porzioni C-terminale e N-terminale intracellulari ed hanno un ruolo chiave sulla trasduzione del segnale. In particolare, l'interazione tra recettore associato a proteina G inibitoria e il ligando cannabinoide, causa inibizione dell'adenilato ciclasi, dei canali del Ca<sup>2+</sup>, N e P/Q, attiva quelli al potassio e stimola le MAP-kinasi.

I recettori CB<sub>2</sub> mostrano un 48% di omologia con il recettore cannabinoide CB<sub>1</sub>. Sono espressi nei tessuti periferici (tonsille, timo, milza, pancreas), nelle terminazioni nervose periferiche, nelle cellule tumorali, abbondantemente nei vari tipi di cellule infiammatorie e immunocompetenti e, recentemente, sono stati identificati nel sistema nervoso centrale (SNC)<sup>[2,3]</sup>. Sebbene questi recettori non sembrano essere presenti nella maggior parte dei neuroni del SNC, sono espressi nelle cellule microgliali, in particolare durante la neuro-infiammazione, e sono attivati dal 2-AG e, con minore efficacia, dall'AN. Anche il recettore CB<sub>2</sub>, come il CB<sub>1</sub>, è in grado di inibire l'adenilato ciclasi e attivare la MAP-kinasi<sup>[4-7]</sup>.

Recentemente sono stati identificati nuovi potenziali endocannabinoidi, ampliando così la famiglia che, attualmente comprende diversi composti tra i quali la virodamina, il noladintene e l'*N*-arachidonoidopamina<sup>[8-9]</sup>.





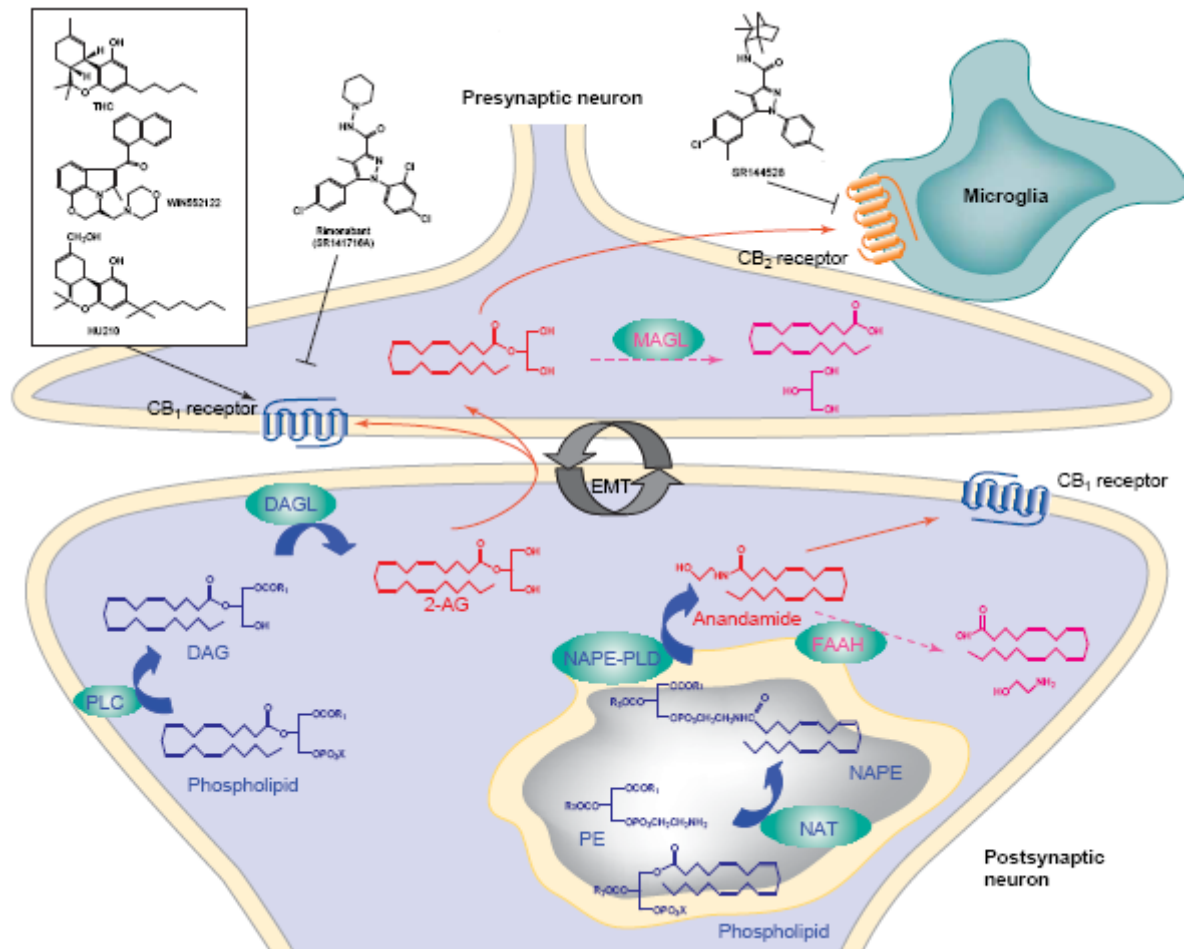
La produzione degli endocannabinoidi avviene all'interno delle cellule neuronali, ed è prevalentemente indotta da elevate concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{2+}$  (come per esempio durante la depolarizzazione della membrana postsinaptica), anche se sono stati proposti meccanismi  $\text{Ca}^{2+}$  indipendenti, quali l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato e dell'acetilcolina<sup>[9]</sup>. La biosintesi dell'anandamide avviene attraverso un precursore fosfolipidico, *N*-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE), che viene sintetizzato a partire da fosfatidiletanolamina (PE) ed un altro fosfolipide ad opera di una *N*-acil-trasferasi (NAT). La NAPE viene quindi idrolizzata ad anandamide da una specifica fosfolipasi-D (NAPE-PLD). Per contro, la biosintesi del 2-AG avviene attraverso la formazione del precursore diacilglicerolo (DAG), catalizzata da una fosfolipasi-C (PLC), a partire da fosfolipidi, seguita dall'idrolisi del DAG da parte delle lipasi specifiche (DAGLs). Il rilascio degli endocannabinoidi avviene immediatamente dopo la sintesi, senza un immagazzinamento intermedio in vescicole come accade per altri neuro modulatori<sup>[10]</sup>. Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti<sup>[11]</sup>, comportandosi così da mediatori autocrini o paracrini. Infatti la loro natura chimica estremamente poco idrosolubile ne ostacola la diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue<sup>[11]</sup>. Infine gli endocannabinoidi sono sottoposti a meccanismi di ricaptazione, probabilmente mediati da un carrier specifico la cui identità molecolare non è ancora stata individuata, quindi vanno incontro a degradazione enzimatica. La degradazione dell'ANad opera della amide-idrolasi per gli acidi grassi (fatty acid amide hydrolase = FAAH) avviene a livello post-sinaptico sulle membrane intracellulari, mentre quella del 2-AG, per azione delle monoacilglicerol lipasi (MAGLs), avviene a livello pre-sinaptico nel citosol e sulle membrane intracellulari.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



**Fig. 1.1** Il sistema endocannabinoide. Vie metaboliche dei due principali endocannabinoide, anandamide (AN) e 2-arachidonilglicerolo (2-AG), e loro più probabile localizzazione nei neuroni pre- e post-sinaptici.

Il sistema endocannabinoide è coinvolto in molteplici meccanismi di controllo e di adattamento dell'organismo. In generale il sistema ha una funzione di riequilibrio come risposta a perturbazioni o stress. Ad esempio, durante un digiuno prolungato dovuto al salto di un pasto, il sistema endocannabinoide si attiva e produce gli stimoli della fame, mentre con l'assunzione di cibo si disattiva, poichè l'organismo si riporta alla situazione di equilibrio. In quanto prodotti *on demand*, gli endocannabinoide sono i mediatori ideali per rispondere in tempo reale allo stato nutrizionale in costante mutamento di un organismo<sup>[11]</sup>.

Ampi studi sono stati finora condotti per comprendere il ruolo fisio-patologico degli endocannabinoide, ma a causa della complessità e della plasticità dei sistemi coinvolti ancora molti aspetti devono essere chiariti. Sulla base di ciò che è già noto si può comunque ipotizzare un ruolo centrale in numerose funzioni<sup>[10,12]</sup>, quali:

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

- coinvolgimento nei meccanismi che modulano l'appetito. Tale aspetto è stato recentemente evidenziato da un significativo aumento dei livelli di endocannabinoidi in tre differenti modelli animali di obesità. Questi effetti potrebbero essere spiegati con l'interazione del sistema cannabinoide con i più importanti sistemi neurotrasmettitoriali e vie metaboliche che sono coinvolte nel controllo del consumo di cibo.
- Stimolazione del sistema neuronale mesolimbico dopaminergico, che si trova alla base del circuito e che regola l'azione dei farmaci d'abuso ed in particolare della nicotina. I risultati ottenuti sui recettori CB<sub>1</sub> suggeriscono che il sistema cannabinoide incrementa la predisposizione o sensibilità della specie animale all'assunzione di nicotina o etanolo. Per questo motivo l'utilizzo di antagonisti potrebbe essere un valido aiuto per la disassuefazione da fumo e per il trattamento dell'alcolismo.
- Coinvolgimento nei processi che regolano la memoria, con particolare attenzione alla fase di estinzione di memorie avverse. E' stato infatti dimostrato come l'assunzione di  $\Delta^9$ -THC incrementi i processi di memorizzazione e consolidi la capacità di imparare nei roditori. Questi effetti sembrano essere mediati dai recettori CB<sub>1</sub>.
- Modulazione della spasticità associata alla sclerosi multipla.
- Attività analgesica degli endocannabinoidi e le loro interazioni sinergiche con il sistema degli oppioidi endogeni.
- Regolazione dei circuiti cerebrali del vomito con conseguenti proprietà antiemetiche.
- Proprietà anticonvulsivanti. In particolare l'anandamide si è rivelata efficace in un modello animale di epilessia, indicando che probabilmente l'attività convulsiva è modulata dal tono del sistema cannabinoide endogeno.
- Azione vasodilatatoria e ipotensiva nella genesi dell'ipotensione associata a shock emorragico ed endotossinico.
- Regolazione dei processi riproduttivi, in particolare l'anandamide sembra giocare un ruolo cruciale nella regolazione della fertilità, nel processo di attecchimento dell'embrione e nella progressione della gestazione.
- Modulazione della risposta immunitaria e possibile ruolo terapeutico nelle malattie infiammatorie croniche intestinali.
- Azione anti-ossidante.

- Possibile funzione "anti-stress" simile e complementare a quella esercitata dalle endorfine sia a livello centrale che periferico.
- Regolazione dei processi di proliferazione cellulare che sono alla base della crescita dei tumori.

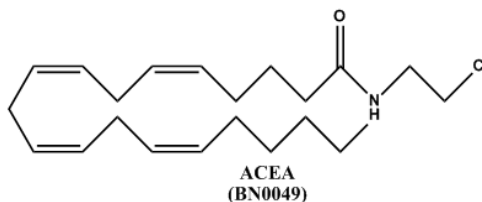
I recettori cannabinoidei interagiscono con una varietà di composti che sono classificabili dal punto di vista chimico in:

- a. Cannabinoli triciclici (composti benzopiranicici -  $\Delta^9$ -THC)
- b. Cannabinoli biciclici (CP-55940)
- c. Aminoalchilindoli (indoli, pirroli e indeni – WIN-55,212-2)
- d. Eicosanoidi (ligandi endogeni – AN (2, 7, 14))

I recettori cannabinoidei interagiscono con una varietà di composti che vengono classificati in sei diverse categorie<sup>[10]</sup>:

### 1. Agonisti selettivi per i recettori CB<sub>1</sub>:

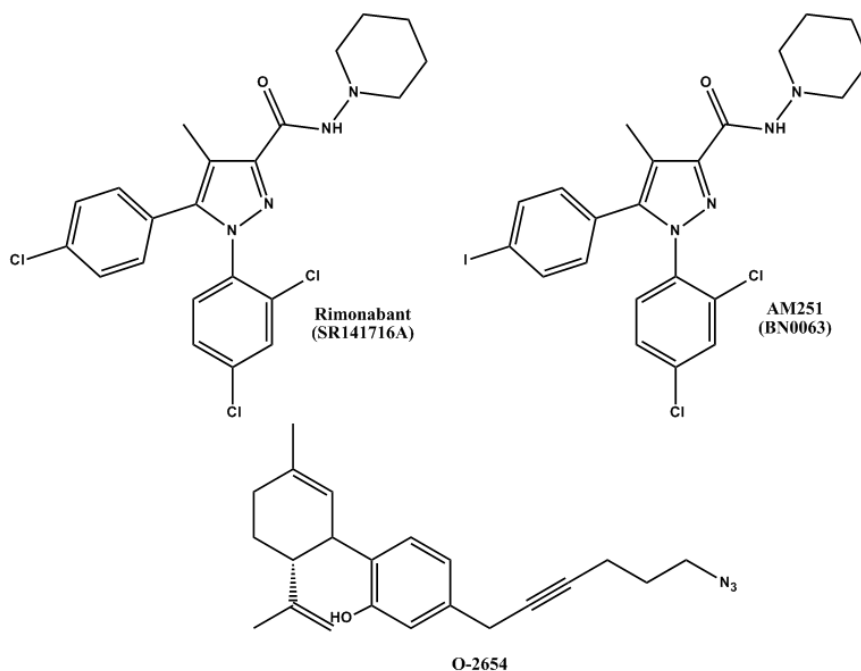
In questa categoria rientrano composti analoghi dell'anandamide, ad esempio l'ACEA e l'O-1812, che presentano elevata selettività per il recettore CB<sub>1</sub>. Queste molecole hanno la capacità di legarsi al recettore, di attivarlo, trasmettendo un segnale che viene, successivamente, decodificato dalla cellula.



### 2. Antagonisti/agonisti inversi selettivi per i CB<sub>1</sub>:

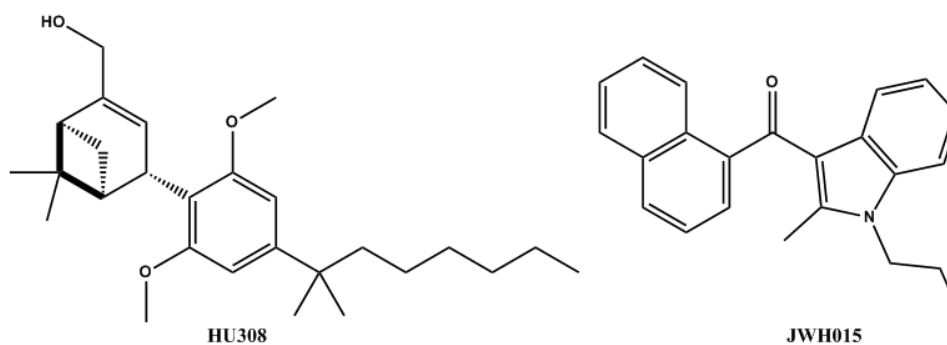
A questo gruppo appartengono l'SR141716A (Rimonabant), l'AM251, l'AM281, l'O-2654, composti che mostrano affinità di legame per il sito recettoriale, ma che non hanno attività

intrinseca (antagonisti), oppure che esercitano sul signaling effetti contrari a quelli indotti da un agonista (agonisti inversi), riducendo, in entrambi i casi, l'attività dell'agonista.



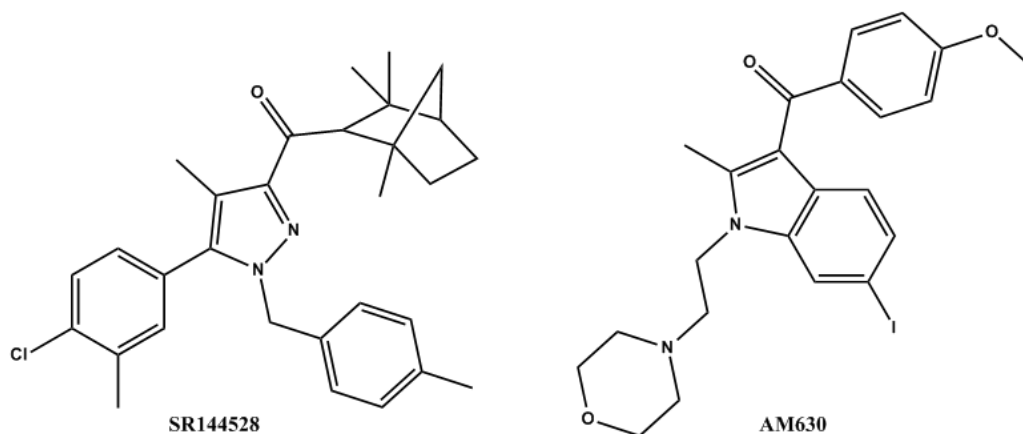
### 3. Agonisti selettivi per i CB<sub>2</sub>:

Questa categoria comprende diversi composti, tra cui l'HU308, l'AMM1241, il JWH015 e il GW405833, che mostrano una selettività agonista nei confronti dei recettori CB<sub>2</sub>, modulando positivamente le funzioni di tale recettore.



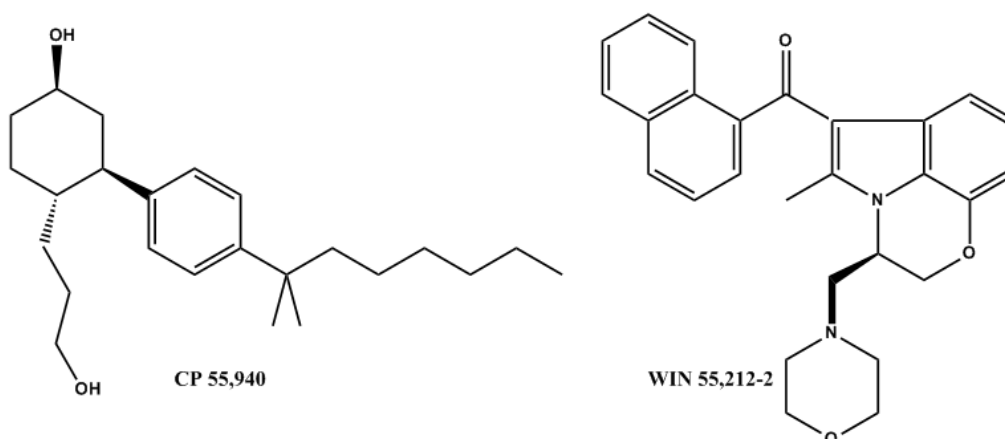
### 4. Antagonisti/agonisti inversi selettivi per i recettori CB<sub>2</sub>:

I composti SR144528, AM630 e JTE-907 sono derivati estremamente utili nella caratterizzazione del ruolo dei recettori CB<sub>2</sub>.



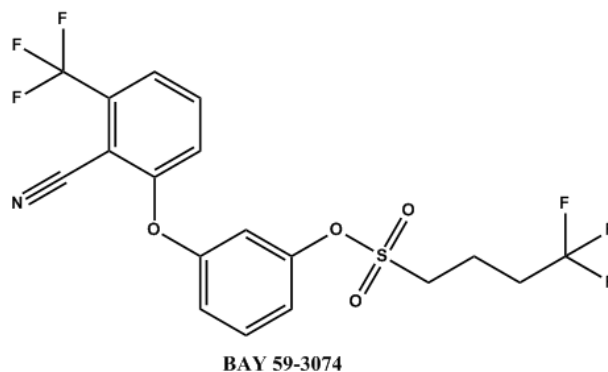
### 5. Agonisti non selettivi:

In questo gruppo sono compresi il CP-55-940, meno lipofilo del THC, che ha consentito la scoperta e la caratterizzazione del recettore CB<sub>1</sub>, il WIN 55,212-3, l'HU-210 e il BAY 38-7271, composti che non sono in grado di discriminare tra i due recettori, per cui interagiscono modificando l'attività di entrambi i sottotipi recettoriali.



### 6. Agonisti parziali non selettivi:

Composti come il  $\Delta^9$ -THC, l'anandamide e il BAY 59-3074 appartengono questa classe di molecole che, interagendo con i recettori CB, sono in grado di modulare le vie di traduzione utilizzate da tali recettori nei normali ruoli fisiologici.



Nonostante la loro importanza e le loro potenzialità terapeutiche, attualmente, in alcuni Paesi, ma non in Italia, sono disponibili per l'uso medico soltanto due agonisti dei recettori cannabinoidi, il dronabinolo e il nabilone, ed un unico antagonista, il Rimonabant. In particolare, il dronabinolo è il  $\Delta^9$ -THC di sintesi, commercializzato col nome di Marinol<sup>®</sup> in USA, Germania, Olanda e Israele, mentre il nabinolo, Cesamet<sup>®</sup>, è commercializzato in Gran Bretagna e Canada. Essi sono disponibili sotto forma di capsule, da assumere per via orale. Oltre a queste due indicazioni terapeutiche, esiste una serie di patologie neurologiche (Malattia di Parkinson, corea di Huntington, spasticità nella sclerosi multipla), traumi cranici e l'epilessia per le quali vi è un presupposto razionale di efficacia clinica con l'uso dei cannabinoidi di sintesi<sup>[9]</sup>.

L'antagonista dei recettori cannabinoidi Rimonabant è stato autorizzato per il trattamento dell'obesità, con il nome di Acomplia<sup>®</sup>.

Infine un estratto naturale della *cannabis*, commercializzato con il nome di Sativex<sup>®</sup>, viene utilizzato in molti Paesi per il trattamento sintomatico del dolore neuropatico nella sclerosi multipla: il Sativex è formulato come spray ad assorbimento oromucosale e contiene circa le stesse quantità di dronabinolo (THC) e cannabidiolo (CBD)<sup>[1]</sup>.

## 1.2 Cannabinoidi e obesità

Nel corso degli ultimi anni la percentuale di popolazione obesa nei Paesi industrializzati è cresciuta in modo preoccupante, principalmente a causa del cambiamento di stile di vita che sempre più spesso combina una dieta iperenergetica con la sedentarietà. Oggi l'obesità rientra

tra i 10 principali problemi sanitari globali riconosciuti dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità. Questo perché in individui con una elevata percentuale di grasso corporeo è stato riscontrato un elevato rischio di mortalità o di insorgenza di patologie gravi come coronaropatie, diabete di tipo 2 e alcune forme di cancro.<sup>[8,13]</sup>

Studi preclinici e clinici hanno dimostrato che sia i cannabinoidi endogeni che quelli esogeni agiscono sui recettori CB<sub>1</sub> ipotalamici stimolando l'appetito e la preferenza di cibi ricchi di grassi e carboidrati. Nell'ambito del controllo alimentare, è noto che a livello post-sinaptico il neurotrasmettitore GABA garantisce il senso di sazietà. L'attivazione endocannabinoide a livello del neurone postsinaptico, che può essere indotta dalla sensazione di piacere provocata dalla visione o dal breve assaggio di un gustoso dolce, attenua la sensazione di sazietà provocata dal GABA e stimola di conseguenza la tendenza alla ripresa dell'alimentazione. Questo spiega in termini fisiologici le azioni oressizzanti attribuite ai cannabinoidi di origine vegetale<sup>[14]</sup>. Oltre a influenzare i comportamenti legati alla gratificazione, nella pulsione verso l'apporto nutrizionale il sistema endocannabinoide è in relazione con il sistema oppioide e con il sistema serotonergico, visto il coinvolgimento della serotonina nel controllo del comportamento alimentare<sup>[14]</sup>.

Attualmente i possibili trattamenti per pazienti obesi con sindrome metabolica sono prevalentemente chirurgici, come il bendaggio gastrico e i vari tipi di bypass gastrico, che presentano comunque controindicazioni, come nausea e coliche, fino al rischio di perforazione gastrica e una, seppur bassa (0,5%), percentuale di morte perioperatoria.

Nonostante i grandi sforzi profusi dalla ricerca negli ultimi anni nel campo del controllo del peso, pochissimi agenti farmacologici per il trattamento a lungo termine dell'obesità sono stati immessi con successo sul mercato, tra i quali la sibutramina (strutturalmente simile alle amfetamine, che agisce da inibitore della ricaptazione della noradrenalina) e l'orlistat (inibitore della lipasi gastrointestinale), i quali evidenziando comunque un'attività limitata accompagnata da significativi effetti collaterali. Inoltre all'inizio del 2010, l'EMA ha bandito la sibutramina dal mercato europeo a causa dell'elevato rischio di malattie cardiovascolari. Pertanto la ricerca di una nuova generazione di farmaci antiobesità che agiscano su nuovi target molecolari, che migliorino gli effetti farmacologici e diminuiscano gli effetti collaterali, rimane una necessità urgente.



Molti dei modelli di obesità finora utilizzati si basano su mutazioni a carico di geni che controllano il bilancio energetico. In particolare, i ratti Zucker (*fa/fa*) e i topi *db/db*, che presentano una mutazione nel gene codificante per il recettore per la leptina, non sono in grado di riceverne il segnale per un difetto a livello del recettore cellulare di superficie specifico per la leptina, pur producendo una quantità di segnale proporzionale alla loro massa adiposa; i topi *ob/ob* sono knock-out per la leptina stessa.



**Figura. 1.2** Alcuni modelli animali di obesità. Da sinistra: Ratto Zucker (*fa/fa*); Topi *db/db*; Topi DIO (diet-induced obesity).

Dal punto di vista fenotipico questi animali sono obesi, iperfagici e iperinsulinemici e hanno quindi rappresentato sinora un modello adeguato per lo studio delle alterazioni metaboliche associate all'obesità. Una limitazione all'impiego dei modelli descritti è che sono poco rappresentativi della reale condizione clinica. Infatti, l'obesità nell'uomo non è causata da mutazioni monogeniche ma è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali, primo fra tutti il tipo di alimentazione. Secondo questa ottica, negli ultimi anni sono stati sviluppati i modelli di topi e ratti DIO (diet induced obesity). Gli animali non possiedono nessuna mutazione, ma sono sottoposti ad una dieta ad alto tenore di grassi che determina lo sviluppo dell'obesità, rappresentando quindi un modello altamente predittivo delle alterazioni metaboliche riscontrabili nell'uomo.

Il primo promettente candidato al trattamento clinico dell'obesità è stato l'SR141716A, più noto come Rimonabant,<sup>[15,16]</sup> il quale agisce selettivamente da agonista inverso/antagonista nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>. Il Rimonabant fu commercializzato in Europa nel 2006 con il nome di Acomplia<sup>®</sup> e fu approvato per il trattamento di pazienti in sovrappeso con sindromi

metaboliche. Numerosi studi, mediante l'utilizzo di diversi paradigmi sperimentali, hanno dimostrato che nei modelli animali Zucker (*fa/fa*) e i topi *db/db* la somministrazione acuta di Rimonabant riduce il consumo di cibo, e un trattamento cronico con il composto è in grado di ridurre il peso corporeo <sup>[17-20]</sup>. Attraverso questi modelli sono stati compresi i principali meccanismi centrali sui quali il Rimonabant esplica la sua efficacia: l'inibizione della trasmissione mediata dai recettori CB<sub>1</sub> nel sistema mesolimbico e della melanocortina, e il potenziamento della colecistochinina (CCK) e dei segnali vagali di sazietà nel tronco encefalico. Invece tra i meccanismi periferici si ha l'inibizione della lipogenesi nel tessuto adiposo e in quello epatico, un miglioramento nell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico e un aumento dell'adiponectina che modula la formazione degli adipociti con effetti pleiotropici sull'infiammazione e sulla protezione da aterosclerosi<sup>[18,21,22]</sup>. Oltre al trattamento dell'obesità, il Rimonabant si è rivelato efficace per diverse altre applicazioni terapeutiche, come per esempio il diabete di tipo 2 e per il ruolo svolto nella disassuefazione da fumo o da alcool, suggerendo che i recettori CB<sub>1</sub> potessero rappresentare un versatile target per nuovi farmaci. In seguito, la scoperta dell'elevato rischio di gravi conseguenze psichiche, come dimostrato dall'aumento dei casi di depressione e suicidio legate all'assunzione del Rimonabant, ne ha causato il blocco della commercializzazione nel 2008 da parte della European Medicines Agency<sup>[15,16,23]</sup>. Queste gravi conseguenze sono da ricercare negli effetti di questa molecola sul sistema nervoso centrale o nella sua azione di agonista inverso dei recettori CB<sub>1</sub><sup>[10]</sup>.

In qualità di agonista inverso il Rimonabant, legandosi al recettore CB<sub>1</sub>, induce una risposta contraria a quella indotta dagli agonisti endogeni, ed espleta pertanto un'azione di per se indipendentemente dal tono dell'ECS. Nei disordini metabolici si riscontra una elevata concentrazione di endocannabinoidi in diversi organi periferici, tuttavia, se somministrato per via sistemica, un agonista inverso potrebbe agire anche su altri organi non perturbati dal disordine metabolico, come alcune aree del cervello in cui il tono dell'ECS non risulta necessariamente sovraespresso<sup>[10,24]</sup>. Le conseguenze dell'azione indesiderata su questi organi producono effetti collaterali come quelli osservati con il Rimonabant.

Studi recenti hanno, inoltre, stabilito che gli effetti collaterali del Rimonabant sono legati ad un determinato polimorfismo del gene del recettore CB<sub>1</sub>, che, specialmente in combinazione

con variazioni nel gene dei trasportatori della serotonina, causa lo sviluppo di ansia e depressione.

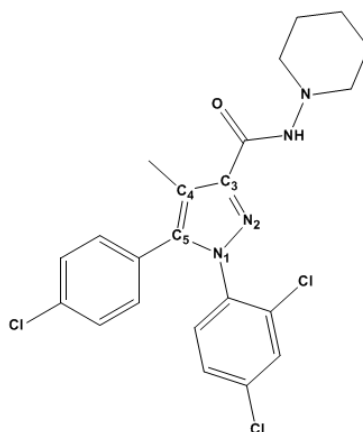
Alla luce di questi dati, negli ultimi anni un lavoro intenso è stato volto alla scoperta di nuove molecole per il trattamento dell'obesità, fondamentalmente secondo due diversi approcci<sup>[24]</sup>: il design di nuovi composti antagonisti neutri CB<sub>1</sub> (come l'AM4113, il VCHSR1 o il BPR0432) inattivi in assenza di una concentrazione efficace di agonista del recettore, e l'individuazione di antagonisti/agonisti inversi CB<sub>1</sub> con azione selettiva a livello periferico, tra i quali il JD-5037<sup>[25]</sup>, i derivati 5-(5-alchinil-2-tienil)-pirazolici e quelli con nucleo 2,3-diarilpirrolico riportati rispettivamente da Hung et al.<sup>[26]</sup> e da Rinaldi-Carmona e al<sup>[27]</sup>.

Sin da quando il Rimonabant fu identificato nel 1994 come il più potente e selettivo antagonista CB<sub>1</sub><sup>[23]</sup>, è stata prodotta una grande varietà di composti ad esso strutturalmente correlati. Le modifiche strutturali più frequentemente apportate allo scheletro di questo composto hanno interessato sia la sostituzione dell'anello pirazolico centrale con la sintesi di analoghi bioisosterici,<sup>[23,28-30]</sup> che quella dei sostituenti, metilico in C4 e fenilico in C5, in esso supportati.<sup>[31-35]</sup> In alcuni casi queste modificazioni molecolari hanno fornito degli efficaci bioisosteri<sup>[23,28-29]</sup>.

Gli studi computazionali sul Rimonabant, e il confronto con la vastissima quantità di prodotti analoghi, hanno evidenziato quali siano le caratteristiche chimiche della struttura utili ai fini dell'attività e selettività di questi composti<sup>[36]</sup>:

- la presenza del gruppo carbossammidico legato al C3 dell'anello pirazolico è indispensabile ai fini dell'interazione tra ligando e recettore. Infatti, l'ossigeno carbonilico forma un ponte idrogeno con il residuo di Lis192, mentre l'ammina ciclica viene ospitata in una tasca lipofila delimitata da residui di valina, fenilalanina, leucina e metionina.
- La sostituzione in posizione N1 dell'anello pirazolico con il 2,4-diclorofenile stabilizza il complesso con il sito recettoriale.<sup>[37]</sup> Sebbene sembri che tale sostituito sia quello ottimale<sup>[38]</sup>, la sua sostituzione con un gruppo 1-(5-isotiocianato)-pentile diminuisce solamente di un fattore 4 l'affinità nei confronti dei CB<sub>1</sub><sup>[39]</sup>. Nell'SR144528, potente agonista inverso dei recettori CB<sub>2</sub>, il gruppo fenilico è stato con un 4-metilbenzile<sup>[40]</sup>.

- L'eliminazione della funzione ammidica ed una sua sostituzione con una chetonica, alcolica o eterea determina una considerevole diminuzione dell'affinità di binding nei confronti dei CB<sub>1</sub><sup>[41]</sup>.
- La disostituzione dell'azoto ammidico del Rimonabant diminuisce l'affinità verso i CB<sub>1</sub><sup>[15]</sup>.
- L'omologazione dell'anello piperidina sulla funzione carbossilica in C3 dell'anello pirazolico del Rimonabant, con la pirrolidina o la omopiperidina, così come la sostituzione con un cicloesile, non influisce sull'affinità CB<sub>1</sub><sup>[15,41]</sup>.
- I composti recanti un metile, bromo o iodio in posizione 4 dell'anello pirazolico conservano la potenza della molecola madre, mentre la virtuale demetilazione nella stessa posizione risulta in una diminuzione di 12 ordini di grandezza nell'attività CB<sub>1</sub><sup>[41]</sup>.
- La sostituzione del 4-cloro sull'anello fenilico in posizione 5 dell'anello pirazolico con altro alogeno o gruppo alchilico non influisce sull'affinità di binding<sup>[15,42]</sup>. Invece la sostituzione con gruppi nitro o amminici, oppure lo spostamento dalla posizione 4- (*para*) alla posizione 2- (*orto*) del gruppo fenilico dà luogo a ligandi CB<sub>1</sub> poco efficaci, mentre la sostituzione dell'anello aromatico con gruppi alifatici annulla l'affinità per i recettori CB<sub>1</sub><sup>[15]</sup>.
- La sostituzione bioisosterica dell'arile legato al C5 dell'anello pirazolico del Rimonabant con una porzione 2-tienilica opportunamente sostituita dà luogo a potenti e selettivi CB<sub>1</sub> antagonisti e per i quali si sono rivelate valide le stesse considerazioni strutturali sopra riportate per i derivati arilici.<sup>[28-30]</sup>



**Figura. 3** Rimonabant (modello di struttura con *core* pirazolico centrale).

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Queste considerazioni sono fondamentali per la progettazione di nuove molecole che conservino affinità e selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>, ottenibili apportando le opportune modifiche strutturali che consentano di individuare composti antagonisti neutri o che espletino la loro azione solo a livello periferico. La diminuzione del passaggio della barriera ematoencefalica può essere ottenuta modulando alcuni parametri nella struttura molecolare, per esempio aumentando la capacità di formare legami idrogeno o l'area della superficie polare (TPSA) oppure diminuendo la lipofilia<sup>[43-45]</sup>.

La mia attività di ricerca in questi tre anni si è concentrata sull'ottenimento di analoghi del Rimonabant con valori maggiori di TPSA che potenzialmente non attraversino la barriera ematoencefalica. Il metodo più semplice per ottenere tale aumento è quello di incrementare il contenuto di atomi di azoto, ossigeno o zolfo all'interno della molecola.

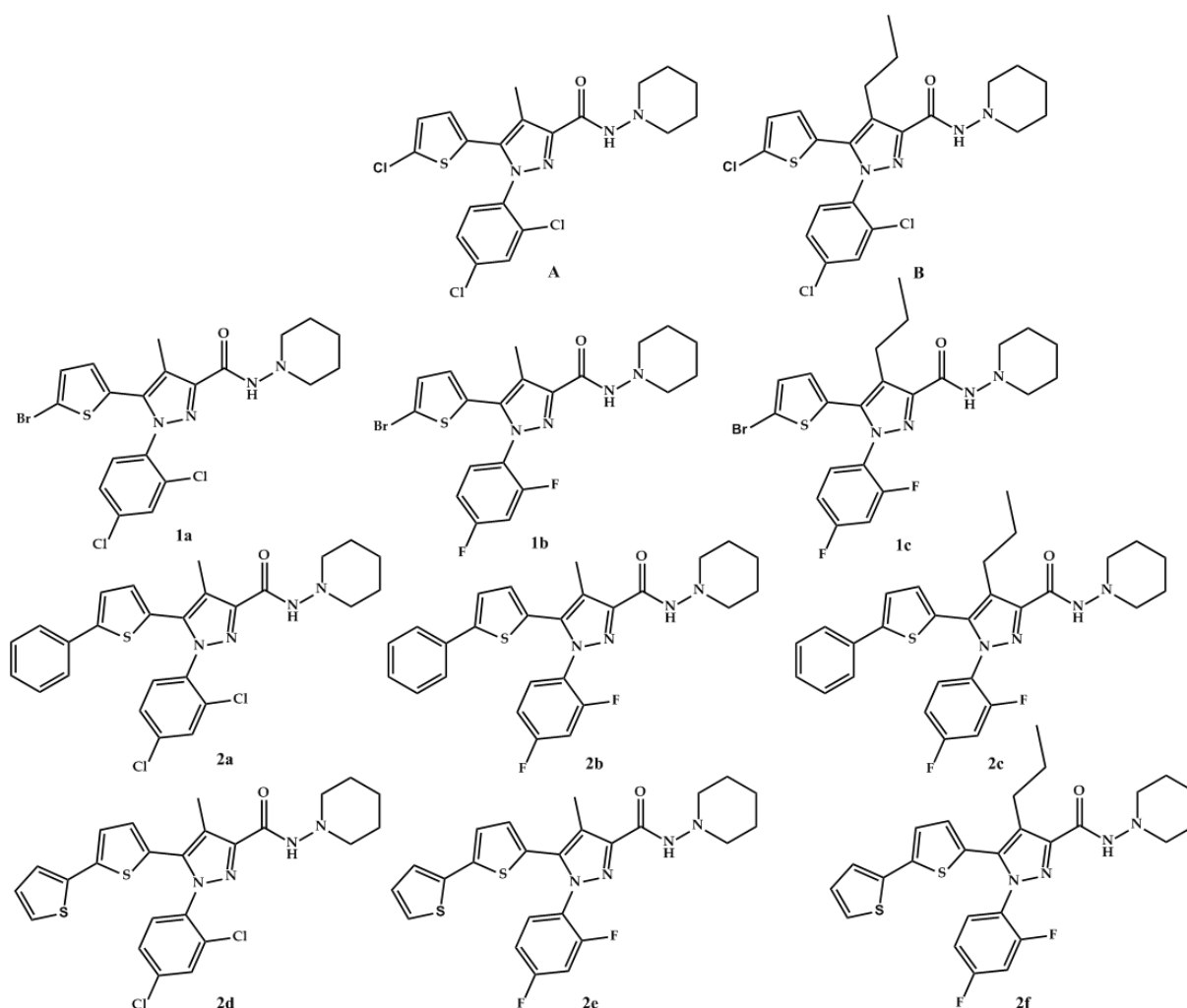
Alla luce dei promettenti risultati ottenuti con la sostituzione bioisosterica dell'arile legato al C5 dell'anello pirazolico del Rimonabant con una porzione 2-tienilica, che ha consentito l'ottenimento di composti che mostrano una elevata affinità e selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub><sup>[30-35]</sup>, il mio lavoro di ricerca si è concentrato sulla sintesi di derivati recanti un gruppo arilico in posizione  $\alpha$  allo zolfo della porzione 2-tienilica. Ho ritenuto potesse essere interessante anche valutare gli effetti della sostituzione dell'alogeno nel 2,4-diclorofenile sulla lipofilia di questa classe di composti. Le 5-(5-ariltiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-alcil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossamidi ottenute, sono state sottoposte a test *in vitro* ed *ex vivo* finalizzati all'individuazione di un potenziale candidato per il trattamento dell'obesità.

Parallelamente ho lavorato alla definizione delle opportune strategie sintetiche per l'ottenimento di altre due classi di analoghi con elevata TPSA, recanti un nucleo piridinico o pirrolico in C5.

## 2.0 Derivati $\alpha$ -ariltiofenici

### 2.1 Introduzione

La sostituzione bioisosterica dell'arile legato al C5 dell'anello pirazolico del Rimonabant con una porzione 2-tienilica ha consentito l'ottenimento di composti che mostrano una elevata affinità e selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub><sup>[30-35]</sup>. Alla luce dei risultati promettenti finora ottenuti ho ritenuto interessante valutare le conseguenze dell'inserimento di un gruppo arilico in posizione  $\alpha$  allo zolfo della porzione 2-tienilica. Inoltre, ho voluto valutare l'effetto della sostituzione dell'alogeno nella porzione 1-fenilica e dell'allungamento della catena in posizione 4 dell'anello pirazolico sulla lipofilità di questa classe di composti, confrontando i valori ottenuti mediante determinazione sperimentale dei LogP con quelli ottenuti *in silico* con programmi di predizione basati sulla struttura molecolare.



**Figura 2.1.** 5-(5-ariltiofen-2-il)-1-(2,4-dialcofenil)-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazolo-3-carbossamidi ottenute (**2a-f**) e rispettivi precursori 5-bromo2-tienilici (**1a-c**) e composto di riferimento NESS006A (**A**)

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazolo-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

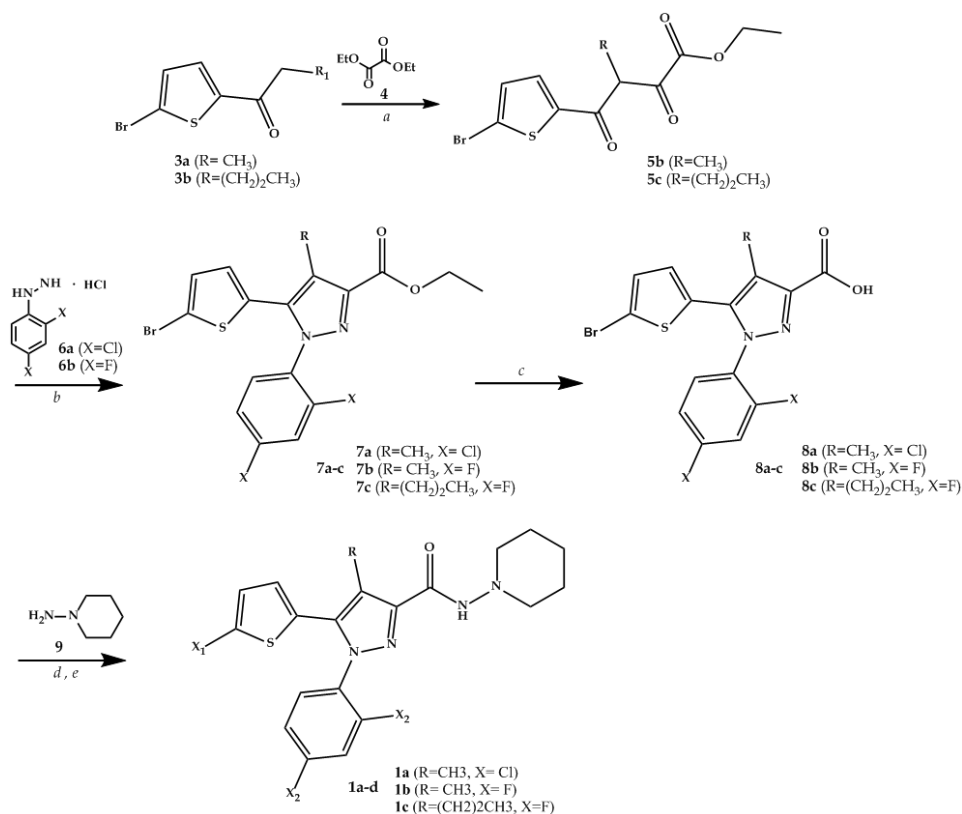
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Oltre al Rimonabant negli studi strutturali ho utilizzato come riferimento la 5-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazole-3-carbossamide<sup>[30]</sup> (NESS006A) (**A**, figura 1.1), e la 5-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-propil-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazole-3-carbossamide (NESSPF1A) (**B**, schema 1.1), potenti e selettivi antagonisti dei recettori CB<sub>1</sub> analoghi dei composti da me sintetizzati.

Le sei 5-(5-ariltiofen-2-il)-1-(2,4-dialofenil)-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazole-3-carbossamidi ottenute (derivati **2a-f**) e loro precursori 5-bromo-2-tienilici (**1a-c**), riportati in Figura 2.1, sono stati sottoposti a saggi preliminari *in vitro* ed *ex vivo* volti all'individuazione del candidato ottimale per uno studio *in vivo* su modelli animali di obesità. In base ai risultati di questa prima valutazione, la 5-(2,2'-ditiofen-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carbossammide è apparsa la più promettente della serie ed è stata selezionata per degli studi in acuto e in cronico sul comportamento alimentare di topi C57BL/6J Diet-Induced Obesity (DIO). I risultati sono riportati nei paragrafi 2.4 e 2.5, relativi alla valutazione biologica dei composti ottenuti.

## 2.2 Sintesi.



**Scheme 2.1.** Reagenti e condizioni: (a) Na, EtOH<sub>an</sub>, t.a.; (b) EtOH, riflusso; (c) KOH, MeOH, riflusso; (d) EDC-HCl, HOBT · xH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a. quindi **9**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

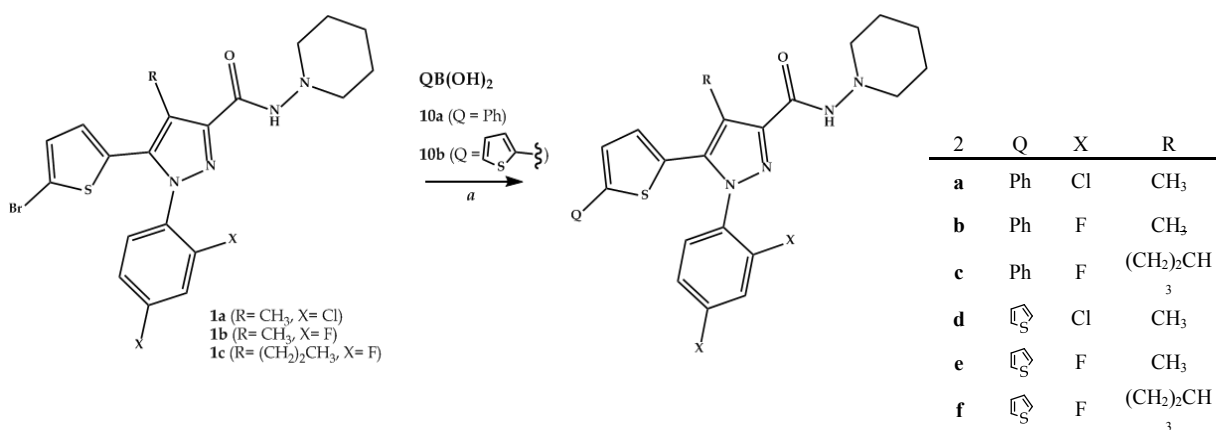
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Lo schema sintetico applicato per la sintesi delle 5-(5-ariltiofen-2-il)-1-(2,4-dialofenil)-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazole-3-carbossamidi riprende, con le opportune modifiche, quella relativa agli analoghi recanti un atomo di cloro sul C5 dell'anello tiofenico.<sup>[30,46,47]</sup>

Gli  $\alpha,\gamma$ -dichetoesteri **5** sono stati ottenuti per condensazione di Claisen tra dietilossalato e l'opportuno 5-bromo-2-tienil-chetone **3** in presenza di etossido di sodio preparato *in situ*. La costruzione dell'anello pirazolico degli etil 1-(2,4-dialofenil)-5-(5-bromotiofen-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilati **7** è stata ottenuta per reazione dell'opportuno dichetoestere **5** con l'appropriata fenilidrazina **6** in etanolo a refluxo. Le *N*-piperidinil-carbossamidi **1a-c** sono state infine preparate dagli esteri **7** mediante idrolisi basica, seguita da reazione di coupling tra l'acido **8** attivato e la 1-aminopiperidina (**9**).

Gli intermedi 2-bromotienilici **1a-c** sono stati convertiti nelle 5-aril carbossamidi desiderate (**2a-f**) mediante reazione di Suzuki-Miaura usando gli appropriati acidi boronici **10** (Schema 2).



**Schema 2.2** Reagenti e condizioni: (a) (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DME/H<sub>2</sub>O 4:1, 80 °C.

La reazione, catalizzata da tetrakis-(trifenilfosfina)palladio(0) in presenza carbonato di potassio, è stata condotta in atmosfera inerte in una miscela di 1,2-dimetossietano/acqua 2:1 ad 80 °C per 16 ore.

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



### 2.3 Determinazione dei coefficienti di ripartizione Ottanolo/Acqua e predizione *in silico* dell'attraversamento della BBB.

Le principali interfacce tra il sistema nervoso centrale e la circolazione periferica sono la barriera emato-encefalica ((Brain/Blood Barrier, BBB) e la barriera emato-fluido cerebrospinale. La superficie della prima risulta diverse migliaia di volte più estesa della seconda pertanto la BBB rappresenta la principale barriera tra il sistema nervoso centrale e la circolazione sistemica.<sup>[48]</sup>

E' ormai generalmente accettato che le caratteristiche chimico-fisiche che influenzano in modo determinante il passaggio della BBB mediante trasporto passivo sono la lipofilicità, la capacità di formare legami idrogeno, il rapporto pKa/carica e le dimensioni della molecola. Si deve però tenere conto anche di quelli che sono i meccanismi di trasporto attivo, che in genere dipendono da un riconoscimento specifico della molecola e dalla sua concentrazione al trasportatore. La permeabilità della BBB è influenzata da altri fattori che determinano la concentrazione di soluto alla superficie capillare del cervello, inclusa la capacità di legarsi alle proteine plasmatiche, il flusso sanguigno, la ripartizione nelle membrane capillari, e la distribuzione nel parenchima del cervello. Questi ed altri parametri farmacocinetici, come l'assorbimento, il metabolismo di primo passaggio, la distribuzione negli altri tessuti e i percorsi di eliminazione, a seconda dei casi sono dei complessi determinanti chimico-fisici, biochimici e biologici, e non tutti mostrano una correlazione diretta con la struttura del farmaco.<sup>[48-54]</sup>

Un metodo comune per misurare il grado di penetrazione della BBB è il rapporto tra la concentrazione del composto in esame nel cervello e quella nel sangue, generalmente espressa in termini logaritmici e solitamente indicata come logBB.

$$\log BB = \log(C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}})$$

I valori sperimentali del logBB pubblicati finora coprono un range che va da +2.00 a -1.00<sup>[48-54]</sup>.

Lipinski nel 1997<sup>[52]</sup> ha formulato cinque regole empiriche per la predizione del passaggio della BBB. Un composto è facilmente BBB-permeabile se rispetta i seguenti cinque parametri:

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

- 1) deve possedere un  $\log_{BB} \geq 0.3$ ;
- 2) il valore della PSA deve essere inferiore ai 70 Å;
- 3) il peso molecolare deve mantenersi sotto i 450 Da;
- 4) il numero totale di atomi di ossigeno e azoto (N+O) deve essere  $\leq 5$ ;
- 5) deve essere verificata la relazione  $CLogP - (N+O) > 0$ .

Quindi composti con  $\log_{BB} \geq 0.3$  attraversano agevolmente la BBB, mentre i composti con  $\log_{BB} < -1$  sono scarsamente distribuiti nel cervello. La permeabilità di composti con  $\log_{BB}$  compresa tra -1 e 0.3 non è facile da predire.<sup>[54]</sup>

La determinazione del  $\log_{BB}$  è difficile, richiede tempo e, soprattutto, esperimenti *in vivo*. Questo presuppone che tutti i prodotti da valutare debbano essere sintetizzati per essere testati.

I modelli predittivi *in silico* hanno acquisito popolarità negli ultimi decenni nella ricerca sulla BBB per la loro velocità, flessibilità, basso costo e minore richiesta di tempo in confronto agli approcci *in vivo* e *in vitro*. Pertanto una nuova strategia si è evoluta sulla base di una simulazione computazionale e predizione delle interazioni dei composti con l'interfaccia della BBB per velocizzare e razionalizzare il design e la scoperta di nuovi farmaci nei primissimi stadi.<sup>[50]</sup> Il metodo computazionale consente di effettuare uno screening precedente alla stessa sintesi consentendo di risparmiare tempo e risorse.

La combinazione dei parametri lipoficità e capacità di formare legami idrogeno è una caratteristica comune a molti modelli moderni di determinazione del  $\log_{BB}$ .<sup>[48,50]</sup>

L'area della superficie polare di una molecola, indicata comunemente con la sigla PSA (polar Surface Area), indica l'area della superficie molecolare occupata da atomi di azoto, ossigeno e zolfo ed è un descrittore in stretta correlazione con la capacità della molecola di formare ponti idrogeno. Quando la PSA è calcolata come somma di contributi atomici a partire dalla struttura 2D della molecola si parla di tPSA (topological polar surface area) che è la forma generalmente più usata per esprimere questo parametro. Generalmente composti con una elevata tPSA esprimono una minore tendenza ad attraversare la barriera ematoencefalica.

La lipoficità, generalmente espressa come coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $\log P$ ), è una proprietà fondamentale che gioca un ruolo pivotale nell'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione dei farmaci<sup>[48]</sup> ed è il parametro più strettamente collegato al

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

passaggio della BBB. Si può individuare una relazione parabolica tra la lipofilicità di un composto e la sua penetrazione della membrana *in vivo*, in base alla quale molecole che possiedono moderata lipofilicità esibiscono la penetrazione più elevata. Non sempre, però, questa correlazione è diretta, poiché altri fattori possono entrare in gioco inducendo una risposta diversa da quella attesa. Per esempio una ridotta presenza nel cervello di composti più lipofili è spesso associata ad un maggiore numero di legami non-specifici con le proteine plasmatiche.

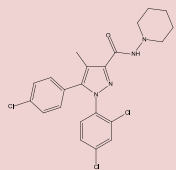
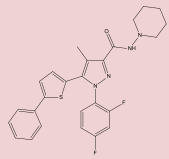
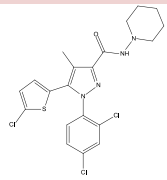
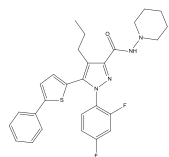
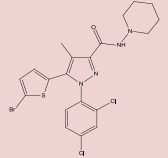
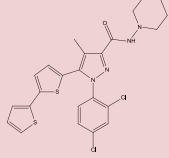
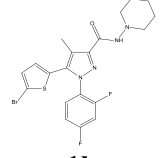
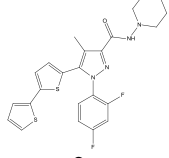
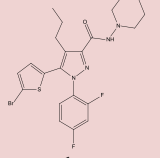
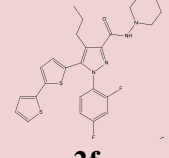
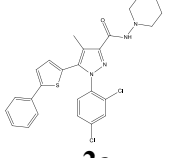
Regole empiriche come quelle di Lipinski, oppure semplici misure di superficie polare molecolare, riflettono grossolanamente i principali determinanti della permeabilità passiva della membrana cellulare.<sup>[51]</sup> Questi approcci schematici semplificati sono utili perché approssimano la nostra comprensione dei meccanismi che contribuiscono alla penetrazione nel sistema nervoso centrale, tuttavia è poco probabile che riflettano in maniera accurata la complessità delle interazioni e la combinazione di questi determinanti chimico-fisici e biochimici.<sup>[48]</sup>

Ritenendo potesse essere utile una valutazione teorica della potenziale interazione con la BBB dei nostri composti abbiamo calcolato i relativi valori di logBB applicando il modello di regressione QSAR<sup>[51-54]</sup> (Quantitative Structure-Activity Relationship) proposto da Clark.<sup>[51]</sup> (algoritmo ACD/BBB) che correla i due parametri indipendenti cLogP e tPSA mediante l'equazione (1):

$$\log BB = 0.152(\text{cLogP}) - 0.0148(\text{tPSA}) + 0.139 \quad (1)$$

In tabella 2.1 sono riportati i valori stimati per la lipofilicità (cLogP) ed la tPSA, calcolati sulla base della struttura chimica dei composti utilizzando il programma MarvinSketch 5.11.3 (ChemAxon Ltd.),<sup>[55-57]</sup> freeware accessibile su internet tramite il link (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>).

**Tabella 2.1** cLogP, tPSA e Log BB dei composti **Rimonabant, A (NESS006A), 1a-c e 2a-f**.

Compound	cLogP	tPSA Å <sup>2</sup>	logBB	Compound	cLogP	tPSA Å <sup>2</sup>	logBB
 <b>Rimonabant</b>	5.36	50.16	0.211	 <b>2b</b>	4.93	50.16	0.146
 <b>A</b>	4.70	50.16	0.111	 <b>2c</b>	5.72	50.16	0.266
 <b>1a</b>	4.97	50.16	0.152	 <b>2d</b>	5.10	50.16	0.172
 <b>1b</b>	4.21	50.16	0.036	 <b>2e</b>	4.34	50.16	0.056
 <b>1c</b>	5.01	50.16	0.158	 <b>2f</b>	5.14	50.16	0.178
 <b>2a</b>	5.69	50.16	0.261				

**cLogP** – coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua calcolati, **tPSA** – topological polar surface area [Å<sup>2</sup>]. **Log BB** – attraversamento della BBB predetto.

I valori di logBB dei composti da me sintetizzati non danno una indicazione certa sulla loro capacità di attraversare la BBB.

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Per testare ulteriormente la validità dei metodi predittivi abbiamo deciso di verificare se i parametri calcolati *in silico* corrispondono a quelli ricavati da misurazioni dirette. La tPSA è una grandezza che deriva da un mero calcolo matematico basato sulla struttura bidimensionale della molecola, quindi non esiste un metodo di misurazione diretta. Per quanto riguarda la lipofilità, invece, esistono metodi consolidati per la determinazione diretta del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $\text{LogP}_{\text{ow}}$ ) mediante HPLC in fase inversa (RP-HPLC).<sup>[58-60]</sup>

Un sistema HPLC Agilent 1200 dotato di detector DAD è stato impiegato per iniettare aliquote da 10 $\mu$ l di soluzione di analita. La cromatografia è stata condotta a temperatura ambiente utilizzando una colonna Phenomenex Luna C18, 250 x 4.6 mm (L x ID), 5  $\mu$ m 100 Å. Il flusso è stato settato a 1.0 ml/min, con eluizione isocratica a 85% metanolo e 15% acqua.

I valori di  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  sono stati determinati confrontando il tempo di ritenzione del composto di interesse con quello di opportuni standard di riferimento con  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  noto. Tutte le misure sperimentali sono state condotte almeno in triplicato. Come standard sono stati utilizzati il dimetil solfossido, l'alcool benzilico, il benzene, il toluene, il naftalene, il bifenile, il fenantrene e la trifenilammina disciolti in metanolo/DMSO (99/1) con una concentrazione compresa tra 1.0x10<sup>-2</sup> e 0.7x10<sup>-2</sup> mg/ml. Utilizzando il tempo di ritenzione del primo picco (DMSO) come  $t_0$ , il fattore logaritmico di capacità ( $\log k'$ ) è stato calcolato per tutti gli standard utilizzando i loro tempi di ritenzione ( $t_R$ ) e l'equazione (2):

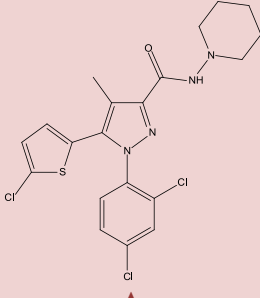
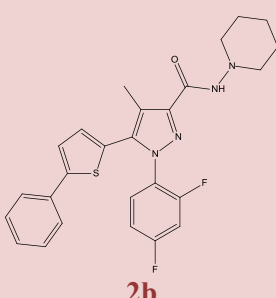
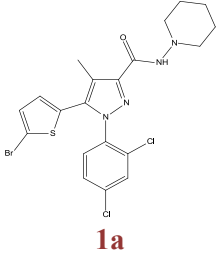
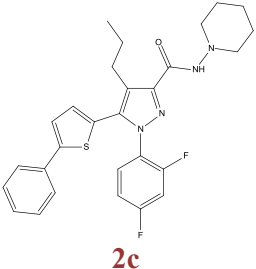
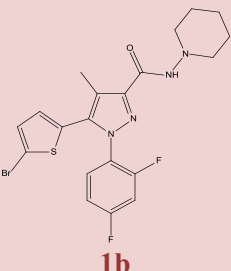
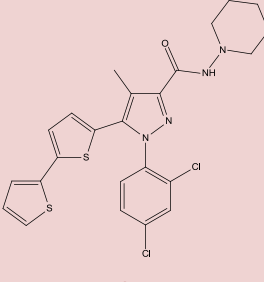
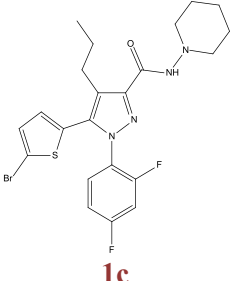
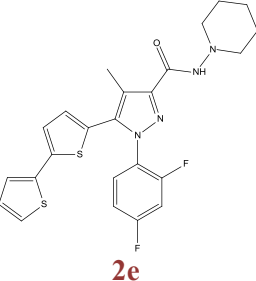
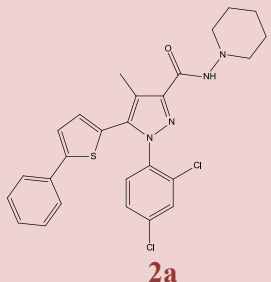
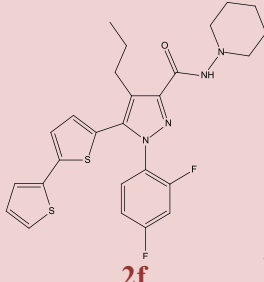
$$\log k' = \log \left( \frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad (2)$$

I  $\log k'$  sono stati correlati mediante regressione lineare con i corrispondenti  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  indicati nella OECD/EEC test guideline<sup>[58]</sup>, ottenendo una equazione di regressione del tipo (3):

$$\text{LogP}_{\text{ow}} = m \log k' + q \quad (3)$$

Soluzioni standard (0.1mg/ml) dei composti **1a-c** e **2a-f** in metanolo/DMSO (99/1) ed i relativi  $\log k'$ , calcolati secondo l'equazione (1), sono stati utilizzati per determinare i corrispondenti  $\text{LogP}_{\text{ow}}$  (Tabella 2.2) utilizzando l'equazione di regressione (2).

**Tabella 2.2** cLogP e LogP<sub>ow</sub> dei composti **A** (NESS006A), **1a-c** e **2a-f**.

Compound	cLogP	LogP <sub>ow</sub>	Compound	cLogP	LogP <sub>ow</sub>
	4.70	4.85 ± 0.02		4.93	4.18 ± 0.03
	4.97	4.86 ± 0.07		5.72	5.19 ± 0.04
	4.21	3.89 ± 0.04		5.10	5.28 ± 0.01
	5.01	4.56 ± 0.03		4.34	4.18 ± 0.03
	5.69	5.58 ± 0.03		5.14	4.97 ± 0.04

**cLogP** – coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua calcolati, **LogP<sub>ow</sub>** – coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua determinati con il metodo HPLC ± SEM.

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

In base ai risultati ottenuti si può concludere che i sistemi informatici di predizione sono abbastanza attendibili per quanto riguarda i prodotti recanti l'anello 2,4-diclorofenilico in C1 al pirazolo, mentre si discostano alquanto per gli analoghi 2,4-difluorofenilici.

## **2.4 Valutazione *in vitro* ed *ex vivo* dei composti 1a-c e 2a-d.**

Per i sei derivati ottenuti è stata determinata l'affinità nei confronti dei recettori cannabinoidi mediante test di binding. Studi funzionali *in vitro* (test su linee cellulari) ed *ex vivo* (metodo degli organi isolati) sono stati inoltre condotti sui composti **1a**, **1b**, **2a** e **2d**.

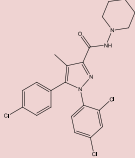
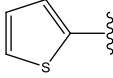
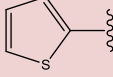
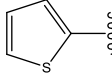
### **2.4.1 Esperimenti di Radioreceptor Binding.**

Nella Tabella 2.3 sono riportate le affinità dei composti **1a-c** e **2a-f** nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, determinate mediante *radioreceptor binding assays* usando [<sup>3</sup>H]-CP-55,940 in accordo con le procedure precedentemente riportate da Ruiu et al.<sup>[61]</sup>

Confrontando i dati ottenuti per i nuovi derivati con quelli relativi ai composti A (NESS006A) e B, risulta evidente che la sostituzione del cloro con il fluoro sulla porzione alofenilica ha come effetto una sensibile diminuzione dell'affinità nei confronti di entrambi i recettori cannabinoidi.

Nei composti che presentano il metile in C4, l'inserimento del sostituente arilico induce un sensibile aumento della selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>, mentre si verifica il contrario per i composti che nella stessa posizione recano un sostituente propilico.

**Tabella 2.3** Risultati degli esperimenti di *Radioreceptor Binding Essays*.

Composto	X	R	Q	K <sub>i</sub> (CB <sub>1</sub> ) <sup>a</sup> nM	K <sub>i</sub> (CB <sub>2</sub> ) <sup>b</sup> nM
 <b>Rimonabant</b>	Cl	Me	Cl	1.8	514
<b>A</b>	Cl	Me	Cl	35.0 ± 2.5	476 ± 3
<b>B</b>	Cl	Pr	Cl	13.4 ± 1.2	3375 ± 375
<b>1a</b>	Cl	Me	Br	17.4 ± 2.5	781 ± 37.6
<b>1b</b>	F	Me	Br	95.7 ± 12.2	633 ± 88
<b>1c</b>	F	Pr	Br	222 ± 41	2500 ± 462
<b>2a</b>	Cl	Me	Ph	22.3 ± 2.3	1610 ± 194
<b>2b</b>	Cl	Me	Ph	320 ± 41	2950 ± 401
<b>2c</b>	F	Pr	Ph	197 ± 23	733 ± 159
<b>2d</b>	Cl	Me		7.7 ± 1.5	1845 ± 201
<b>2e</b>	F	Me		195 ± 39	3000 ± 577
<b>2f</b>	F	Pr		185 ± 29	460 ± 10

<sup>a</sup> Per i saggi sui recettori CB<sub>1</sub> è stato impiegato [<sup>3</sup>H]-CP-55,940 su omogenati di cervello (minus cerebellum) di topi CD1. <sup>b</sup> Per i saggi sui recettori CB<sub>2</sub> è stato impiegato [<sup>3</sup>H]-CP-55,940 su omogenati di milza di topi CD1.

#### 2.4.2 Determinazione dell'attività con il metodo degli organi isolati.

Allo scopo di investigare il profilo farmacologico dei nuovi composti sintetizzati è stata applicata una procedura in *ex vivo* mirata alla valutazione dell'attività CB<sub>1</sub> antagonista e basata su procedure di letteratura<sup>[62]</sup> caratterizzate dall'impiego del vaso deferente.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

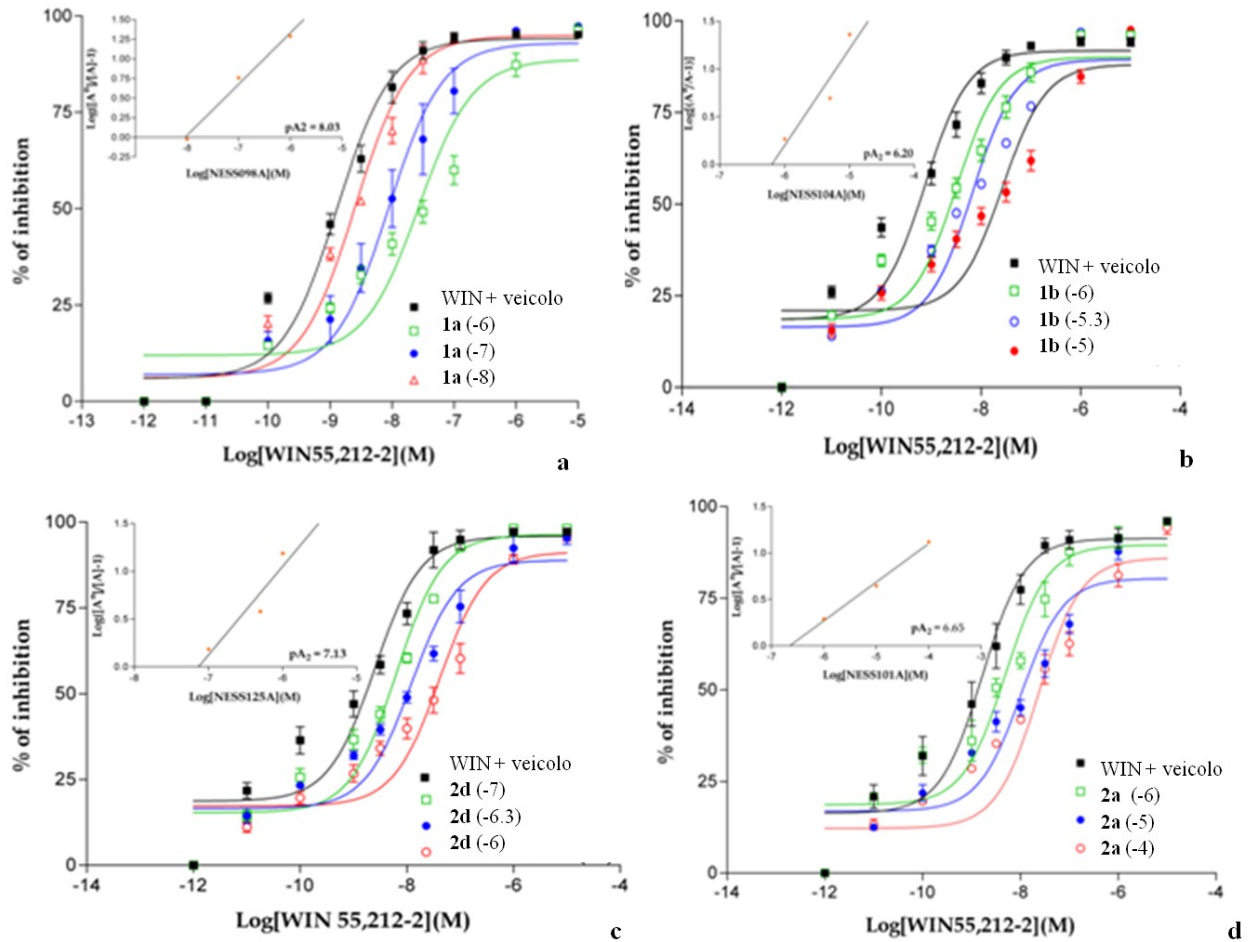
Università degli Studi di Sassari



La sperimentazione è stata condotta utilizzando WIN 55,212-2 e Rimonabant (SR141716A) rispettivamente quali agonista e antagonista CB<sub>1</sub> di riferimento. La procedura adottata ha previsto le seguenti fasi:

- a. prelievo dell'organo da topi CD1 (25-40g);
- b. montaggio dell'organo in un bagno per organi isolati, contenente una soluzione Krebs-Henseleit mantenuta a 37 °C sotto flusso di una miscela O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5, usando il metodo descritto da Pertwee et al.,<sup>[62]</sup>
- c. induzione delle contrazioni dell'organo attraverso stimolazioni elettriche, stimolando con treni da tre pulsii di 0.5s con un voltaggio massimo del 110% (frequenza del treno, 0.1 Hz; durata del pulso 0.5 ms) attraverso elettrodi di platino;
- d. amplificazione e monitoraggio delle contrazioni;
- e. verifica della riproducibilità della risposta contrattile;
- f. aggiunta del principio attivo da testare;
- g. valutazione della variazione dell'entità delle contrazioni rispetto al controllo.

Al fine di verificare l'attività antagonista del campione da testare, la procedura generale sopra riportata è stata ripetuta aggiungendo il composto CB<sub>1</sub> agonista di riferimento WIN 55,212-2 venti minuti dopo l'aggiunta del composto da testare (antagonista). L'attività antagonista è stata quindi rilevata attraverso l'osservazione di una riduzione dell'inibizione della contrazione dell'organo provocata dal composto agonista di riferimento WIN 55,212-2. L'entità dell'inibizione delle contrazioni indotte elettricamente è espressa in termini percentuali ed è stata calcolata confrontando l'ampiezza delle contrazioni dopo ogni aggiunta di antagonista con l'ampiezza immediatamente precedente alla prima aggiunta di agonista. I valori di  $pA_2$  per gli antagonisti competitivi sono stati calcolati mediante analisi di regressione di Schild,<sup>[63]</sup> e rappresentano la costante di dissociazione dell'antagonista ( $pK_B$ ). Per ciascuna valutazione sono state utilizzate 8 preparazioni di tessuto. I risultati ottenuti sono riportati di seguito in Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Curve di concentrazione cumulativa-risposta per il WIN 55,212-2 relative all'ampiezza delle contrazioni provocate da stimolazioni con campo elettrico del vaso deferente nel veicolo ed in presenza dei composti **1a**, **1b**, **2a** e **2d**.

Dagli studi effettuati risulta che tutti i composti in esame contrastano la riduzione delle contrazioni elettricamente indotte determinata dall'agonista dei recettori cannabinoidi di riferimento, WIN55,212-2, ed agiscono pertanto come antagonisti.

### 2.4.3 Determinazione dell'attività mediante test su linee cellulari.

Lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 è stato condotto con la linea cellulare N1E-115 su Dischi di Petri 100x20 mm (Falcon®) a seguito di un'esposizione di 10 minuti sul recettore CB<sub>1</sub> dell'agonista ACEA (20nM) e/o WIN (25nM) e differenti concentrazioni della

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

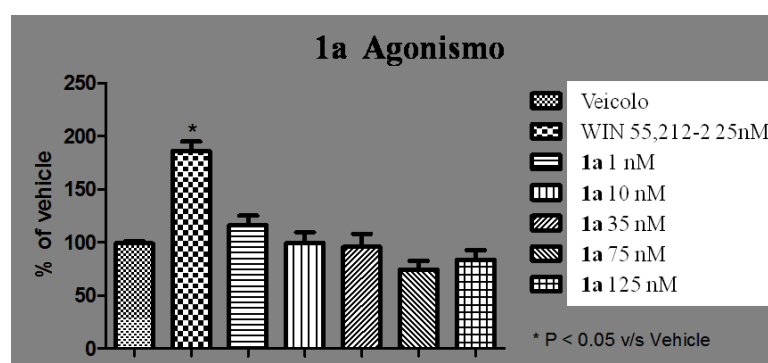
molecola da testare. L'esposizione di questi recettori induce una rapida fosforilazione e attivazione di ERK. L'effetto di 5 minuti di pretrattamento con l'antagonista SR (1  $\mu$ M) abolisce l'azione dell'agonista, indicando che l'attivazione di P-ERK 1/2 è CB<sub>1</sub> specifica.

Lo studio di competizione nell'espressione di P-ERK 1/2 viene effettuato con un pretrattamento di 5 minuti di diverse concentrazioni della molecola da testare, seguito da un'esposizione di 10 minuti sul recettore CB<sub>1</sub> dell'agonista ACEA (20nM) o WIN (25nM).

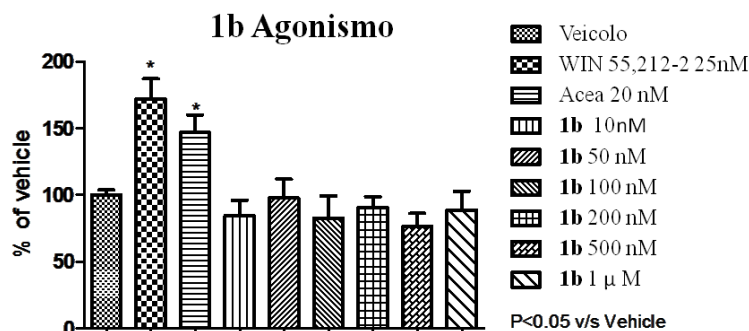
L'abolizione dell'azione di ACEA o WIN indica l'attività antagonista della molecola testata.

I differenti livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo  $\pm$  SEM. L'analisi statistica viene effettuata tramite il post test one-way Anova seguito dal Dunnet's multiple comparison, utilizzando il programma GraphPad Prism 5.

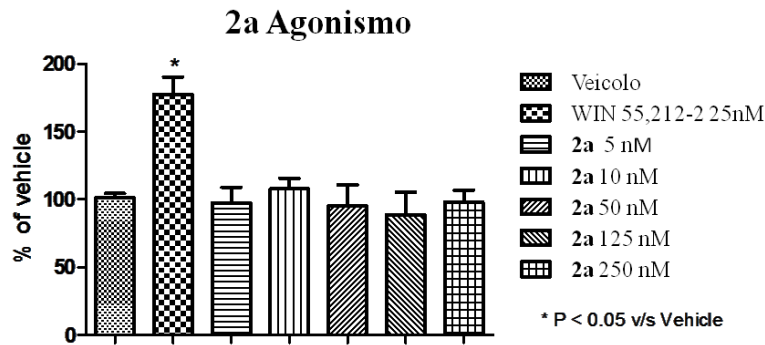
Le figure 2.3-2.6 riportano gli studi dose/risposta relativi ai composti **1a**, **1b**, **2a** e **2d**.



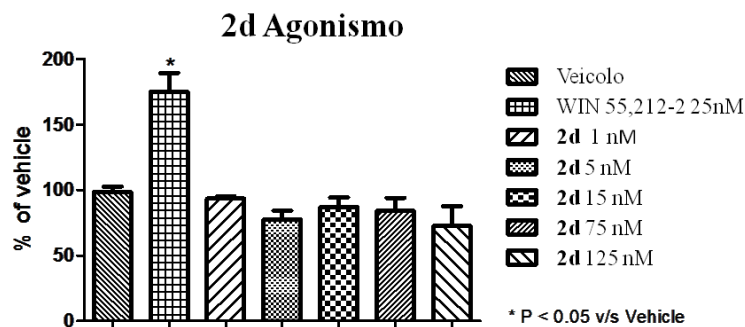
**Figura 2.3** Studio dose/risposta per l'espressione della P-ERK 1/2, in seguito a somministrazione di WIN o di **1a** a cinque diverse concentrazioni (1nM-125 nM). I livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo  $\pm$  SEM.



**Figura 2.4** Studio dose/risposta per l'espressione della P-ERK 1/2, in seguito a somministrazione di ACEA o di **1b** a sei diverse concentrazioni (10nM-500 nM). I livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo  $\pm$  SEM.

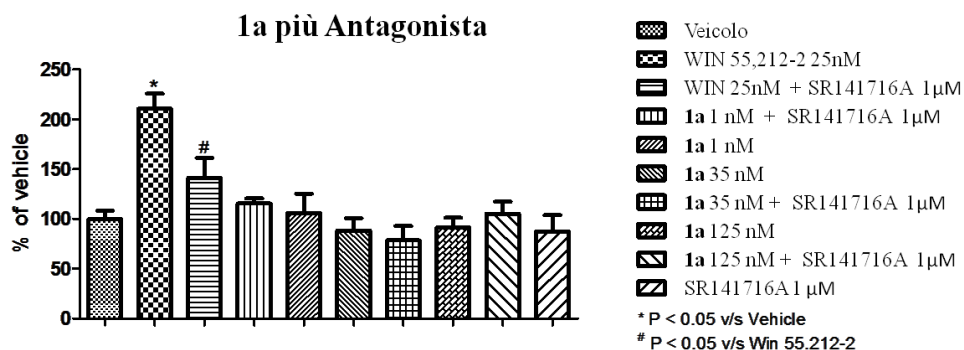


**Figura 2.5** Studio dose/risposta per l'espressione della P-ERK 1/2, in seguito a somministrazione di WIN o di **2a** a sei diverse concentrazioni (5nM-250 nM). I livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo  $\pm$  SEM.



**Figura 2.6** Studio dose/risposta per l'espressione della P-ERK 1/2, in seguito a somministrazione di WIN o di **2d** a sei diverse concentrazioni (1nM-125 nM). I livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo  $\pm$  SEM.

Per il composto **1a** è stato anche valutato l'effetto del pretrattamento di 5 minuti con l'antagonista Rimonabant (SR141716A) mostrato in figura 2.7.



**Figura 2.7** Studio dose/risposta per l'espressione della P-ERK 1/2, in seguito a somministrazione di WIN o di **1a** a tre diverse concentrazioni (1nM-125 nM) con un pretrattamento a 5 minuti con Rimonabant.

Autore: Marilena Pira

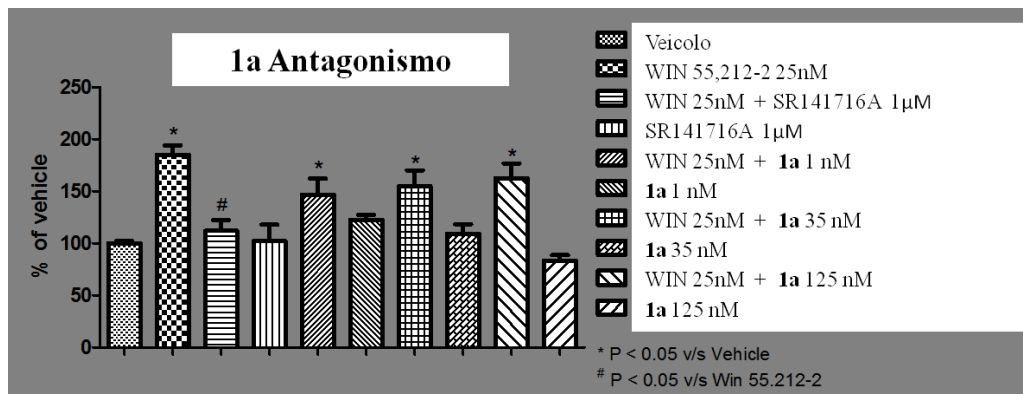
**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

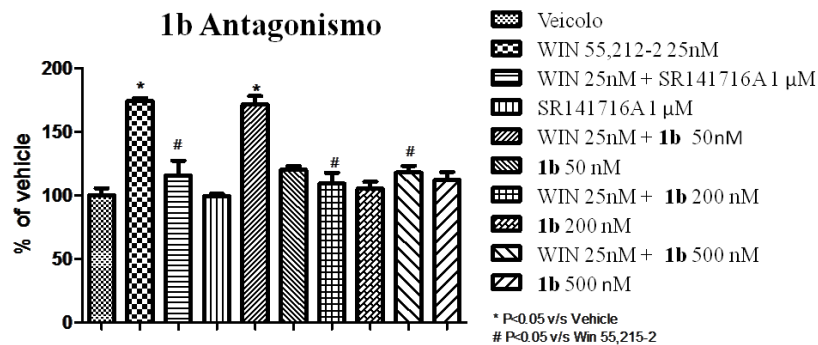
Università degli Studi di Sassari

Per tutti i composti testati nessuna delle somministrazioni ha prodotto una variazione significativa rispetto al veicolo, perciò nessuno dei prodotti si comporta come agonista CB<sub>1</sub>.

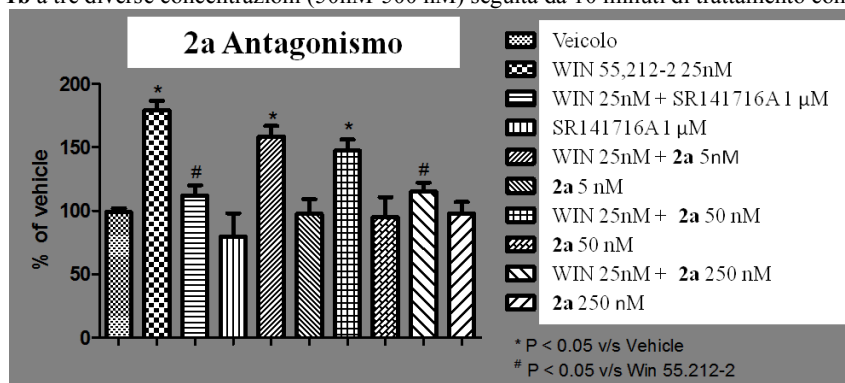
Nelle figure 2.8 - 2.11 è riportato lo studio sulla competizione nell'espressione della P-ERK 1/2 dopo il pretrattamento a 5 minuti con Rimonabant (1  $\mu$ M) oppure con diverse concentrazioni di **1a**, **1b**, **2a** e **2d** (esprese in nM), seguito da 10 minuti di esposizione al WIN (25 nM).



**Figura 2.8** Studi di competizione nell'espressione della P-ERK 1/2, in seguito ad un pretrattamento di 5 minuti con Rimonabant o con **1a** a tre diverse concentrazioni (1nM-125 nM) seguita da 10 minuti di trattamento con WIN.



**Figura 2.9** Studi di competizione nell'espressione della P-ERK 1/2, in seguito ad un pretrattamento di 5 minuti con Rimonabant o con **1b** a tre diverse concentrazioni (50nM-500 nM) seguita da 10 minuti di trattamento con WIN.



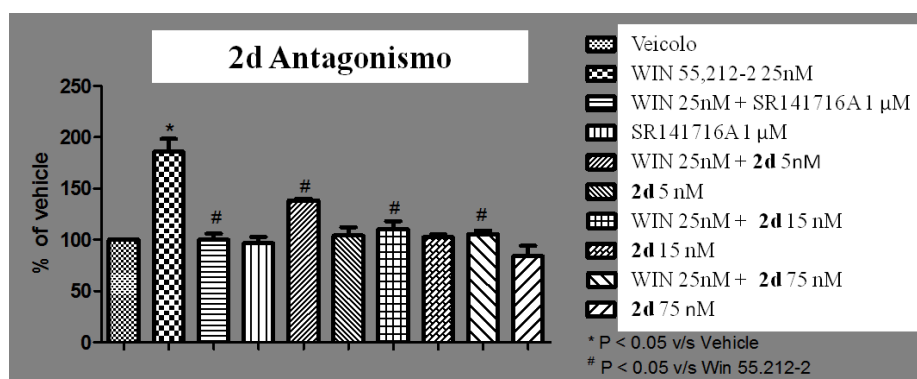
**Figura 2.10** Studi di competizione nell'espressione della P-ERK 1/2, in seguito ad un pretrattamento di 5 minuti con Rimonabant o con **2a** a tre diverse concentrazioni (5nM-250 nM) seguita da 10 minuti di trattamento con WIN.

Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



**Figura 2.11** Studi di competizione nell'espressione della P-ERK 1/2, in seguito ad un pretrattamento di 5 minuti con Rimonabant o con **2b** a tre diverse concentrazioni (5nM-75 nM) seguita da 10 minuti di trattamento con WIN.

1a non riduce significativamente l'azione del WIN a nessuna concentrazione, non comportandosi quindi da antagonista dei recettori CB<sub>1</sub>.

Il composto 1b non induce nessuna variazione nell'espressione della P-ERK alla dose di 50 nM, mentre la riduce significativamente alle altre due dosi testate (200 nM e 500nM), dimostrando di essere capace di antagonizzare l'azione del WIN.

Il composto **2a** induce una variazione significativa della risposta indotta dall'antagonista di riferimento alla sola concentrazione di 250 nM.

Infine il composto **2d** antagonizza l'azione del WIN a tutte le concentrazioni testate.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che i prodotti **1a**, **2a** e **2d** evidenziano un comportamento da antagonisti CB<sub>1</sub>, mentre il composto **1a** non ha mostrato alcun tipo di attività verso il recettore.

## 2.5 Test *in vivo* su modelli animali di obesità

E' ormai assodato che l'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> da parte del Δ<sup>9</sup>-THC o di agonisti sintetici stimola il consumo di cibo. L'iniezione di AN o 2-AG nell'ipotalamo o nel *nucleus accumbens* induce l'aumento del consumo di cibo perfino in roditori sazi mediante attivazione CB<sub>1</sub>. D'altra parte, i livelli di endocannabinoidi aumentano significativamente nell'ipotalamo e nel *nucleus accumbens* in risposta al digiuno, tornando normali dopo una nuova assunzione di cibo, mentre non cambiano in aree non coinvolte nell'alimentazione. Questa regolazione è mediata, almeno in parte, attraverso l'azione di ormoni regolatori dell'alimentazione, in

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

particolare la leptina, che ha azione anoressigenica, la grelina e i glucocorticoidi, con azione oressigenica, che rispettivamente diminuiscono ed aumentano i livelli di endocannabinoidi nell'ipotalamo. Questi ormoni risultano disregolati in caso di obesità, provocando, quindi, un elevato tono degli endocannabinoidi nell'ipotalamo. L'attivazione dell'ECS influenza anche i circuiti di ricompensa-rinforzo nel sistema mesolimbico, specialmente nel nucleus accumbens e nell'area tegmentale ventrale, in cui il sistema ECS è altamente espresso ed interagisce sia con i percorsi dopaminergici che con quelli oppioidergici, che risultano nella preferenza per il cibo altamente palatabile.<sup>[11,64]</sup> L'inibizione dei CB<sub>1</sub>, sia genetica che farmacologica, provoca ipofagia.<sup>[11]</sup>

Nel topo, in condizioni di obesità indotta dalla dieta (Diet Induced Obesity-DIO), i livelli di endocannabinoidi sono più alti nell'ippocampo, importante substrato per il consumo edonistico di cibo. Da questo deriva che in queste condizioni il cibo altamente palatabile possa essere più soddisfacente, innescando un circolo vizioso che impedisce la perdita di peso. L'innalzamento dei livelli di 2-AG ipotalamico, che accompagna la compromissione dell'espressione della leptina, potrebbe influire anche su disfunzioni metaboliche periferiche, come l'eccessivo accumulo di tessuto adiposo bianco (White Adipose Tissue, WAT) e la produzione epatica di glucosio, causando resistenza all'insulina nell'ipotalamo medio basale.<sup>[11,64]</sup> Tra i target periferici relativi al metabolismo energetico, la leptina e l'adiponectina svolgono una importante azione di trasmissione del segnale tra il WAT e le aree centrali coinvolte nella regolazione della nutrizione e del peso corporeo. Entrambi questi ormoni sono coinvolti nella azione svolta dai cannabinoidi sul consumo di cibo e sulla regolazione dell'omeostasi. La leptina inibisce l'appetito agendo sui recettori nell'ipotalamo, dove contrasta gli effetti delle molecole oressigeniche ivi prodotte, mentre l'adiponectina è un importante regolatore della sensibilità verso l'insulina. L'espressione dell'adiponectina è ridotta nei pazienti obesi e bassi livelli plasmatici di adiponectina sono legati allo sviluppo di insulino-resistenza. La leptina circola in livelli proporzionali al grasso corporeo ed insieme all'insulina è considerata il principale messaggero endocrino del tessuto adiposo nei mammiferi.<sup>[65]</sup>

Inoltre alti livelli di adiponectina sono associati all'omeostasi glucidica, alla riduzione del grasso addominale e al miglioramento cardiovascolare.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Il fegato gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi energetica di tutto il corpo, ed è questa sua abilità che viene generalmente alterata quando si presentano condizioni patologiche. E' ormai assodato il fatto che gli epatociti esprimono i recettori CB<sub>1</sub> e producono endocannabinoidi. In modelli di roditori in condizioni che inducono l'epatosteatosi, che può derivare sia dal consumo di alcool che da una dieta ricca di grassi, l'espressione dei CB<sub>1</sub> e i livelli di 2-AG e/o di AN risultano significativamente più elevate. Si è inoltre registrato che il livello di CB<sub>1</sub> epatici è up-regolato in pazienti con epatosteatosi. L'ECS epatico potrebbe contribuire a questa patologia attraverso l'interruzione delle vie di lipogenesi e lipolisi epatica e della trasmissione del segnale da parte dell'insulina.<sup>[11,64]</sup>

Considerato il profilo di binding e i risultati degli studi preliminari *in vitro* ed *ex vivo*, il composto 5-(2,2'-ditiofen-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossamide (**2d**) risulta possedere il profilo farmacologico più interessante: l'attività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub> è paragonabile a quella del Rimonabant, mentre la selettività verso gli stessi è sensibilmente maggiore. Pertanto è stato selezionato per uno studio *in vivo* su modelli animali di obesità.

L'attività sul comportamento è stata valutata sia in acuto che in cronico su topi C57BL/6J secondo le metodiche descritte da Mastinu et al,<sup>[65]</sup> inoltre è stata analizzata l'espressione genica dei peptidi coinvolti nel circuito fame-sazietà, nonché di alcuni enzimi metabolici, trasportatori monoaminergici e neurotrofine, al fine di definire il meccanismo di azione del nuovo composto e di valutarne i possibili effetti collaterali.

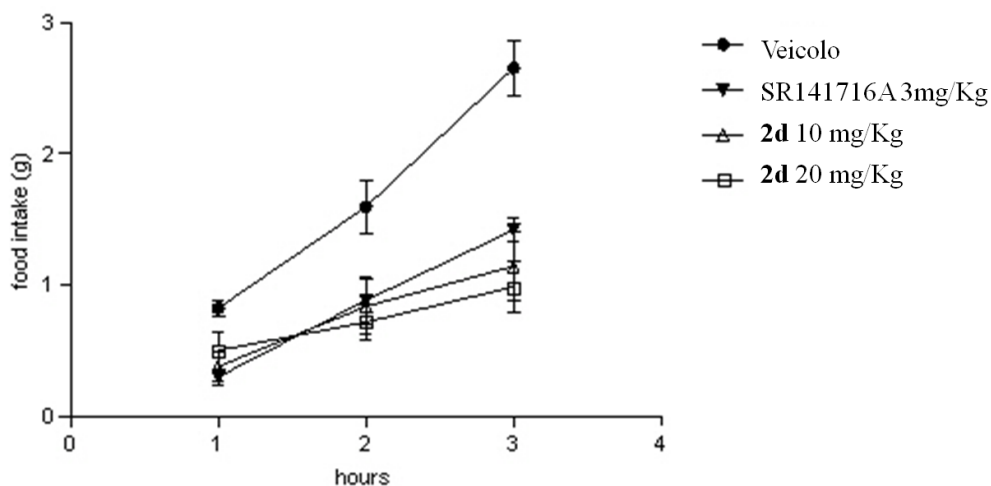
### **2.5.1 Trattamento in acuto**

La valutazione del consumo di cibo (food intake) in seguito a somministrazione in acuto è stata condotta su topi su topi C57BL/6J<sup>ob/ob</sup>. Il trattamento è stato condotto per via intraperitoneale utilizzando il Rimonabant come composto di riferimento.

Come indica il grafico in figura 2.12, ad entrambe le dosi somministrate, il composto **2d** causa una diminuzione statisticamente significativa del consumo di cibo in confronto al veicolo. Infatti il coefficiente P è < 0.05 per la dose di 10 mg/Kg e < 0.001 per quella di 20 mg/kg. Il food intake indotto da **2d** al dosaggio di 20 mg/Kg è anche tendenzialmente più



basso di quello indotto dal Rimonabant (3 mg/Kg *i.p.*), per quanto questa evidenza non abbia rilevanza statistica.



**Figura 2.12** Effetto sul food intake indotto dalla somministrazione in acuto dell'SR141716A (3mg/kg *i.p.*) e **2d** (10 mg/kg, e 20 mg/kg *i.p.*) in modelli animali di topi C57BL/6J<sup>ob/ob</sup>.

### **2.5.2 Trattamento in cronico su topi C57BL/6J-DIO**

Il trattamento in cronico è stato condotto per un periodo di 30 giorni, somministrando il composto **2d** e l'antagonista di riferimento Rimonabant su topi C57BL/6J.

Al fine di costituire un modello di obesità il più simile possibile a quello umano i topi C57BL/6J sono stati trattati, a partire dalla loro sesta settimana, con dieta ipercalorica, inducendo un considerevole aumento di peso (Diet Induced Obesity). A partire dalla decima settimana si è dato inizio al trattamento cronico, formando sei gruppi sperimentali. Tre gruppi sono stati sottoposti a “scambio” con dieta normocalorica (ND), mentre quelli restanti sono stati mantenuti in regime dietetico ipercalorico. In tutto 42 animali sono stati trattati come segue: a 14 (7 con FD e 7 con ND) è stata somministrata soluzione fisiologica e tween 20% (veicolo); a 14 è stato somministrato il Rimonabant (7 con FD e 7 con ND); infine ad altri 14 è stato somministrato il composto **2d** (7 con FD e 7 con ND). Lo studio è stato quindi condotto su 2 sperimentali e 4 di controllo, e il trattamento è stato operato per via intragastrica alla dose di 30 mg/kg (**2d**) o di 10 mg/kg (Rimonabant). Tutti i composti sono stati solubilizzati in tween 20% e soluzione fisiologica.

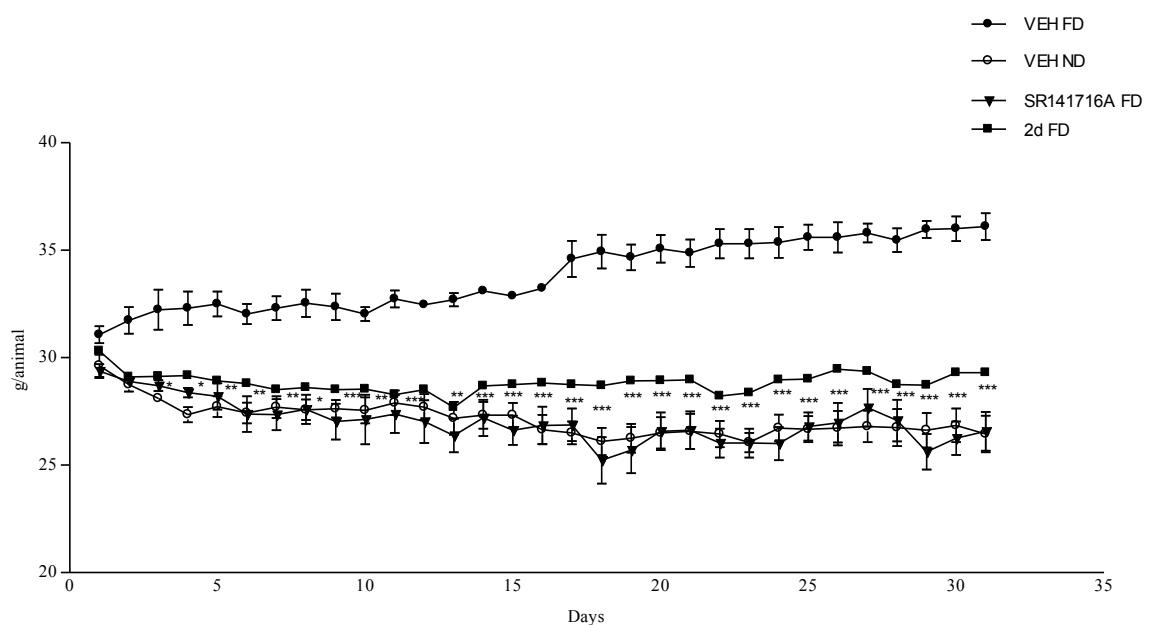
Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

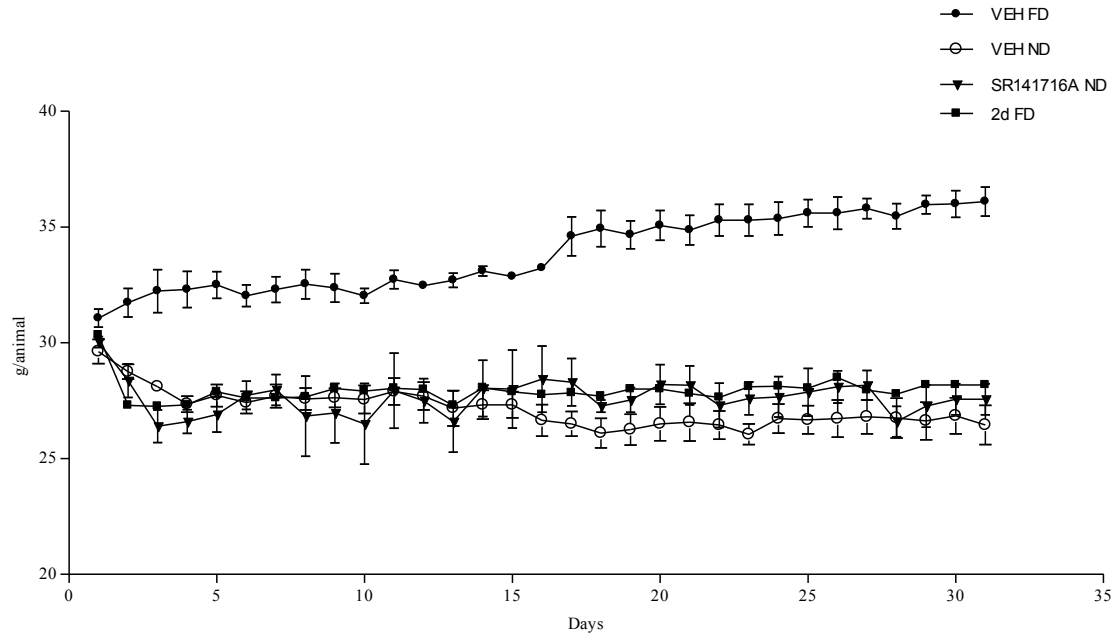
Università degli Studi di Sassari

Sono stati quindi valutati tutti parametri relativi al comportamento alimentare, come il consumo di cibo, le KJ assunte, il consumo di acqua e la variazione di peso corporeo. Per l'elaborazione dei dati sono state condotte analisi ANOVA a due vie con Bonferroni post-test. La figura 2.13 mostra la variazione di peso corporeo indotta dal trattamento con **2d** e Rimonabant in animali sottoposti a dieta ipercalorica, oltre alla variazione indotta dallo "scambio" con la dieta normocalorica (VEHND). I dati evidenziano una diminuzione significativa del peso corporeo rispetto al veicolo FD negli animali trattati sia con il nostro composto, sia con l'antagonista di riferimento. Un dato analogo si osserva anche per il gruppo sperimentale VEHND.

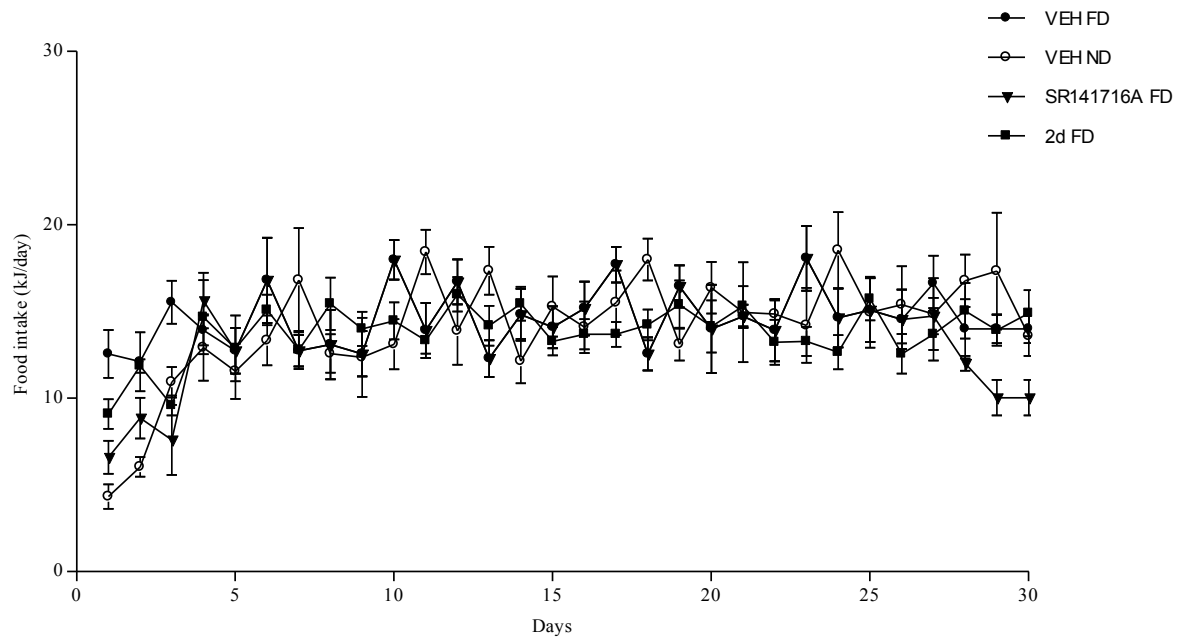


**Figura 2.13.** Variazione del peso corporeo indotta dal trattamento con **2d** and SR141716A in animali sottoposti a dieta ipercaolica. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs VEHFD.

In figura 2.14 la diminuzione del peso corporeo è enfatizzata poichè l'effetto farmacologico si combina con l'azione dello scambio di dieta.



**Figura 2.14** Variazione del peso corporeo indotta dal trattamento con 2d e SR141716A in animali sottoposti a dieta normocalorica (ND). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale.



**Figura 2.15** Effetto sul consumo di cibo a seguito di trattamento cronico con 2d e SR141716A. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale.

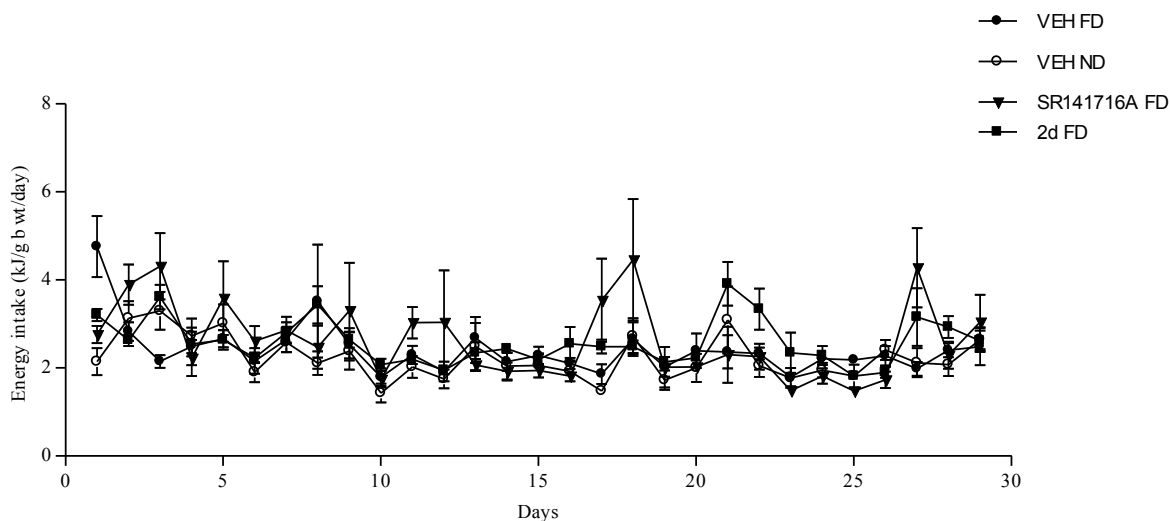
Autore: Marilena Pira

**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Nel grafico sopra riportato (figura 2.15) è evidente che per i primi giorni di trattamento cronico il Rimonabant e VEHND inducono un minore consumo di cibo rispetto a quanto indotto dal VEHFD e dal composto **2d**. Questa fase viene superata dopo il quinto giorno, a partire dal quale l'andamento del consumo di cibo (espresso in termini di KJ assunti al giorno) è simile per tutti I gruppi sperimentali.



**Figura 2.16** Effetto sul consumo energetico del trattamento cronico con 2d e SR141716A. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM, N = 7 per ciascun gruppo sperimentale.

Il consumo energetico, il cui grafico è riportato in figura 2.16, mette in correlazione i KJ assunti con la dieta e la variazione di peso corporeo durante il periodo di trattamento in cronico, e fornisce quindi una più accurata stima dell'azione di ciascun composto sul metabolismo degli animali. Dal grafico risulta evidente che l'andamento generale è identico per tutti i gruppi sperimentali.

Dai dati ottenuti possiamo concludere che il composto **2d** induce una significativa perdita di peso rispetto al gruppo di controllo trattato con veicolo e dieta ipercalorica. Il consumo energetico dopo un iniziale aumento nei primi 5 giorni di trattamento diminuisce per poi stabilizzarsi dopo il quindicesimo giorno di trattamento, mostrando un andamento del tutto analogo a quello del Rimonabant.

### **2.5.3 Studi sui meccanismi molecolari di azione**

Alla fine del trattamento cronico, dopo il sacrificio, sono stati prelevati dei tessuti da alcune aree centrali e periferiche per testare l'espressione genica di diversi marcatori coinvolti nei circuiti di fame-sazietà e che modulano la gratificazione e il piacere. A livello centrale sono state isolate: l'ipotalamo, l'ippocampo, la corteccia prefrontale, l'amigdala, il *nucleus accumbens*, e lo striato. A livello periferico sono stato isolato il grasso viscerale, l'intestino tenue e il fegato. Per l'elaborazione dei dati di espressione genica sono state condotte analisi ANOVA a due vie con Bonferroni post-test.

Per quanto riguarda le aree centrali nell'ipotalamo è stata valutata l'espressione di due neuropeptidi anoressigenici, la Proopiomelanocortina (POMC) e la trascrizione regolata da cocaina e amfetamina (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript, CARTPT), e due neuropeptidi oressigenici, il Neuropeptide Y (NPY) e il peptide Agouti correlato (Agouti Related Peptide, AGRP). E' stata inoltre considerata anche l'espressione di tre recettori coinvolti nei circuiti centrali di fame-sazietà, come il recettore CB<sub>1</sub>, il recettore della leptina (LEP-R) e quello dell'insulina (INS-R). Infine è stata valutata l'espressione, negli altri tessuti centrali isolati, di alcuni modulatori coinvolti nei circuiti nei processi di gratificazione e piacere, come il trasportatore della dopamina (DAT), della noradrenalina (NAT), della serotonina (SERT), della dopamina β-idrossilasi (DBH), l'elemento di legame responsivo al AMP ciclico (cAMP responsive element binding protein 1, CREB1) e il fattore neurotrofico cerebrale (brain-derived neurotrophic factor, BDNF).

Per quanto riguarda le aree periferiche, nel grasso viscerale è stata valutata l'espressione della leptina, del suo recettore, dell'adiponectina e del recettore CB<sub>1</sub>, mentre nell'intestino tenue si è valutata l'espressione dei recettori CB<sub>1</sub>, del recettore della leptina e di quello dell'insulina.

#### ***Circuito fame/sazietà***

Bassi livelli di insulina inducono un abbassamento nell'espressione della leptina, che a sua volta provoca un aumento nell'ipotalamo dell'espressione di neuropeptidi oressigenici come l'AGRP e l'NPY, che stimolano l'appetito.

Autore: Marilena Pira

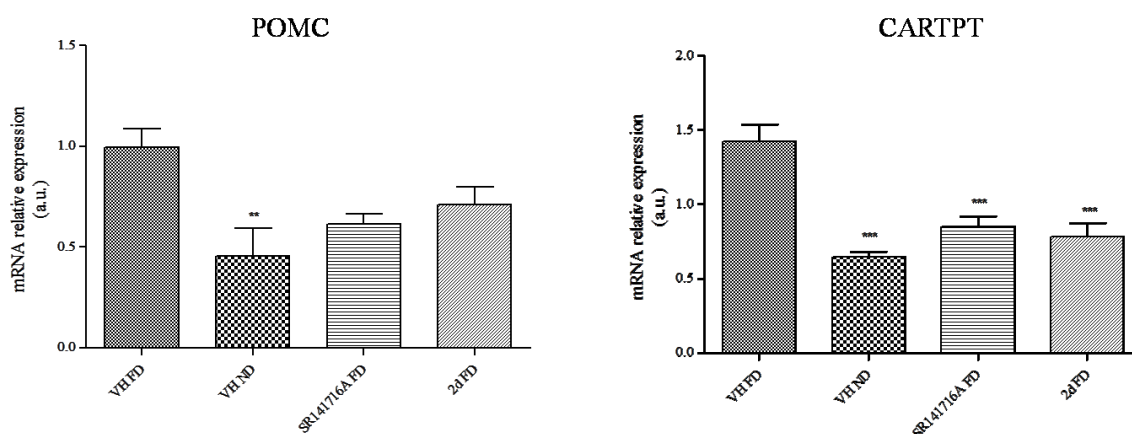
**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

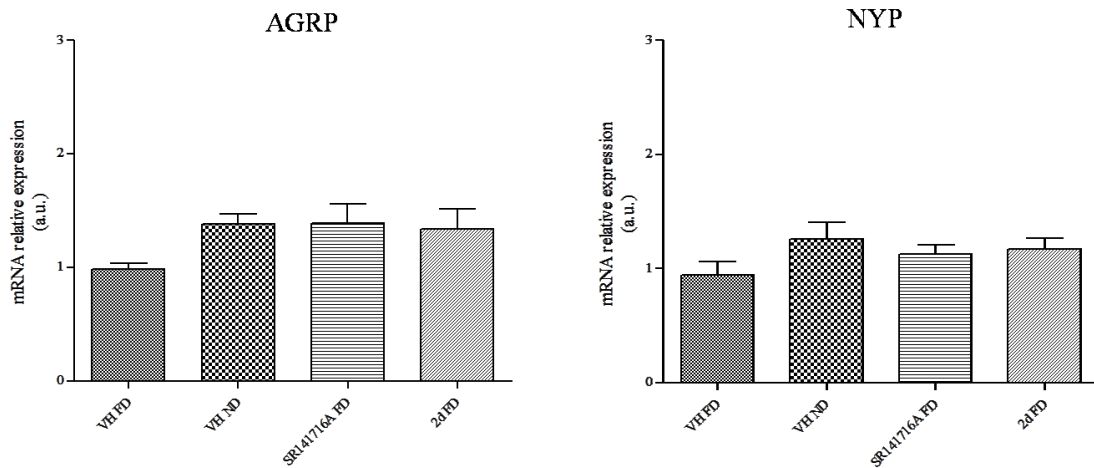
Al contrario il senso di sazietà è determinato dall'aumento nell'ipotalamo dell'espressione di neuropeptidi anoressigenici, quali la POMC e il CARTPT, come risposta all'aumento dei livelli di insulina, e dunque di leptina, nel sangue. Nell'obesità questo sistema non è più bilanciato e spesso si osserva una marcata resistenza alla leptina e all'insulina, impedendo la comunicazione all'ipotalamo del senso di sazietà. Quindi il risultato è una espressione alterata dei modulatori anoressigenici ed oressigenici.

Come mostrato nei due grafici riportati in figura 2.17, sia il trattamento farmacologico che il cambio di dieta inducono una diminuzione dell'espressione dell'mRNA per i due marcatori anoressigenici. Questa diminuzione è più marcata nel caso della CARTPT.



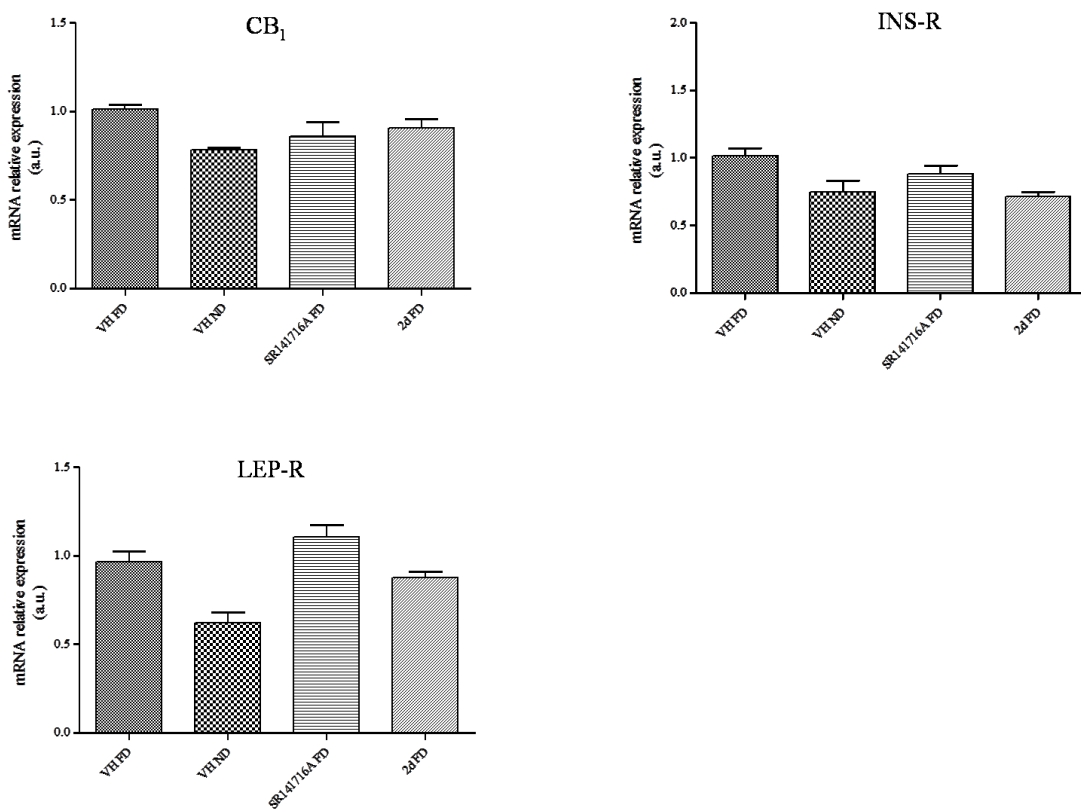
**Figura 2.17** Studio di espressione di neuropeptidi anoressigenici, POMC e CARTPT, nell'ipotalamo. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs VEHFD.

Nella figura 2.18 si nota come il composto **2d** induca un tendenziale aumento del mRNA in entrambi i modulatori oressigenici, sebbene questo effetto non abbia rilevanza statistica.



**Figura 2.18** Studio di espressione di neuropeptidi oressigenici, AGRP ed NPY, nell'ipotalamo. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.

Per quanto riguarda l'espressione dei  $CB_1$ , dei recettori LEP-R e INS-R, l'espressione dell'mRNA non cambia tra i gruppi sperimentali coinvolti.



**Figura 2.19** Studio di espressione dei recettori coinvolti nei circuiti fame/sazietà nell'ipotalamo. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.

Autore: Marilena Pira

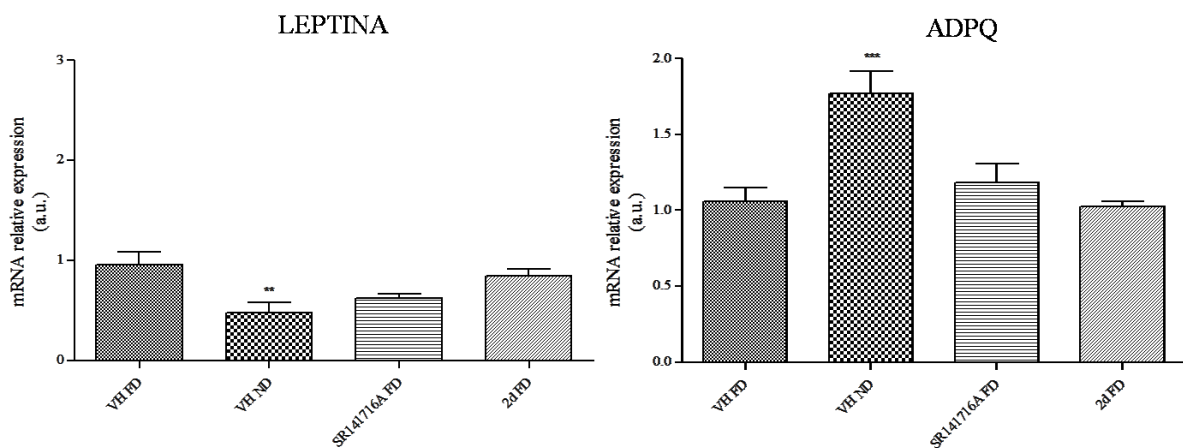
**Titolo:** Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti  $CB_1$  a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

L'ipotalamo ed il tessuto adiposo sono correlati attraverso la leptina, la cui espressione è legata ai livelli di insulina nel siero. Questi due marcatori sono connessi all'adiponectina, espressa esclusivamente nel tessuto adiposo e successivamente rilasciati nella circolazione sanguigna. I livelli ematici di adiponectina (ADPOQ) sono direttamente proporzionali al grasso viscerale dell'animale.

Al fine di valutare l'espressione dei marcatori sopra menzionati, leptina e adiponectina, il grasso addominale isolato alla fine del trattamento farmacologico è stato trattato per l'estrazione dell'RNA.



**Figura 2.19** Studi di espressione della leptina e dell'ADIPOQ nel tessuto adiposo. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs VEHFD.

Come si può evincere dal grafico riportato in figura 2.19 il trattamento con il composto **2d** induce una tendenziale diminuzione, per quanto non statisticamente significativa, dell'mRNA della leptina, rispetto al veicolo, mentre non si osserva alcun effetto sull'adiponectina. Per quanto riguarda quest'ultima, inoltre, si osserva un'unica differenza statistica nei gruppi testati, quella tra i due veicoli ND ed FD, sebbene si riscontri una leggera tendenza all'aumento nel gruppo trattato con Rimonabant.

I dati di espressione genica finora ottenuti mostrano, in accordo con quanto osservato negli studi di comportamento, una tendenza, per quanto in alcuni casi non statisticamente significativa, all'aumento dell'espressione di peptidi oressigenici e una diminuzione di quella relativa ai peptidi anoressigenici.



Allo stesso tempo la perdita di tessuto adiposo durante il trattamento farmacologico dovrebbe causare l'emissione verso l'ipotalamo di livelli minori di leptina e insulina, "sensibilizzandolo" nei confronti di questi ormoni ed aumentando, di conseguenza, l'espressione dei recettori corrispondenti. In realtà questo non si verifica. Infatti è risultata evidente l'assenza di differenze significative nell'espressione dell'mRNA dei recettori LEP-R e INS-R tra i gruppi sottoposti a trattamento farmacologico e i veicoli. In più è stato osservato l'aumento dell'espressione della leptina nel tessuto adiposo, che dovrebbe provocare l'aumento dell'espressione dei peptidi anoressigenici nell'ipotalamo inducendo la sensazione di sazietà.

Questi dati sono in accordo con quelli ottenuti nello studio di food intake e possono essere spiegati con una dicotomia tra i livelli di leptina nel siero e quelli registrati come mRNA. Possiamo ipotizzare che nell'ipotalamo i livelli di leptina siano ancora bassi e inducano un aumento dell'espressione di neuropeptidi oressigenici.

In conclusione questi dati evidenziano la complessità dei meccanismi di azione dei circuiti fame/sazietà. Sicuramente esiste un sistema regolatorio centrale, ma l'assenza di differenze nell'espressione dei recettori LEP-R e INS-R nell'ipotalamo indica l'esistenza di percorsi paralleli che operano anche sul metabolismo basale e sulla termogenesi, inducendoci ad espandere il numero di parametri necessari a valutare l'effetto antiobesità di nuovi composti.

### ***Circuiti di gratificazione e piacere***

Per poter progettare nuovi composti cannabinoidergici, efficaci sui circuiti del food intake, è necessario studiare i loro effetti sul sistema mesolimbico, responsabile del meccanismo di gratificazione e del piacere.

Nell'ippocampo, la corteccia prefrontale, l'amigdala, il *nucleus accumbens* e lo striato prelevati dai topi C57BL/6J DIO al termine del trattamento in cronico, è stata determinata l'espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, CREB1 e BDNF, marcatori coinvolti nei meccanismi di gratificazione e piacere.

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 2.21-2.25.

I dati di espressione genica confermano l'azione inibitoria del Rimonabant sui mediatori dei circuiti della gratificazione e del piacere. Il Rimonabant non induce una variazione

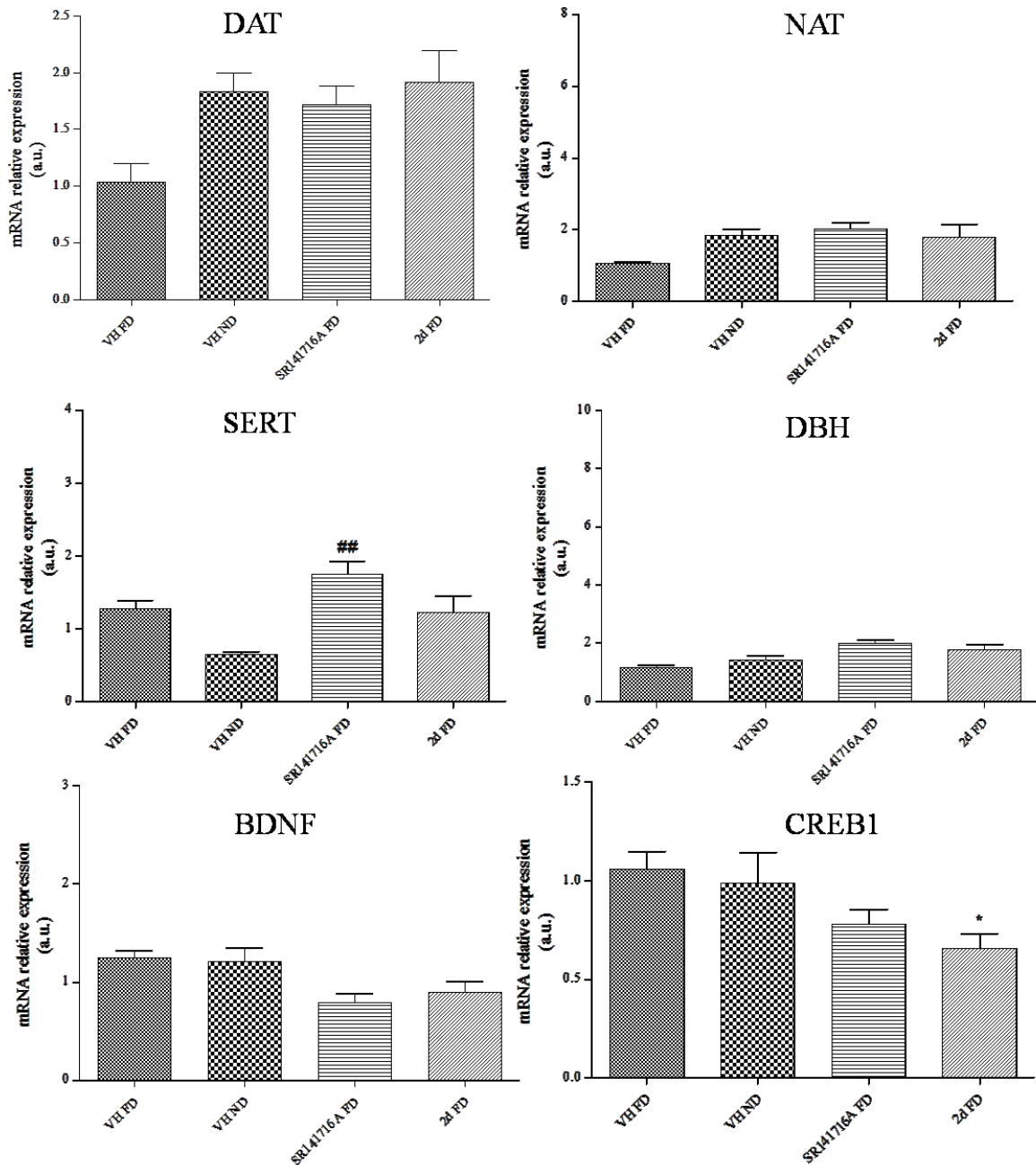
Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossamidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

dignificativa, rispetto al veicolo, nell'espressione genica dei marcatori studiati, tuttavia evidenzia una marcata inibizione di NAT e DAT nella corteccia prefrontale e del BDNF nell'amigdala. Il nuovo composto **2d** esibisce un comportamento simile a quello del Rimonabant in tutte le aree centrali.



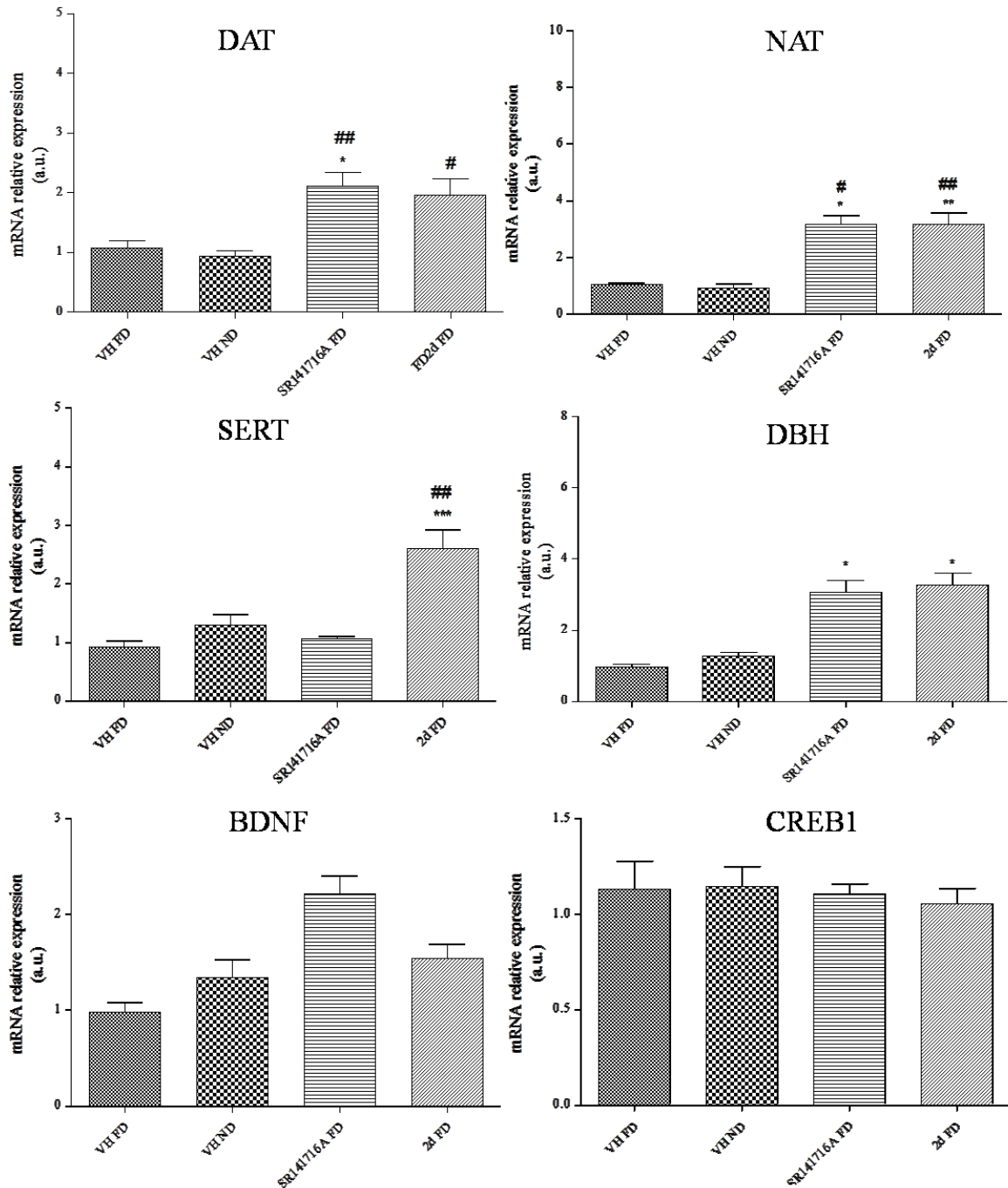
**Figura 2.21** Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nell'Amigdala. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs VEHFD; ## $p < 0.01$  vs VEIND.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



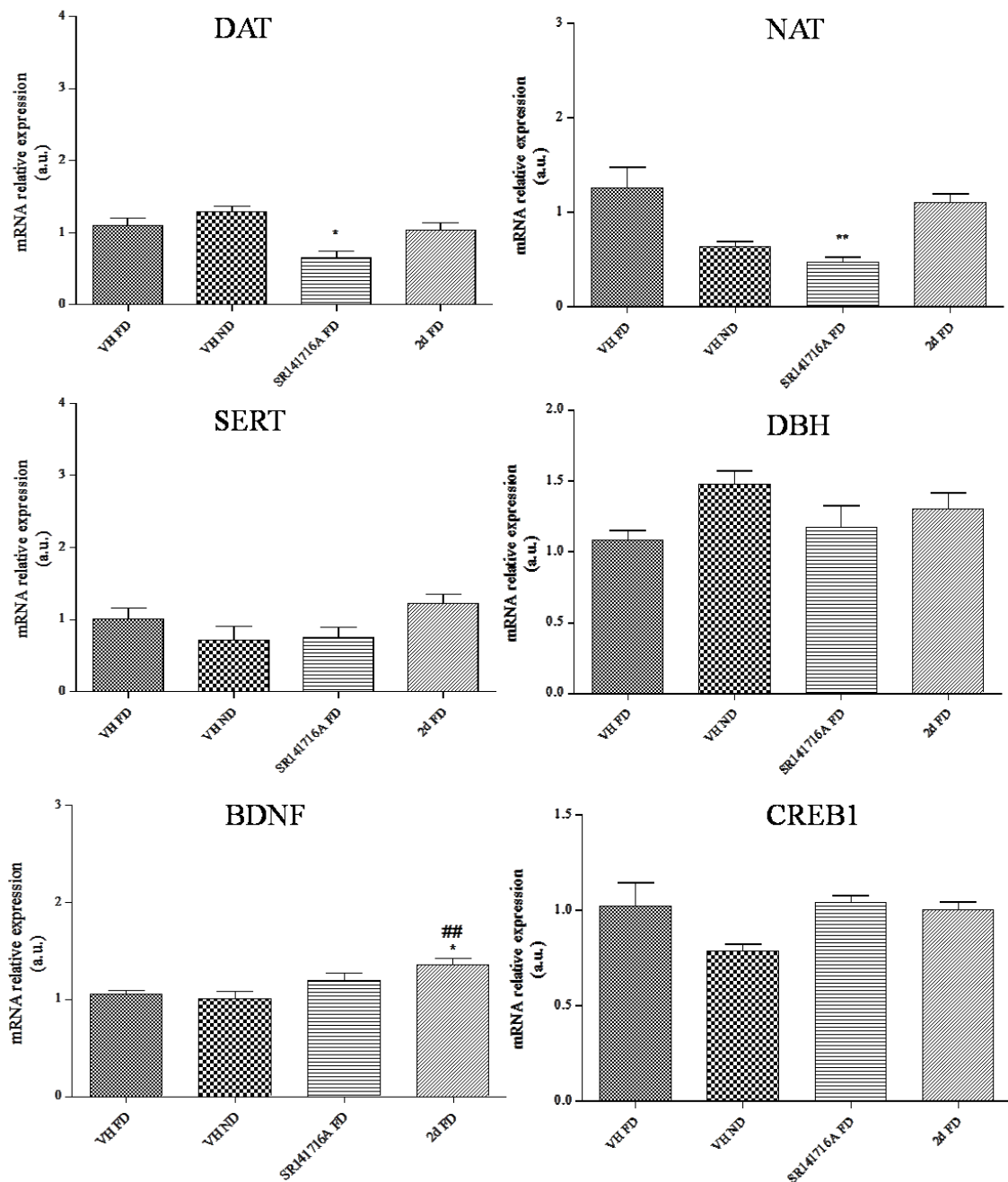
**Figura 2.22** Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nell'Ippocampo. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs VEHFD; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs VEHND.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



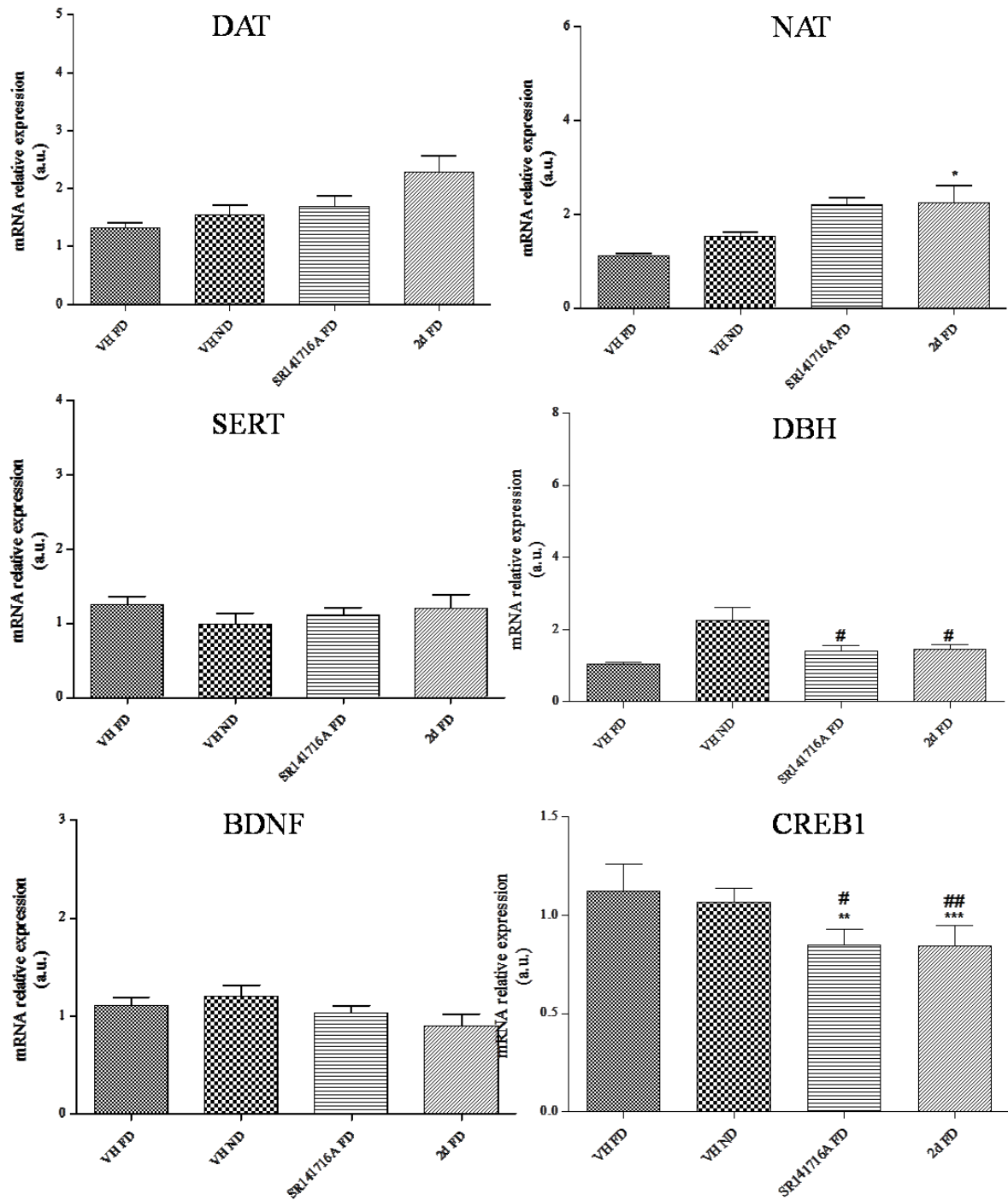
**Figura 2.23** Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nella Corteccia Prefrontale. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs VEHFD; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs VEIND.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



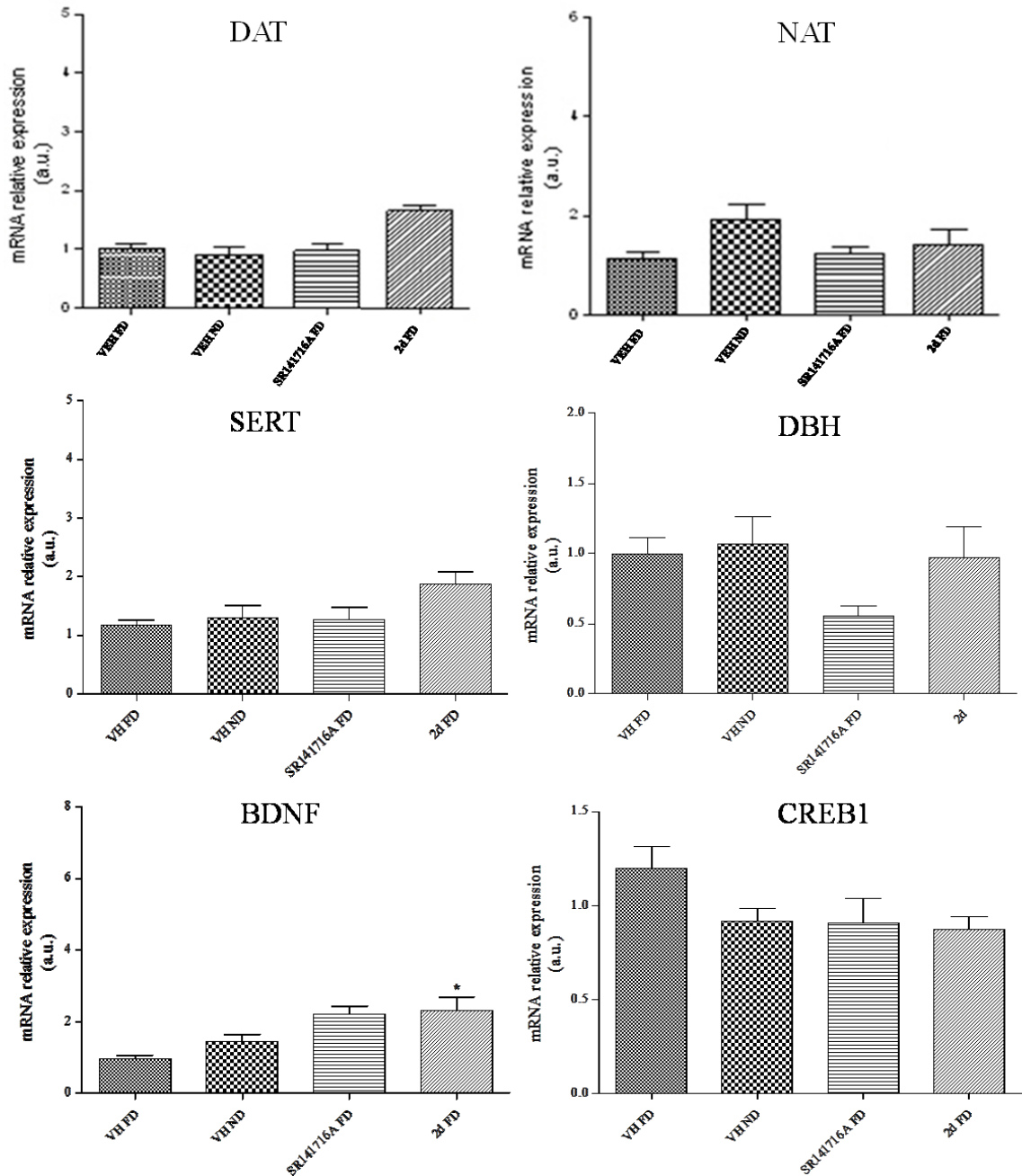
**Figura 2.24** Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nel Nucleus Accumbens. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs VEHFD; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs VEHND.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



**Figura 2.25** Espressione di DAT, NAT, SERT, DBH, BDNF e CREB1 nello Striato. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs VEHFD.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

### ***Parametri ematici***

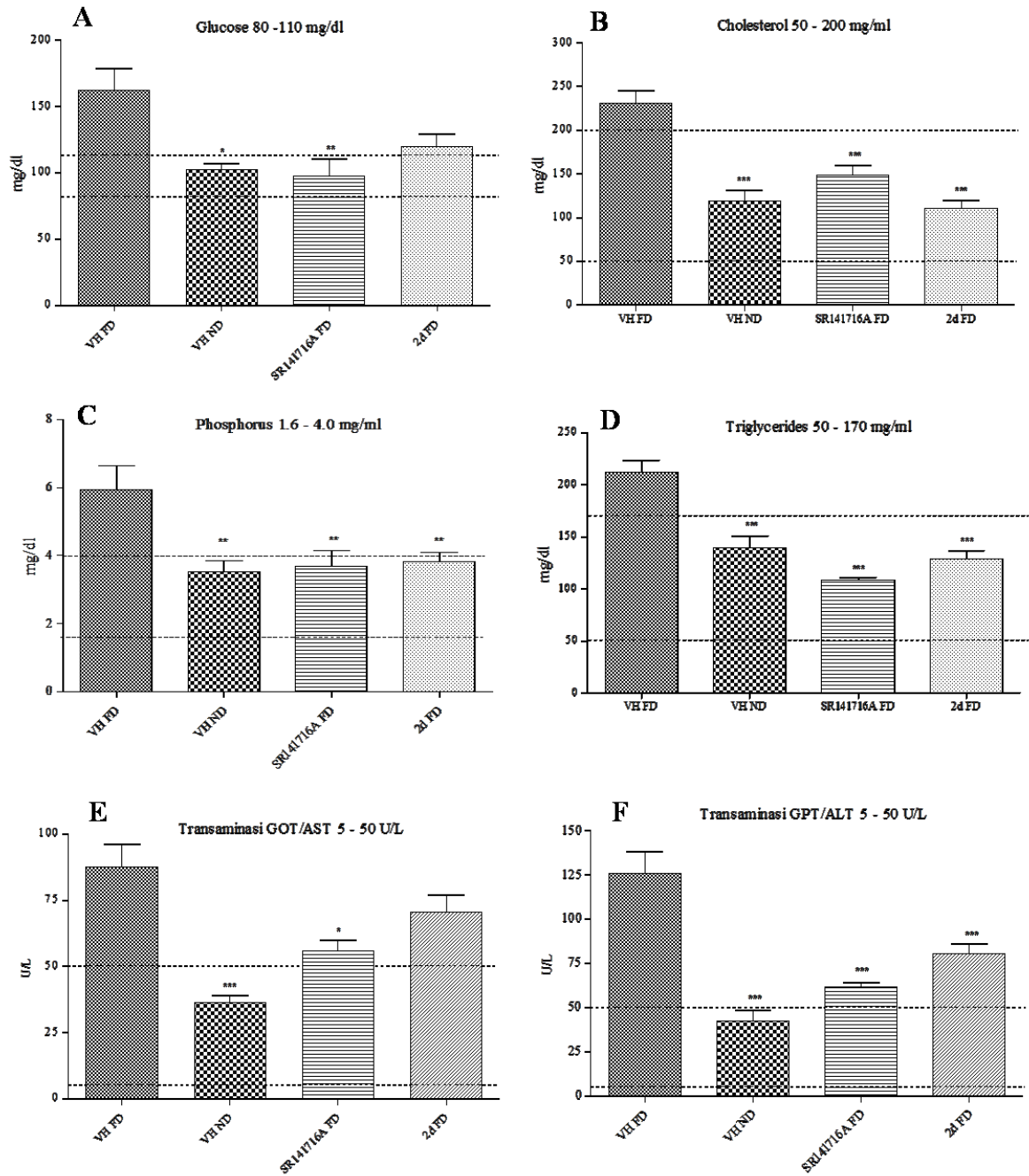
Il nostro studio sulla regolazione dell'espressione dei modulatori dei meccanismi molecolari coinvolti nei circuiti fame/sazietà si completa con i dati emato-chimici, ottenuti dagli stessi campioni sui quali sono state condotte le analisi molecolari.

Al termine del trattamento in cronico approssimativamente sono stati prelevati 500/700 µl di sangue da ciascuno dei 42 topi C57BL/6J DIO coinvolti nello studio. Il sangue è stato centrifugato ottenendo 200/300 µl di siero, che è stato sottoposto ad analisi emato-chimiche per la determinazione di glucosio, trigliceridi, colesterolo totale, transaminasi ALT e GPT.

I valori normali corrispondono ai valori basali determinati con lo strumento KeyLab di Biosed, utilizzato per le analisi.

I dati derivanti da questo studio mostrano che un trattamento cronico con dieta ipercalorica conduce ad un profilo emato-chimico alterato (Figura 2.26A-F). Sia il trattamento farmacologico in cronico, che il cambio di dieta, riportano tutti i parametri ai livelli fisiologici, come risulta nei grafici relativi a colesterolo, trigliceridi e fosforo (Figura 2.25 B, C e D), il cui aumento è strettamente legato all'insorgenza di patologie cardio-vascolari. I livelli di glucosio rientrano nei parametri normali, anche se nel gruppo trattato col composto **2d** eccede i livelli basali.

I valori relativi alle transaminasi, tuttavia indicano la presenza di una epatosi, confermata dai livelli elevati di entrambi gli enzimi in tutti i gruppi trattati. Questo dato conferma il fatto che una dieta ipercalorica sia causa di un evidente danno epatico che viene ridotto solo in parte dell'azione farmacologica, mentre il ripristino di una dieta normocalorica riporta il sistema in condizioni fisiologiche.



**Figura 2.26** Profilo emato-chimico. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs VEHFD.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari



## 2.6 Conclusioni.

Abbiamo ottenuto sei 5-(5-ariltien-2-il)-1-(2,4-dialofenil)-4-alchil-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carbossamidi (**2a-d**) e i corrispondenti precursori 5-bromo-2-tienilici (**1a-c**) per i quali è stata determinata l'affinità e la selettività verso i recettori cannabinoidi mediante studi di binding. La sostituzione del cloro con il fluoro sulla porzione alofenilica diminuisce sensibilmente l'affinità nei confronti di entrambi i recettori cannabinoidi. Nei composti **2a-b,d-e**, l'inserimento del sostituente arilico induce un sensibile aumento della selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>, mentre si verifica il contrario per i composti **2c,f**.

Non è possibile determinare con certezza se i composti attraversino a o meno la BBB attraverso modelli predittivi *in silico*.

Gli studi di attività *in vitro* ed *ex vivo* indicano che i composti **1a**, **1b**, **2a**, **2d** si comportano da antagonisti dei recettori CB<sub>1</sub>.

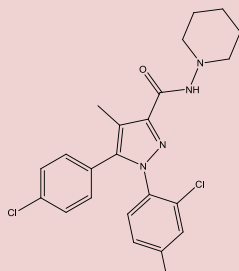
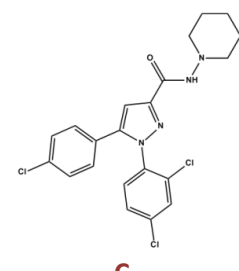
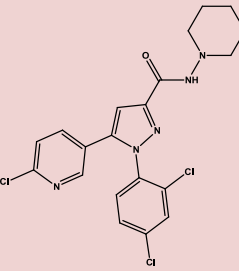
Il composto 5-(2,2'-bitiofen-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-*N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carbossamide (**2d**) è stato selezionato per uno studio *in vivo* di comportamento alimentare su un modello animale di obesità. In base ai risultati ottenuti, sia in cronico che in acuto, e dallo studio dei meccanismi molecolari coinvolti, possiamo concludere che l'azione del **2d** per il trattamento dell'obesità non si discosta in maniera significativa da quella dell'antagonista di riferimento Rimonabant.

### 3.0 Derivati piridinici

#### 3.1 Introduzione

In passato è stata sintetizzata una serie di composti analoghi del Rimonabant recanti un anello piridinico al posto dell'anello fenilico in C5 non sostituiti in C4,<sup>[30]</sup> dei quali riportiamo come esempio il composto **D** (tabella 3.1).

**Tabella 3.1** Affinità nei confronti dei recettori cannabinoidi del Rimonabant e di due analoghi con H in C4.

Composto	Ki (CB1) nM	Ki (CB2) nM
 <p><b>Rimonabant</b></p>	11.5	1643
 <p><b>C</b></p>	37.9	731.0
 <p><b>D</b></p>	450 ± 29	3250 ± 714

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

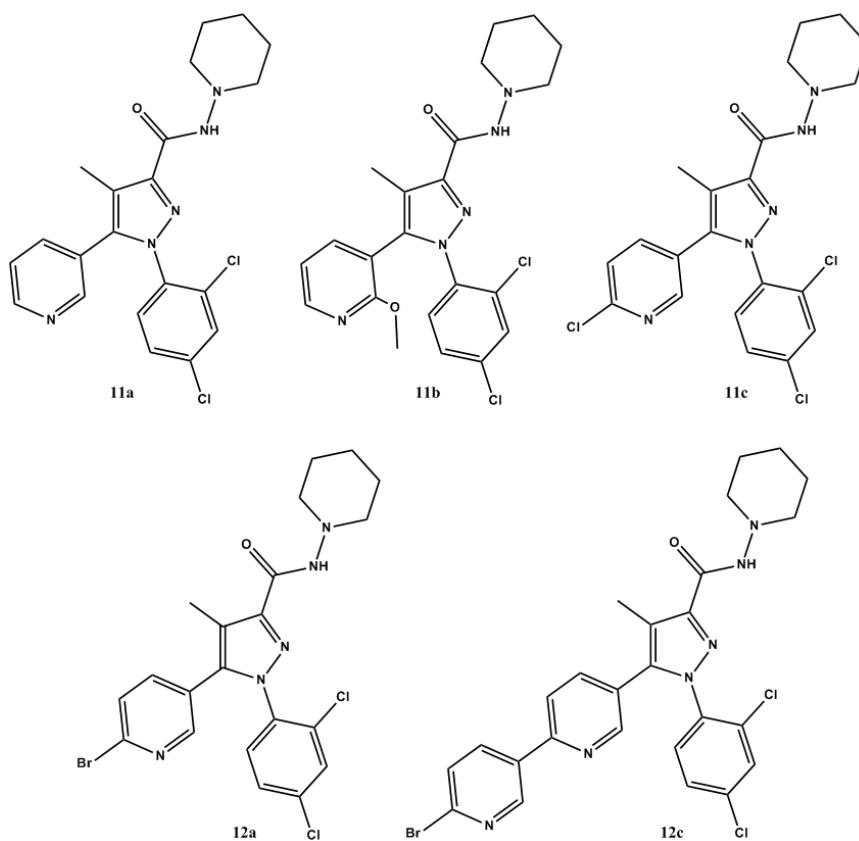
Università degli Studi di Sassari

Come prevedibile, i dati di affinità nei confronti dei recettori cannabinoidi ottenuti per questi composti non sono ideali.

Infatti gli studi SAR relativi al Rimonabant e ai suoi numerosi analoghi hanno evidenziato l'importanza del sostituente alchilico in C4 nell'anello pirazolico per l'affinità e la selettività nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>,<sup>[41]</sup> come si può notare anche confrontando i dati di binding relativi al Rimonabant con il suo analogo non sostituito **C**,<sup>[29]</sup> riportati in tabella 3.1.

Per alcune classi di molecole la differenza di affinità tra composti non sostituiti e gli analoghi alchilati o alogenati raggiunge i 12 ordini di grandezza.<sup>[41]</sup> Pertanto abbiamo ritenuto potesse essere interessante sintetizzare una nuova classe di composti recante sia un sostituente alchilico in C4, sia un anello piridinico in C5, nella speranza di ottenere dei nuovi cannabinoidi con elevata tPSA potenzialmente attivi e selettivi nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub>.

Sono state ottenute cinque 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-5-(piridinil)-1H-pirazole-3-carbossammidi (**11a-c** e **12a-b**, figura 3.1) recanti diversi sostituenti e diverse posizioni di attacco sull'anello piridinico.



**Figura 3.1** 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-5-(piridinil)-1H-pirazole-3-carbossammidi ottenute.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB<sub>1</sub> a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

### 3.2 Sintesi

La principale difficoltà legata alla sintesi dei derivati contenenti il nucleo piridinico è proprio rappresentata dall'inserimento della porzione alchilica sul C4 dell'anello pirazolico, che, come appena detto, è uno dei gruppi cruciali per garantire una buona affinità nei confronti dei recettori CB1.

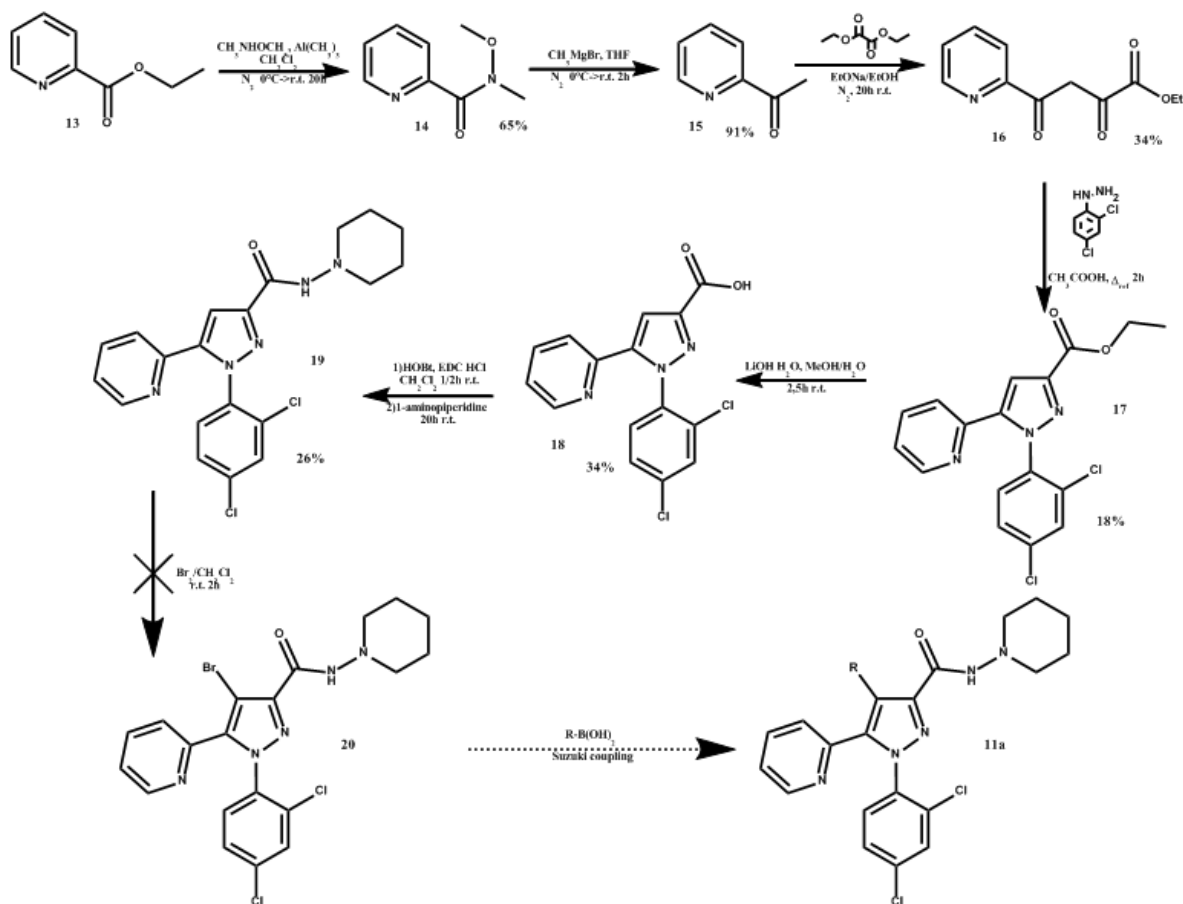
Il primo approccio da me seguito si basava sulla sintesi dei derivati fenilici e tiofenici riportata nel brevetto US7659407B2<sup>[29]</sup> (Schema 2.1, riferito ai composti tiofenici) al quale erano state applicate delle modifiche che consentissero l'inserimento dell'anello piridinico in considerazione delle sue caratteristiche chimiche.

La maggior parte di queste modifiche erano dettate dall'impossibilità di inserire l'opportuna catena alchilica a partire dalla formazione del chetone, come avviene nello schema dei prodotti tienilici (schema 2.1). Si è infatti osservato che l'utilizzo di chetoni con catena alchilica più lunga danno luogo a decarbossilazione, con ottenimento dell'estere corrispondente<sup>[66]</sup>.

Come riportato nello schema 3.1, il processo sintetico inizia con la formazione dell'1-(piridin-2-il)-etanone a partire da etil picolinato (**13**) (o da altro intermedio analogo opportunamente sostituito) attraverso la corrispondente amide di Weinreb<sup>[67-68]</sup> (**14**). L' $\alpha,\gamma$ -dichetoestere 2,4-dioxo-4-(piridin-2-il)butanoato di etile (**16**) viene ottenuto mediante condensazione di Claisen utilizzando un equivalente di etossido di sodio come base ed il dietilossalato come elettrofilo<sup>[69-70]</sup>. La reazione con 2,4-diclorofenilidrazina in acido acetico consente la formazione dell'anello pirazolico del 1-(2,4-diclorofenil)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilato di etile<sup>[29]</sup> (**17**).

L'idrolisi in ambiente basico, con formazione del corrispondente acido 1-(2,4-diclorofenil)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilico (**18**), seguita da coupling con opportuna ammina conduce alla 1-(2,4-diclorofenil)-*N*-(piperidin-1-il)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossammide (**19**).

Come illustrato nello schema, la metodica proposta prevedeva quindi la bromurazione del C4 in modo che fosse possibile inserire il gruppo alchilico desiderato mediante coupling di Suzuki o procedura analoga<sup>[71]</sup>, ma non è stato possibile isolare alcun prodotto bromurato, nonostante le diverse metodiche applicate.

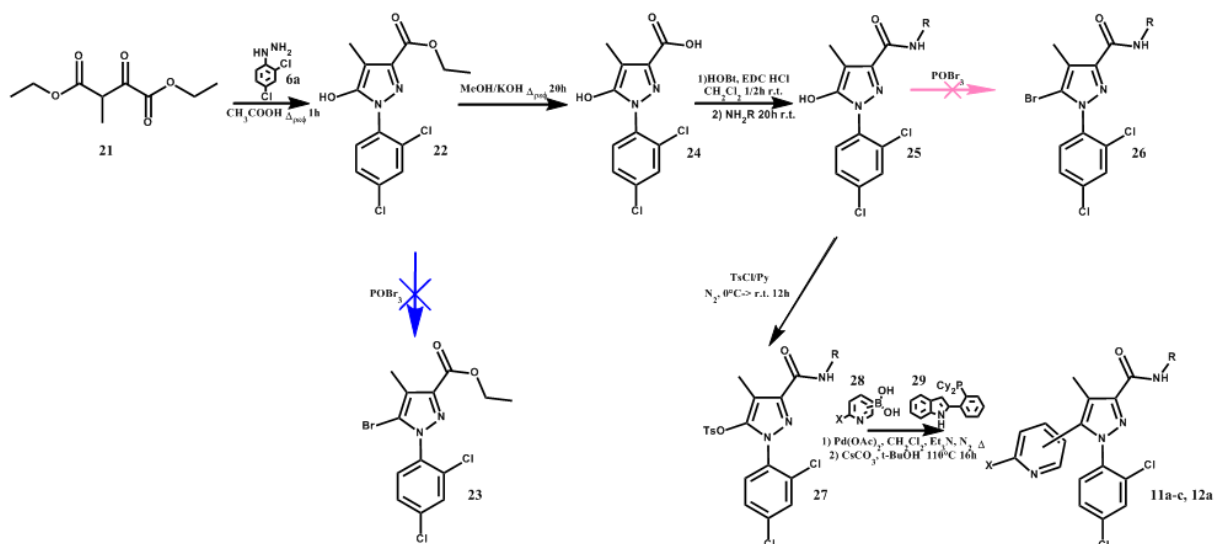


**Scheme 3.1.** Prima strategia sintetica proposta per la sintesi di derivati piridinici.

Ipotizzando che la presenza dell'anello piridinico disattivasse la posizione C4 del pirazolo, ho progettato una sintesi alternativa che escludesse la porzione piridinica per la maggior parte del processo, limitando le problematiche ad esso collegate.

Come evidenziato nello schema 3.2 sotto riportato, la strategia sintetica prevede la costruzione dell'alcool pirazolico 1-(2,4-diclorofenil)-5-idrossi-4-etil-1*H*-pirazol-3-carbossilato di etile (**22**), a partire dal dietilossalpropionato (**21**), attraverso il quale sia poi possibile inserire un bromo che consenta, ad un punto conveniente del processo, di inserire l'anello piridinico mediante coupling di Suzuki.<sup>[72-74]</sup>

Nonostante molteplici tentativi con diverse metodiche<sup>[72-74]</sup> e su vari intermedi del processo, non è stato possibile ottenere alcun prodotto bromurato che consentisse di completare la sintesi dei derivati cercati.

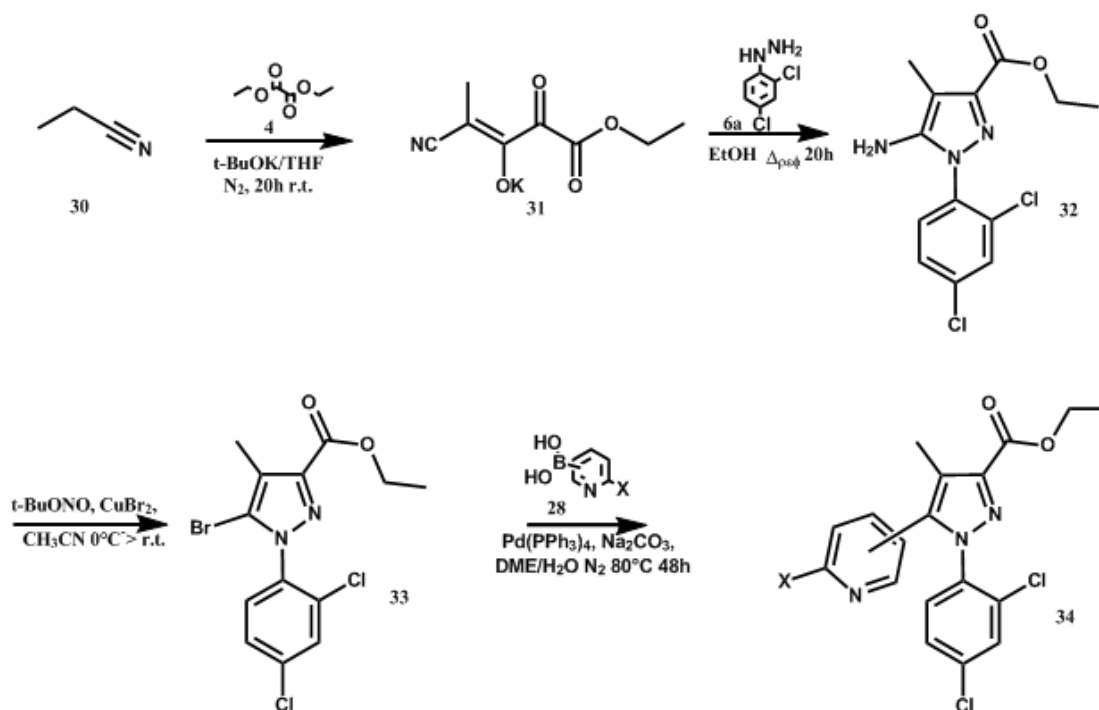


**Schema 3.2** Seconda strategia sintetica proposta per la sintesi di derivati piridinici.

In recenti pubblicazioni sono stati riportati diversi esempi di coupling di Suzuki a partire da substrati tosilati o mesilati, con l'ausilio di un opportuno legante<sup>[37,75-76]</sup>, pertanto si è pensato di utilizzare degli intermedi tosilati, al posto di quelli bromurati, per procedere nel percorso sintetico progettato.

La tosilazione delle 1-(2,4-diclorofenil)-5-(piridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossammidi (**25**) procede con rese quantitative, ma la successiva reazione di coupling impone condizioni che provocano l'idrolisi degli intermedi tosilati riconducendo ai corrispondenti alcool di partenza. Considerate le difficoltà incontrate, è progettato un nuovo schema sintetico che si fonda sulla formazione di un 4-metil-5-ammino-pirazolo (Schema 3.3).

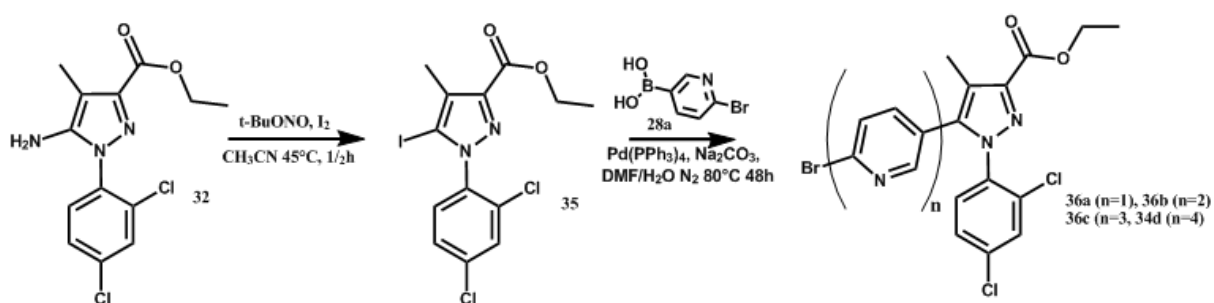
Analogamente a quanto riportato da Silvestri et al.<sup>[77]</sup> il 2-ciano-4-etossi-4-osso-2-buten-2-olato di potassio (**31**), ottenuto per trattamento del dietil ossalato con propionitrile (**30**) in presenza di potassio tert butossido, viene fatto reagire con 2,4-diclorofenilidrazina cloridrata in etanolo per ricavare l'etil 1-(2,4-diclorofenil)-5-amino-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**32**). Le rese di questo passaggio sono piuttosto basse rispetto al quelle del processo analogo su derivati tiofenici o fenilici. Il 5-bromo derivato **33** viene ottenuto per decomposizione del corrispondente sale di diazonio in presenza di t-butilnitrito e CuBr<sub>2</sub> il quale viene convertito negli etil 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-5-(piridinil)-1*H*-pirazol-3-carbossilati (**34**) per reazione di coupling di Suzuki con opportuno acido o estere boronico.



**Schema 3.3** Percorso sintetico mediato dal 4-metil-5-ammino-pirazolo (**32**).

Considerando gli incoraggianti risultati ottenuti con i derivati aril ed eteroaril tiofenici, ritenevo potesse essere interessante valutare le conseguenze dell'inserimento di gruppi analoghi sull'anello piridinico attraverso un 5-bromopiridinil-pirazolo derivato.

L'inserimento della porzione bromopiridinica ha richiesto delle modifiche alla metodica applicata per la spiccata tendenza alla polimerizzazione degli acidi alopiridinil boronici nelle condizioni della reazione di coupling di Suzuki, come riportato da Burzicki et al.<sup>[78]</sup>



**Schema 3.4** Formazione dell'etil 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-5-(6-bromopiridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**36a**) e degli analoghi polipiridinici (**36b-d**).

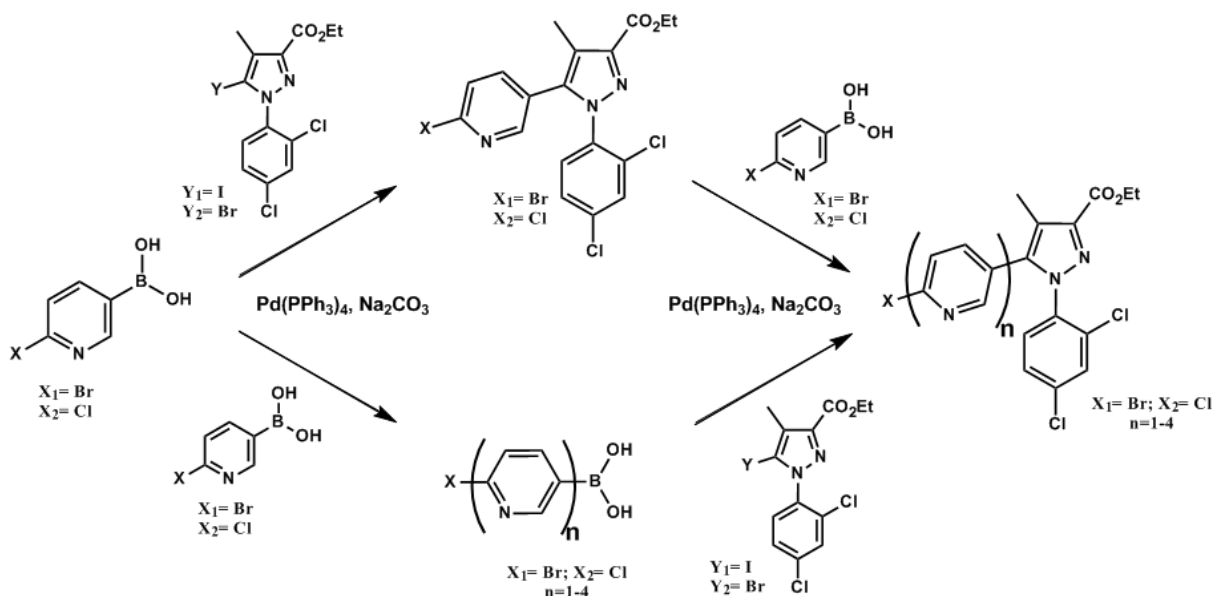
Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Pertanto nel tentativo di aumentare l'affinità nei confronti del nostro substrato abbiamo costruito l'intermedio etil 1-(2,4-diclorofenil)-5-iodo-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**35**) (Schema 3.4) che dovrebbe rappresentare il target preferenziale della reazione di coupling. L'etil 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-5-(6-bromopiridin-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**36a**) corrispondente è stato ottenuto comunque con rese bassissime per la coformazione di prodotti polipiridinici (**36b-d**), che sono stati isolati e caratterizzati. Lo Schema 3.5 propone i possibili meccanismi di formazione dei molteplici prodotti ottenuti.



**Figura 3.5** Possibili meccanismi coinvolti nella formazione di derivati polipiridinici nella reazione di coupling di Suzuki con acido bromopiridinil boronico e cloropiridinil boronico.

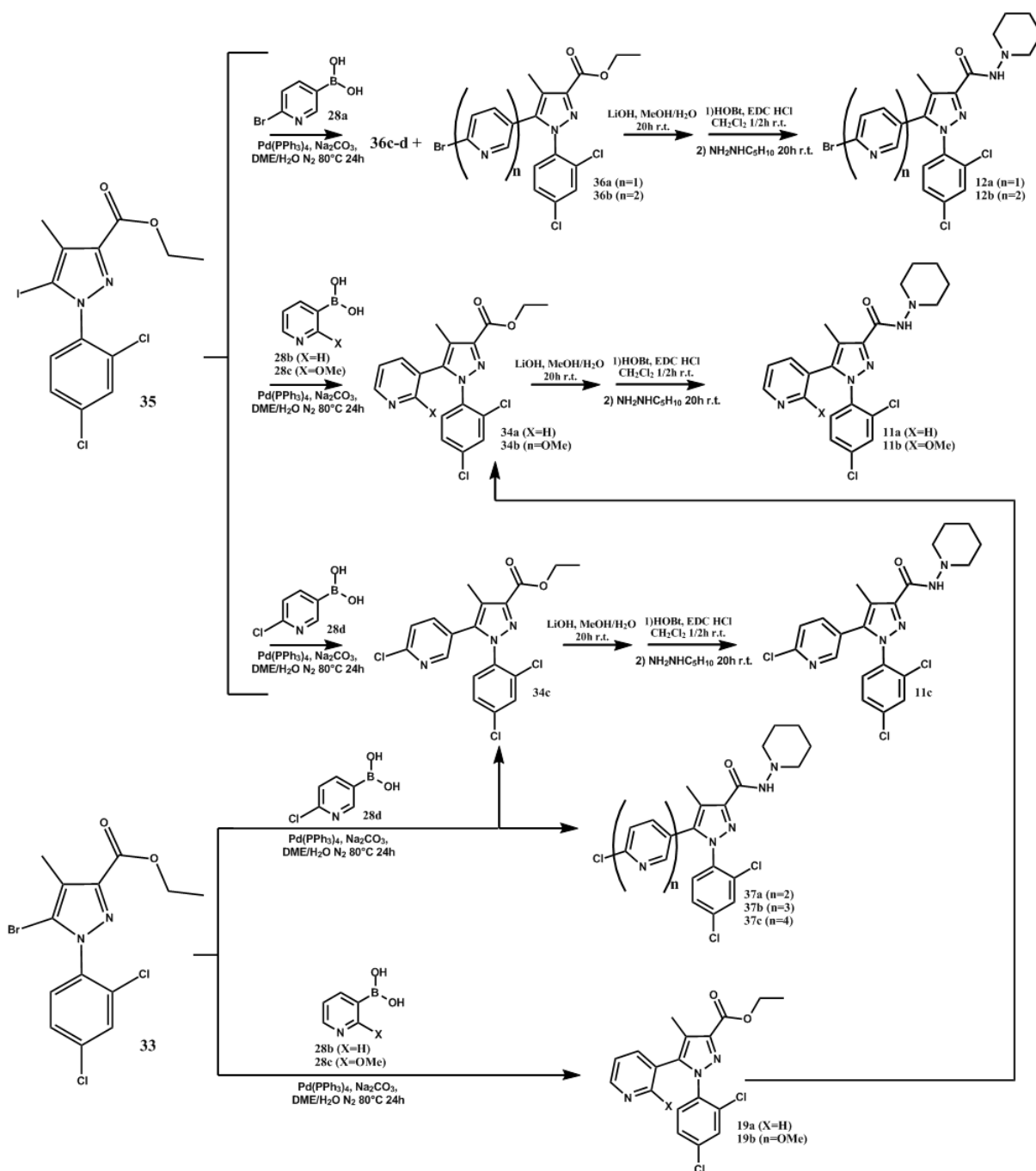
Curiosamente la reazione tra il bromo-pirazolo (**33**) e l'acido 6-cloro-piridin-3-boronico (**28d**, schema 3.6) conduce agli analoghi clorurati di quelli ottenuti nel processo descritto nello schema 3.4 (**37a-c**, schema 3.6). Probabilmente il bromo-pirazolo risulta talmente disattivato da favorire i processi collaterali di polimerizzazione (schema 3.5), nonostante la reattività generalmente bassa esibita da substrati clorurati nelle reazioni di coupling di Suzuki.

L'ipotesi di una scarsa reattività del substrato **33** è supportata anche dalle basse rese ottenute nelle reazioni con acidi boronici non soggetti a processi secondari, come l'acido 3-piridinilboronico (**28b**) e quello 2-metossi-3-piridinilboronico (**28c**) (schema 3.6).

L'utilizzo del etil 1-(2,4-diclorofenil)-5-iodo-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**35**) come substrato ha determinato un consistente aumento delle rese di reazione. Per esempio la resa della



formazione dell'etil 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-il)-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**34a**) è passata dal 25% all'80%, mentre la reazione di coupling con cloropiridina ha portato alla formazione esclusivamente del prodotto monosostituito (**34c**) con rese discrete.



**Schema 3.6** Riassunto del percorso sintetico applicato per ottenere le 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-5-(piridinil)-1*H*-pirazol-3-carbossammidi **11a-c** e **12a-b**.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

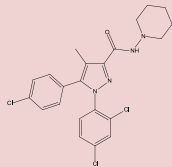
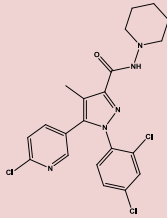
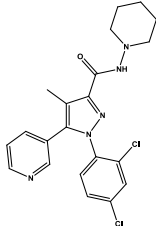
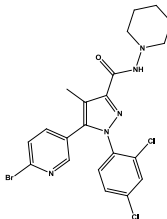
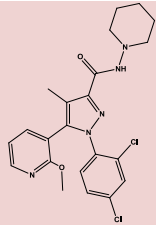
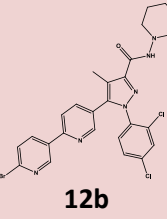
Università degli Studi di Sassari

Gli esteri **34a-c** ottenuti sono stati attivati mediante idrolisi basica in condizioni blande e quindi convertiti nelle ammidi corrispondenti (**11a-c**) con addizione di 1-amminopiperidina (schema 3.6).

La stessa procedura sintetica (schema 3.6) è stata applicata all'estere **36a** e, poiché fin dall'inizio eravamo interessati a valutare anche l'effetto dell'inserimento di un sostituito arilico sull'anello piridinico, all'estere **36b**, ottenendo le corrispondenti ammidi **12a** e **12b** con rese discrete.

### 3.3 Predizione *in silico* dell'attraversamento della BBB.

Tabella 3.2 cLogP, tPSA e Log BB dei composti Rimonabant, 11a-c e 12a-b.

Compound	cLogP	tPSA Å <sup>2</sup>	logBB	Compound	cLogP	tPSA Å <sup>2</sup>	logBB
 <b>Rimonabant</b>	5.36	50.16	0.211	 <b>11c</b>	4.42	63.05	-0.122
 <b>11a</b>	3.53	63.05	-0.257	 <b>12a</b>	4.62	63.05	-0.077
 <b>11b</b>	3.97	72.28	-0.327	 <b>12b</b>	4.30	75.94	-0.331

**cLogP** – coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua calcolati, **tPSA** – topological polar surface area [Å<sup>2</sup>]. **Log BB** – attraversamento della BBB predetto.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

Ho ritenuto potesse essere interessante una valutazione teorica della potenziale interazione con la BBB dei miei composti. In tabella 3.2 sono riportati i parametri di lipofilicità e tPSA calcolati, nonché i relativi valori di logBB ottenuti applicando lo stesso modello di regressione QSAR utilizzato per i composti tienilici nel paragrafo 2.3.

I valori di logBB ottenuti non forniscono una indicazione certa che i composti non attraversino la barriera ematoencefalica, ma sono sensibilmente più bassi di quelli relativi sia al rimonabant, sia ai composti **1a-c** e **2a-f** descritti nel capitolo 2.

### 3.4 Conclusioni

Sono state ottenute cinque 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-5-(piridinil)-1*H*-pirazole-3-carbossammidi, per le quali i valori di logBB predetti risultano promettenti.

L'affinità e l'attività nei confronti dei recettori cannabinoidei deve essere ancora valutata.

## 4.0 Derivati $\alpha$ -bromo-pirrolici

### 4.1 Introduzione

Parallelamente all'attività di progettazione e sintesi dei derivati piridinici descritti nel capitolo 3, ho deciso di sintetizzare una nuova classe di composti con *core* pirazolico recanti un diverso eteroarile azotato, che esibiscano elevata tPSA e bassa lipofilità.

In passato erano state ottenute alcune 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil- 5-(1*H*-pirrol-2-il)-1*H*-pirazol-3-carbossammidi non recanti alcun sostituito sulla porzione pirrolica. Come prevedibile queste molecole hanno mostrato bassissima affinità nei confronti dei recettori cannabinoidi.<sup>[15,41]</sup> Considerate le caratteristiche chimiche uniche del pirrolo ho ritenuto potesse essere interessante verificare l'effetto dell'inserimento di un sostituito in  $\alpha$  all'NH sull'affinità nei confronti dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. In particolare l'ottenimento di un derivato  $\alpha$ -bromo-pirrolico consentirebbe poi l'inserimento vari sostituiti utilizzando diverse possibili reazioni di coupling.

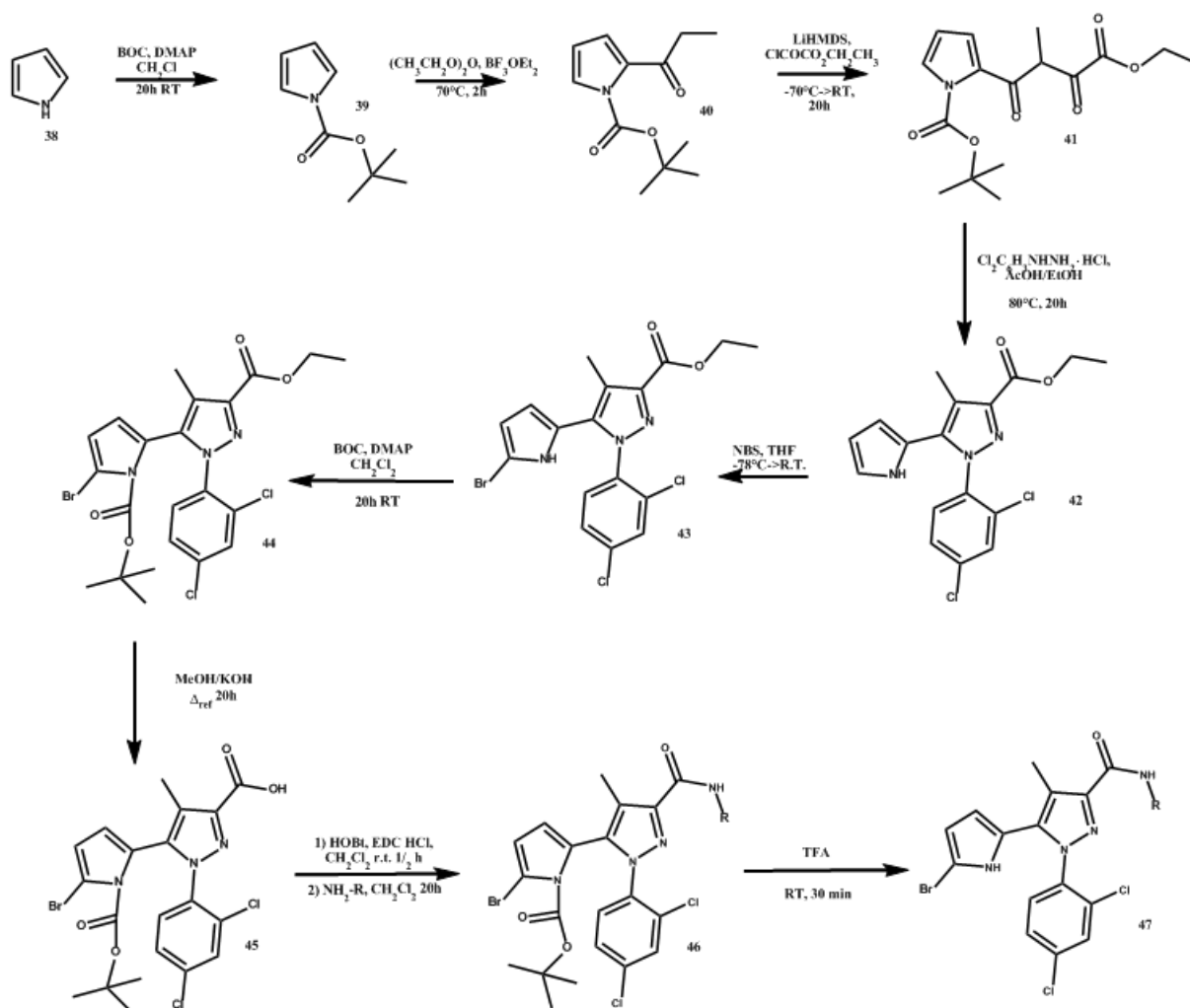
### 4.2 Progettazione del processo sintetico

La procedura sintetica è stata progettata a partire dalla metodica utilizzata nel brevetto US7659407B2<sup>[30]</sup> e descritto nel paragrafo 2.2, ma le problematiche intrinseche alla natura del pirrolo, legate principalmente alla presenza dell'NH non sostituito, hanno imposto l'applicazione di modifiche sostanziali (schema 4.1).

La formazione dell'1-(1*H*-pirrol-2-il)-propan-1-one (**40**) avviene a partire da pirrolo, opportunamente protetto con tert-butyl carbammato (Boc)<sup>[79-80]</sup> (**39**), per reazione con anidride propionica a caldo<sup>[30,81]</sup>. Oltre alla formazione del chetone desiderato si osserva la formazione di un 30% circa di prodotto 2,4-diacilato, facilmente identificabile perché si presenta di un colore giallo vivo e manifesta intensa fluorescenza all'UV, sia a 254 che a 365 nm.

La formazione del 4-(1*H*-pirrol-2-il)-3-metil-2,4-diossi-butirrato (**41**) mediante condensazione di Claisen richiede e l'utilizzo di condizioni blande, per evitare che in ambienti fortemente

basici il substrato possa dare luogo a reazioni parallele di N-sostituzione che ne diminuirebbero considerevolmente la resa, pur consentendo la formazione dell'intermedio carbanionico necessario alla condensazione di Claisen.<sup>[82]</sup> La reazione viene perciò condotta a  $-78^{\circ}\text{C}$  utilizzando la litio bis(trimetilsilil)amide (LiHMDS) come base e l'etilcloroossiacetato come elettrofilo.<sup>[80]</sup>



**Scheme 4.1** Procedura sintetica per l'ottenimento di derivati contenenti una unità pirrolica.

Nella procedura classica per la formazione dell'anello pirazolico si fa inizialmente reagire il substrato con l'idrazina in etanolo a refluxo per formare l'idrazone, quindi si fa rifluire in acido acetico per ottenere la chiusura dell'anello.<sup>[83-84]</sup> L'intero processo viene però spesso condotto con successo in un unico stadio direttamente in acido acetico a refluxo.<sup>[85]</sup>

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

In alcuni casi, si è osservato che l'acidità raggiunta in etanolo a riflusso utilizzando una idrazina cloridrato è sufficiente per favorire la completa chiusura dell'anello.<sup>[35,86-87]</sup>

Per quanto riguarda i composti col pirrolo, la reazione in etanolo ha prodotto l'idrazone con rese discrete, ma si è ottenuta una quantità scarsa di prodotto ciclizzato (42).

Per contro la reazione in acido acetico non ha condotto alla formazione del prodotto desiderato.

Attraverso diversi tentativi è stata individuata la più efficace miscela di etanolo ed acido acetico, che si è rivelata essere quella EtOH/CH<sub>3</sub>COOH 3:4, per consentire la formazione del pirazolo e al tempo stesso limitare le reazioni secondarie, anche se la resa non è risultata comunque soddisfacente.

Parallelamente alla reazione di addizione avviene anche la deprotezione dell'azoto pirrolico con il distacco del BOC per idrolisi acida.

Per la funzionalizzazione del pirazolo, che, riveste enorme importanza per l'affinità dei prodotti nei confronti dei recettori CB1,<sup>[23,28-29]</sup> abbiamo ritenuto opportuno inserire un bromo, che facilita la sostituzione con gruppi di vario genere attraverso coupling di Suzuki o reazioni analoghe.

A questo proposito è necessario valutare il fatto che in ambienti fortemente acidi si è osservato, su composti analoghi, il distacco del bromo.<sup>[88]</sup> Pertanto si ritiene opportuno inserire l'alogeno in uno stadio successivo alla chiusura dell'anello pirazolico, che avviene in ambiente fortemente acido. Inoltre la reazione viene condotta a -78°C<sup>[89]</sup> per evitare fenomeni di polibromurazione fortemente favoriti per questa classe di eterocicli.<sup>[89-91]</sup> Infine è opportuno che l'azoto non sia protetto con BOC, perché si è osservato che l'N-acilazione che ne deriva attiva la bromurazione in posizione 3 del pirrolo anche a basse temperature, dando luogo a composti dibromurati.

Nella sintesi classica gli step successivi prevedono l'attivazione dell'estere mediante idrolisi basica con KOH in metanolo, seguita da coupling con opportuna ammina.<sup>[30]</sup> Nei diversi tentativi fatti si è osservata la parziale o totale apertura dell'anello pirazolico in entrambi gli step sopra citati, pertanto prima di procedere alle reazioni finali è opportuno proteggere nuovamente l'azoto pirrolico con BOC.

La deprotezione finale con acido trifluoroacetico dovrebbe consentire di ottenere le 5-(5-bromo-1*H*-pirrol-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazole-3-carbossammidi finali (**47**).

### 4.3 Conclusioni

La linea sintetica progettata è molto lunga e articolata. Ho ottenuto bassissime rese in alcuni passaggi fondamentali del processo, come quello relativo alla chiusura dell'anello pirazolico e nella bromurazione a bassa temperatura. L'attivazione dell'etil 5-(5-bromo-1*H*-pirrol-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazole-3-carbossilate mediante idrolisi basica ha presentato non poche complicazioni, nonostante avessi provveduto a proteggere l'NH con Boc. Infatti una parte del prodotto veniva deprotezionato durante il processo e degradato, provocando una massiccia diminuzione della resa.

In conclusione, nonostante i numerosi tentativi non sono stata in grado di isolare alcuna 5-(5-bromo-1*H*-pirrol-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazole-3-carbossammide.

## **5.0 Materiali e metodi**

La sintesi e tutti i saggi per la caratterizzazione e la valutazione biologica dei prodotti riportati nel mio lavoro di tesi sono state condotte nei laboratori di Neuroscienze Pharmaness (Edificio 5, Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna – Località Piscinamanna – Pula, CA)

### **5.1 Radioligand Binding Assays.**

L'affinità verso i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> è stata determinata mediante radioreceptor binding assays utilizzando [<sup>3</sup>H]-CP-55,940 in accordo con le procedure precedentemente riportate da Ruiu et al.<sup>[61]</sup> Per i saggi sui CB<sub>2</sub> e sui CB<sub>1</sub> sono stati usati rispettivamente omogeneati di milza e cervello (minus cerebellum) di topi maschi CD1 (Charles River, Calco, Italy).

La determinazione delle proteine è stata operata mediante Bradford protein assay utilizzando BSA come standard in accordo con il protocollo del fornitore (Bio-Rad, Milano, Italia). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplo e i risultati sono stati confermati da almeno cinque esperimenti indipendenti. I dati derivanti dagli esperimenti di inibizione del radioligando sono stati analizzati mediante analisi di regressione non lineare su una Curva Sigmoide utilizzando il programma Graph Pad Prism 5. I valori di IC<sub>50</sub> sono stati derivati dalle curve ottenute e convertiti nei valori di K<sub>i</sub>.

### **5.2 Saggi *in vitro* su linee cellulari. Determinazione dell'espressione della P-ERK 1/2.**

Lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 è stato condotto con la linea cellulare N1E-115 su Dischi di Petri 100x20 mm (Falcon<sup>®</sup>) a seguito di un'esposizione di 10 minuti sul recettore CB<sub>1</sub> dell'agonista ACEA (20nM) e/o WIN (25nM) e differenti concentrazioni della molecola da testare. L'esposizione di questi recettori induce una rapida fosforilazione e attivazione di ERK. L'effetto di 5 minuti di pretrattamento con l'antagonista Rimonabant (1 μM) abolisce l'azione dell'agonista, indicando che l'attivazione di P-ERK 1/2 è CB<sub>1</sub> specifica.

Lo studio di competizione nell'espressione di P-ERK 1/2 viene effettuato con un pretrattamento di 5 minuti di diverse concentrazioni della molecola da testare, seguito da



un'esposizione di 10 minuti sul recettore CB<sub>1</sub> dell'agonista ACEA (20nM) o WIN (25nM). L'abolizione dell'azione di ACEA o WIN indica l'attività antagonista della molecola testata.

Dopo l'appropriato tempo di esposizione, le cellule vengono raccolte e trasferite in tubo tipo Falcon<sup>®</sup> da 50 ml e centrifugate a 1000 RCF per 10 minuti a 4°C. Il pellet viene lisato a 4°C in Lysis Buffer costituito da 20mM acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES), 0,2 mM acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), 125 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12% Glicerolo, 0,1% Nonilfenossi polietossietanolo (NP-40), 1 µg/ml Aprotinina, 0,7 µg/ml Pestatina, 0,5 µg/ml Leupeptina e 0,5 mM Fenilmetansulfonilfluoride (PMSF).

Il lisato viene trasferito in tubo tipo Eppendorf da 1,5 ml e centrifugato a 10000 RCF per 10 minuti a 4°C. Il supernatante contenente le proteine totali viene congelato a -80°C.

Un'aliquota di proteine totali viene analizzata per la determinazione della concentrazione proteica, utilizzando Quant-iT<sup>™</sup> Protein Assay Kit (Invitrogen<sup>™</sup>) ed il sistema Qubit<sup>®</sup> Quantitation Platform (Invitrogen<sup>™</sup>).

Analisi Western Blot: Un'aliquota di 40 µg di proteine totali viene separata su Bis-Tris Gel NuPAGE<sup>®</sup> Novex al 10% (Invitrogen<sup>™</sup>) e trasferita su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). La membrana viene bloccata con ChemiBLOCKER<sup>™</sup> (ChB) (Millipore<sup>™</sup>) diluizione 1:4 in Tris-Buffered Saline (Bio-Rad) Tween-20 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (TBST) e messa a reagire per 10 minuti con l'anticorpo primario specifico Anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187), recombinant clone AW39R (Millipore<sup>™</sup>), diluizione 1:1000 in TBST più 1% di bovine serum albumin (BSA). Dopo tre lavaggi in TBST, la membrana viene fatta reagire per 10 minuti con l'anticorpo secondario specifico Goat anti-Rabbit IgG – HRP (Invitrogen<sup>™</sup>), diluizione 1:2000 in ChB-TBST 1:4. Il sistema di detenzione di proteine SNAP i.d.<sup>™</sup> (Millipore<sup>™</sup>), viene utilizzato al fine di favorire il legame di ChB, anticorpo primario e secondario sulla membrana.

Dopo tre ulteriori lavaggi in TBST, la membrana viene messa a reagire per 5 minuti con Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore<sup>™</sup>),

Le bande immunoreattive vengono visualizzate con l'uso del Fujifilm Las-1000 analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) e la densità ottica viene misurata usando il software AIDA 2.11 software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

I differenti livelli di P-ERK vengono espressi come percentuale di controllo ± SEM. L'analisi statistica viene effettuata tramite il post test one-way Anova seguito dal Dunnet's multiple comparison, utilizzando il programma GraphPad Prism 5.

### 5.3 Studio in vivo su modelli animali di obesità.

L'antagonista/agonista inverso CB<sub>1</sub> Rimonabant è stato acquistato dalla KEMPROTECH Limited (Middlesbrough, UK).

Per gli studi in vivo sono state utilizzate formulazioni preparate quotidianamente solubilizzando i composti da testare in soluzione salina allo 0.9% Tween 80 (Sigma Aldrich, Milan, Italy) in un rapporto di 8:1 v/v.

#### 5.3.1 Animali.

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la normativa UE (CEE N°86/609) per la cura e l'uso degli animali da laboratorio.

48 maschi C57BL/6N DIO (30-40 g) di 10 settimane di età sono stati acquistati dalla Charles River (Calco, Lecco, Italy). I topi sono stati stabulati sistemando un solo animale in ciascuna gabbia, in condizioni ambientali controllate ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C, e mantenuti ad un ciclo luce/buio 12:12 h invertito) ed alimentati *ad libitum* con una dieta ricca di grassi (D12492, 60% grassi, 20% carboidrati, 20% proteine, totale 5.24 kcal/g; Research Diets Inc., New Brunswick) per una settimana. I topi DIO sono stati quindi pesati e divisi in 6 gruppi, ciascuno composto da 7 animali, e sottoposti a 31 giorni di trattamento cronico:

“VEH FD”: topi DIO alimentati con dieta D12492 e trattati col veicolo (Tween 80 in soluzione salina, in rapporto 8:1 v/v);

“2d FD”: topi DIO alimentati con dieta D12492 e trattati con **2d** (20 mg/kg);

“SR141716 FD”: topi DIO alimentati con dieta D12492 e trattati con rimonabant (10 mg/kg);

“VEH ND”: topi DIO “convertiti” alla dieta normocalorica (D12450B, 10% grassi, 70% carboidrati, 20% proteine, total 3.85 kcal/g; Research Diets Inc., New Brunswick) e trattati con veicolo;

“2d ND”: topi DIO “convertiti” alla dieta D12450B e trattati con **2d** (20 mg/kg);

“SR141716 ND”: topi DIO “convertiti” alla dieta D12450B e trattati con rimonabant (10 mg/kg);

### **5.3.2 Trattamento cronico.**

Il Rimonabant, il composto **2d**, e il veicolo sono stati somministrati mediante iniezione intraperitoneale una volta al giorno. Il Rimonabant e il **2d** sono stati somministrati rispettivamente alla dose di 10 and 20mg/kg/giorno. Sono stati registrati quotidianamente il peso corporeo, il consumo calorico, ed il consumo del cibo nella gabbia per ciascun animale. La lunghezza del corpo è stata misurata all'inizio e alla fine del trattamento per calcolare l'Indice di Massa Corporea (BMI). Alla fine del periodo sperimentale sono stati raccolti i campioni di sangue per la determinazione immediata dei parametri biochimici nel siero. Le regioni del cervello (ipotalamo, corteccia prefrontale, amigdala, *nucleus accumbens*, ippocampo, striato), il fegato e il tessuto adiposo bianco totale (epididimal, lombar, and perirenal) sono state rimosse, pesate e immediatamente conservate a  $-80^{\circ}$  C fino alle analisi per la determinazione dell'RNA.

### **5.3.3 Determinazione dei parametri ematici.**

I campioni di sangue (approssimativamente 300  $\mu$ l) sono stati prelevati dal seno retro-orbitale e centrifugati a 1000g per 10 minuti.

I livelli di Trigliceridi (TG), glucosio (GLU), colesterolo totale (CHO), e transaminasi ALT e AST, sono stati determinati nei campioni di siero con un KEYLAB LiquiVet  $\text{\textcircled{R}}$  Analyzer utilizzando i kit della BPC BioSed srl (Castelnuovo di Porto, Rome, Italy).

### **5.3.4 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA.**

I tessuti congelati, dissezionati in aree centrali e periferiche, sono stati rapidamente scongelati su ghiaccio. L'RNA totale è stato estratto con Trizol (Life technologies, Monza, Italy) secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione e la purezza dell'RNA venivano determinate con misure di assorbanza a 260 e 280 nm. Dopo digestione con DNase, l'RNA (0.5  $\mu$ g) è stato retrotrascritto in una molecola di cDNA utilizzando il SuperScript $\text{\textcircled{R}}$  VILO $\text{\textsuperscript{TM}}$  cDNA Synthesis Kit (Life technologies, Monza, Italy). Una aliquota (3.5  $\mu$ l) di cDNA è stata quindi amplificata mediante Real Time PCR.

### **5.3.5 Real Time PCR.**

La Real-time PCR è stata usata per quantificare i livelli di espressione dell'mRNA di geni nel cervello e nei tessuti periferici studiati. Come gene di riferimento è stata usata la Beta-actina. Le sonde TaqMan® MGB sono state amplificate in reazioni singole, parallele per normalizzare qualsiasi variazione nella qualità e nella quantità dell'RNA o del cDNA. La PCR è stata condotta in duplicato in piastre ottiche con 96 pozzetti (Life technologies, Monza, Italy) con lo strumento ABI Prism 7000 Sequence Detection (Life technologies, Monza, Italy).

Per la PCR sono state applicate le seguenti condizioni: 95 °C, 10 min.; 50 cicli 95 °C, 15 s e 60 °C, 1 min. La quantificazione relativa è stata operata utilizzando il metodo comparativo C(T) noto anche come metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **5.3.6 Analisi statistiche.**

I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M. (n = 7). Per determinare la significatività dell'effetto farmacologico sul peso corporeo e il consumo calorico durante il trattamento cronico è stato applicato il test Two-way Repeated Measures ANOVA con Bonferroni *post test*. Invece è stato utilizzato il One-way ANOVA con Newman-Keuls *post test* per determinare: l'aumento di peso corporeo, la massa grassa, il BMI ed il consumo calorico totale registrato alla fine del trattamento; la differenza statistica tra i parametri biochimici del sangue; la relazione tra i livelli di espressione dell'mRNA di geni nel cervello e nei tessuti periferici. Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando GraphPad Prism 5.00 per Windows, (GraphPad Software, San Diego CA).

## **5.4 Chimica.**

Tutte le reazioni che impiegano prodotti sensibili all'aria o all'umidità sono state condotte in atmosfera di azoto ad elevata purezza. Per la determinazione dei coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua con il metodo RP-HPLC sono stati utilizzati esclusivamente metanolo e acqua HPLC grade, acquistati presso la VWR International PBI s.r.l. I reagenti e i solventi utilizzati

per tutti gli altri scopi sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Chemical Company ed utilizzati tal quali.

I punti di fusione sono stati misurati su un apparato per punto di fusione Stuart SMP10 e sono espressi senza correzione. Gli spettri IR sono stati registrati su uno spettrofotometro Bruker Alpha-T FT-IR dotato di Alpha Eco ATR come modulo di campionamento e sono espressi in  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ). Tutti gli spettri NMR spectra sono stati registrati su uno strumento Bruker Ultra Shield 400 Avance III NMR Spectrometer, in cui  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sono stati osservati rispettivamente a 400 and 100 MHz. I chemical shifts per gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sono espressi in  $\delta$  ponendo il segnale del TMS ( $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) uguale a 0. Le molteplicità sono riportate come s (singoletto), bs (singoletto allargato), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto), qu (quintupletto), dd (doppietto di doppietti), m (multipletto). Gli spettri di massa ESI sono stati registrati su uno spettrometro di massa Bruker Esquire 3000 Plus Ion Trap in positivo.

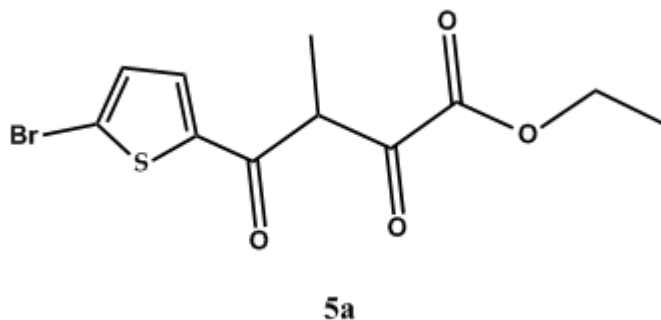
## **6.0 Sintesi e caratterizzazione**

### **6.1 Derivati $\alpha$ -ariltiofenici.**

#### **Procedura generale I: sintesi degli $\alpha,\gamma$ -Dichetoesteri (5a-b).**

In un pallone sotto atmosfera inerte, si aggiunge del sodio metallico (0.86 g, 37.50 mmol) in piccole porzioni ad etanolo anidro (25 mL) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione del sodio. Viene aggiunto il dietilossalato (**4**) (7.6 mL, 56.30 mmol), quindi viene fatta gocciolare una soluzione dell'appropriato chetone **3** (4.11 g, 18.70 mmol) in etanolo anidro (26 mL). La soluzione così ottenuta è agitata a temperatura ambiente per 18 h, quindi versata lentamente in una miscela di ghiaccio e HCl 1N. La miscela risultante viene estratta con etere, le fasi organiche vengono combinate, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed il solvente rimosso all'evaporatore rotante. Il prodotto analiticamente puro viene isolato mediante cromatografia flash, come descritto di seguito.

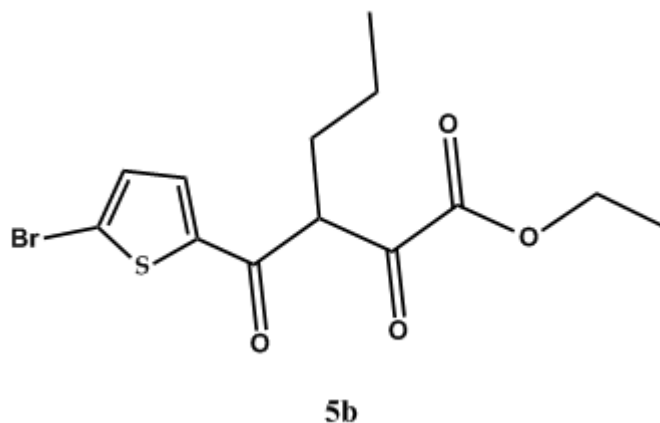
**Etil 4-(5-bromotiofen-2-il)-3-metil-diossi-butirrato (5a).**



La procedura generale I è stata usata per convertire il chetone **3a** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) per ottenere **5a** (2.59g, resa 60.0 %) come olio giallo.  $R_f = 0.43$  (etere di petrolio/EtOAc, 85:15);

$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta=1.30$  (t, 3H,  $J = 7.2$  Hz), 1.47 (d, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 4.27 (q, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 4.77 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 7.15 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.54 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz);

**3-(5-Bromotiofen-2-carbonil)-2-ossiesanoato di etile (5b).**



La procedura generale I è stata usata per convertire il chetone **3b** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1) per ottenere **5b** (3.18g, resa 25.0 %) come olio giallo.  $R_f = 0.65$  (etere di petrolio/EtOAc, 95:5);

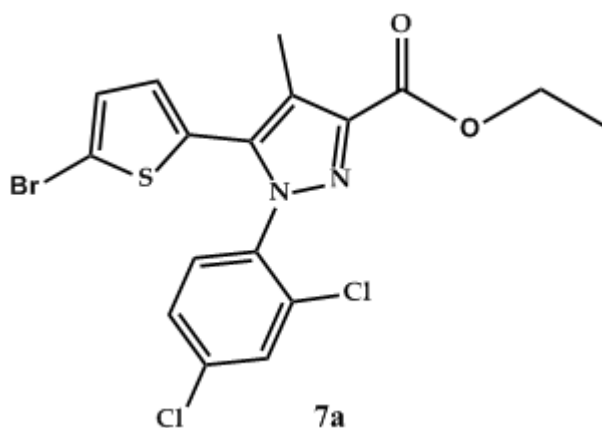
$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta=0.95$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz); 1.33-1.42 (m, 5H); 1.51-1.66 (m, 2H), 3.21 (q, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 4.77 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz), 6.91 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 7.54 (d, 1H,  $J = 4.0$  Hz).



**Procedura generale II: sintesi dei Carbossilati (7a-c).**

Una miscela dell'appropriato  $\alpha,\gamma$ -dichetoestere **5** (1 eq., 11.22 mmol), e dell'appropriata fenilidrazina **6** (1.1 eq., 12.37 mmol) EtOH assoluto (36 ml) è stata scaldata a riflusso per 12 ore. Il solvente viene rimosso all'evaporatore rotante ed il prodotto analiticamente puro è isolato mediante cromatografia flash seguita da ricristallizzazione, come indicato in seguito.

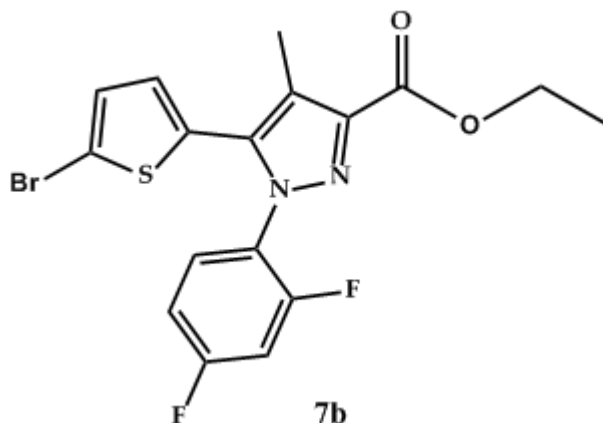
**Etil 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-pirazol-3-carbossilato (7a).**



La procedura generale II è stata usata per convertire il  $\alpha,\gamma$ -dichetoestere **5a** e la 2,4-diclorofenilidrazina (**6a**) nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 7:3) per ottenere **7a** (4.32g, resa 74.8 %) come solido arancio.  $R_f$  = 0.60 (etere di petrolio/EtOAc, 8:2);

$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ =1.40 (t, 3H,  $J$  = 7.1 Hz), 2.41 (s, 3H), 4.43 (q, 2H,  $J$  = 7.1 Hz), 6.63 (d, 1H,  $J$ =3.9 Hz), 6.94 (d, 1H,  $J$ =3.9 Hz), 7.32 (dd, 1H,  $J$  = 2.0, 8.4 Hz), 7.35 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz), 7.45 (d, 1H,  $J$  = 2.0Hz);

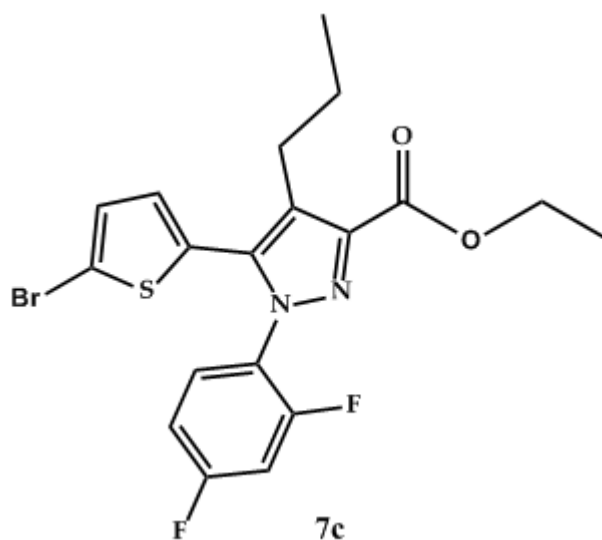
**Etil 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-metil-pirazol-3-carbossilato (7b).**



La procedura generale II è stata usata per convertire il  $\alpha,\gamma$ -dichetoestere **5a** e la 2,4-difluorofenilidrazina (**6b**) nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 85:15) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 85:15) per ottenere **7b** (1.8g, resa 64.7 %) come solido arancio.  $R_f = 0.40$  (etere di petrolio/EtOAc, 85:15);

$^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO)  $\delta=1.42$  (t, 3H,  $J = 7.2$ ), 2.40 (s, 3H), 4.45 (q, 2H,  $J = 7.2$ ), 6.66 (d, 1H,  $J = 3.9$  Hz), 6.85-6.92 (m, 1H), 6.94-7.00 (m, 2H), 7.42-7.47 (m, 1H).

**Etil 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-pirazol-pirazol-3-carbossilato (7c).**



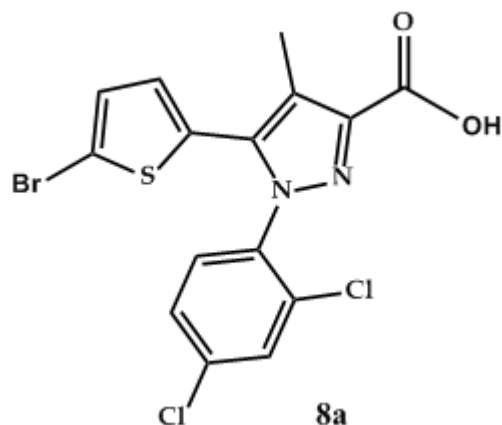
La procedura generale II è stata usata per convertire il  $\alpha,\gamma$ -dichetoestere **5b** e la 2,4-difluorofenilidrazina (**6b**) nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 85:15) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 85:15) per ottenere **7c** (2.71g, resa 65.0 %) come solido arancio.  $R_f = 0.30$  (etere di petrolio/EtOAc, 85:15);

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.95 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz); 1.42 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz); 1.51-1.66 (m, 2H); 2.74-2.78 (m, 2H); 4.45 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz); 6.64 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz); 6.84-6.89 (m, 1H); 6.92-6.97 (m, 2H); 7.40-7.46 (m, 1H).

**Procedura generale III: sintesi degli acidi Carbossilici (8a-c).**

Ad una soluzione dell'appropriato etil 5-(5-alotiofen-2-il)-4-alcil-1*H*-pirazole-3-carbossilato 7 (1 eq., 6.3 mmol) in metanolo (30 mL) è stato aggiunto del KOH solido (3 eq). La miscela risultante è stata scaldata a riflusso per 12 ore. La soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente quindi versata in HCl al 5% (30 mL). Il precipitato ottenuto è stato filtrato, lavato con acqua e lasciato asciugare all'aria per ottenere l'acido analiticamente puro.

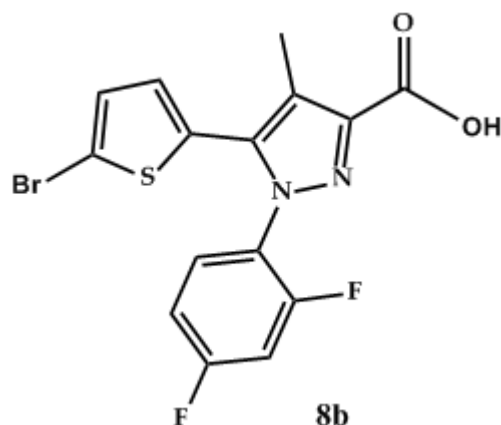
**Acido 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-pirazol-3-carbossilico (8a).**



La procedura generale III è stata usata per convertire il carbossilato **7a** nel prodotto sopra riportato. L'acido analiticamente puro **8a** (0.87g, resa 64.3%) è stato ottenuto come solido color crema.  $R_f = 0.50$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9:1);

$^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO)  $\delta=2.30$  (s, 3H), 6.88 (d, 1H,  $J=3.9$  Hz), 7.21 (d, 1H,  $J=3.9$  Hz), 7.60 (dd, 1H,  $J = 2.2, 8.4$  Hz), 7.67 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.85 (d, 1H,  $J = 2.2\text{Hz}$ ).

**Acido 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-metil-pirazol-3-carbossilico (8b).**

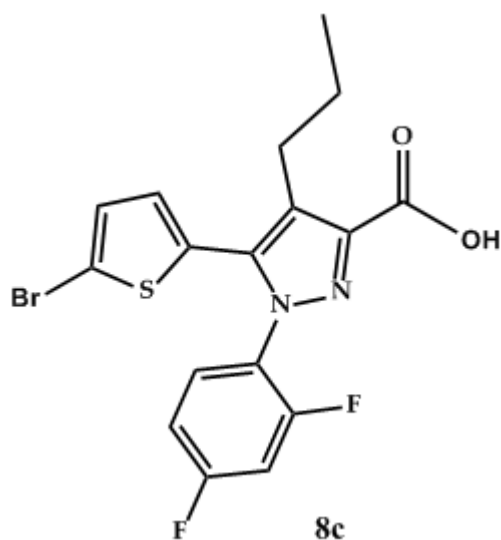


La procedura generale III è stata usata per convertire il carbossilato **7b** nel prodotto sopra riportato. L'acido analiticamente puro **8b** è stato ottenuto come solido color crema (1.45g, resa 79.0%).  $R_f = 0.56$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9:1);

**m.p.:** 221-223 °C;

$^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO)  $\delta = 2.40$  (s, 3H), 6.67 (d, 1H,  $J = 3.9$  Hz), 6.87-6.92 (m, 1H), 6.95-7.00 (m, 2H), 7.42-7.49 (m, 1H).

**Acido 5-(5-bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-propil-pirazol-3-carbossilico (8).**



La procedura generale III è stata usata per convertire il carbossilato **7c** nel prodotto sopra riportato. L'acido analiticamente puro **8c** è stato ottenuto come solido bianco. (1.35g, resa 61.0%).  $R_f = 0.60$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9:1);

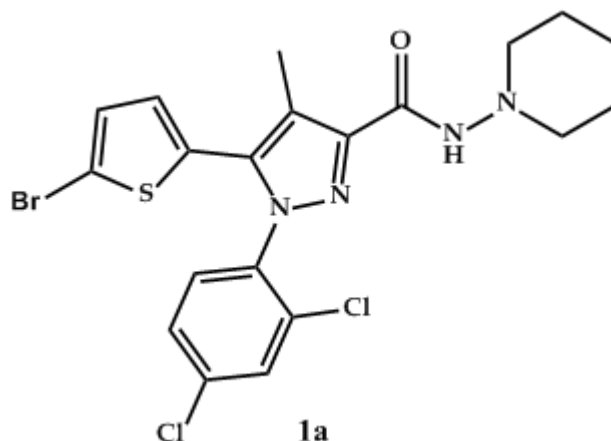
$^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO)  $\delta$ ; 0.85 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz); 1.48-1.57 (m, 2H); 2.68-2.71 (m, 2H); 6.86 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz); 7.21-7.28 (m, 2H); 7.46-7.52 (m, 1H); 7.69-7.75 (m, 1H).



**Procedura generale IV: sintesi delle Carbossammidi (1a-c).**

Una miscela dell'appropriato acido 5-(5-bromotien-2-il)-4-alcil-1*H*-pirazole-3-carbossilico **8** (1 eq., 5.44 mmol) con *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N*-etilcarbodiimmide · HCl (1.2 eq.) e 1-idrossibenzotriazolo idrato (1.2 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (22 ml) viene agitata a temperatura ambiente. Dopo ½ ora viene aggiunta goccia a goccia l'1-aminopiperidina (**9**) e la soluzione arancio ottenuta viene fatta reagire per 16 ore a temperatura ambiente. Il solvente viene quindi evaporato ed il prodotto analiticamente puro viene isolato mediante cromatografia flash seguita da ricristallizzazione, come indicato in seguito.

**5-(5-Bromotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (1a).**



La procedura generale IV è stata usata per convertire l'acido carbossilico **8a** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **1a** (0.77g, resa 78.5 %) come solido bianco.  $R_f = 0.34$  (etere di petrolio/EtOAc, 6:4);

**m.p.:** 142-147 °C;

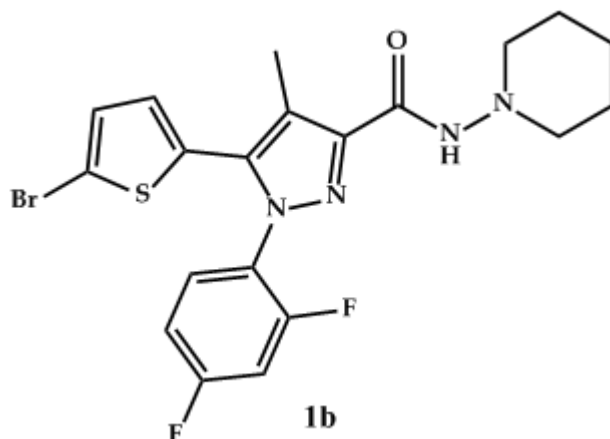
**FT-IR:**  $\nu = 1661, 3218$ ;

**$^1\text{H}$  NMR** (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.41-1.46$  (m, 2H), 1.72-1.78 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 2.85 (t, 4H,  $J=4.9$  Hz); 6.64 (d, 1H,  $J=3.9$  Hz), 6.95 (d, 1H,  $J=3.9$  Hz), 7.33 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz), 7.37 (dd, 1H,  $J=1.9, 8.8$  Hz), 7.51 (d, 1H,  $J=1.9$  Hz), 7.59 (bs, 1H);

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.7, 23.5, 25.6, 57.2, 115.0, 119.5, 128.1, 129.2, 130.3, 130.4, 130.5, 130.9, 133.9, 135.8, 136.7, 137.1, 144.5, 159.8$ ;

**ESI-MS**  $m/z$  calc. 537.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato. 537.0.

**5-(5-Bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (1b).**



La procedura generale IV è stata usata per convertire l'acido carbossilico **8b** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 1:1) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **1b** (0.80g, resa 46.2 %) come solido bianco.  $R_f = 0.32$  (etere di petrolio/EtOAc, 6:4);

**m.p.:** 178-184 °C;

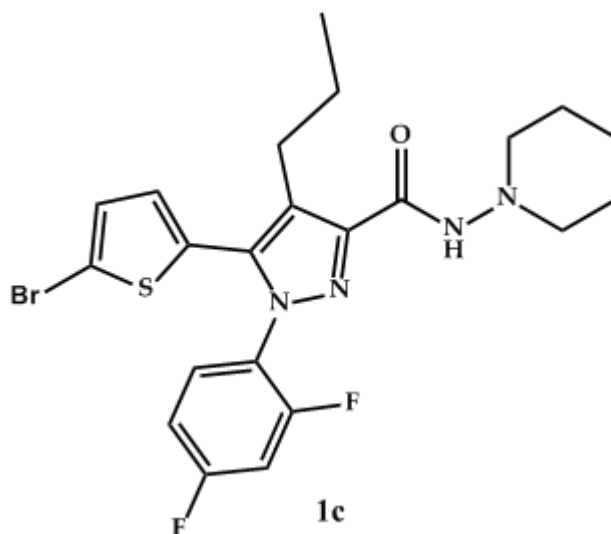
**FT-IR:**  $\nu = 1680, 3322$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.42-1.45$  (m, 2H), 1.73-1.77 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 2.88 (bs, 4H), 6.64-6.65 (m, 1H), 6.88-7.00 (m, 3H), 7.36-7.43 (m, 1H), 7.65 (bs, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.7, 23.3, 25.5, 57.1, 105.5$  (splittato), 112.2 (splittato), 114.8, 120.0, 123.6 (splittato), 129.3, 130.3, 130.4, 130.5 (splittato), 137.1, 144.6, 157.0 (sdoppiato), 159.8, 162.3 (splittato);

**ESI-MS**  $m/z$  calc. 504.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 504.1.

**5-(5-Bromotiofen-2-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-propil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (1c).**



La procedura generale II è stata usata per convertire l'acido carbossilico **8c** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **1c** (0.31g, resa 45.0 %) come solido bianco.  $R_f = 0.42$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**m.p.:** 165-171 °C;

**FT-IR:**  $\nu = 1650, 3167$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.94 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz), 1.41-1.46 (m, 2H), 1.62-1.68 (m, 2H), 1.72-1.78 (m, 4H), 2.77-2.80 (m, 2H), 2.85 (sb, 4H), 6.61 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 6.87-6.99 (m, 3H), 7.35-7.42 (m, 1H), 7.61 (s, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14.4, 23.4, 24.7, 25.6, 26.1, 57.3, 105.3$  (sdoppiato), 112.1 (sdoppiato), 115.0, 125.4, 129.4 (sdoppiato), 130.3, 130.4, 130.5 (sdoppiato), 137.0, 144.4, 157.2 (sdoppiato), 159.6, 163.1 (sdoppiato);

**ESI-MS**  $m/z$  calc. 532.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 532.4.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

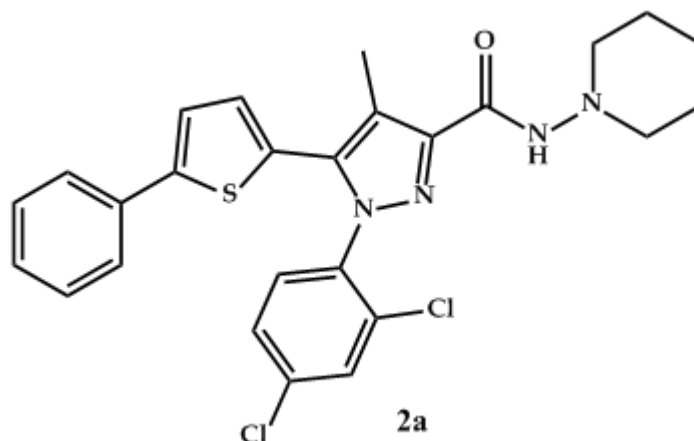
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**Procedura generale V: sintesi di 5-aril or 5-eteroaril Carbossammidi (2a-f).**

Una soluzione in dimetossietano (DME) (5.0 ml) dell'appropriata 4-alchil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazole-3-carbossammide **1b-c** (1 eq., 0.7 mmol). viene trasferita in un pallone sotto flusso di azoto. Dopo aver saturato la soluzione con N<sub>2</sub>, viene aggiunto tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (0.05 eq.) seguito dall'appropriato acido boronico **10** e da una soluzione acquosa di sodio carbonato (1.3 eq.) in acqua (2.5 ml). La miscela così ottenuta viene scaldata a 80°C per 12 h, quindi raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche combinate vengono lavate con acqua, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e concentrate a pressione ridotta. Il prodotto analiticamente puro è isolato mediante cromatografia flash seguita da ricristallizzazione, come indicato in seguito.

**1-(2,4-Diclorofenil)-4-metil-5-(5-feniltiofen-2-il)-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (2a).**



La procedura generale V è stata usata per convertire **1b** e l'acido fenilboronico **10a** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **2a** (0.27g, resa 75%) come solido bianco.  $R_f = 0.38$  (etere di petrolio/EtOAc, 6:4);

**mp:** 145-149 °C;

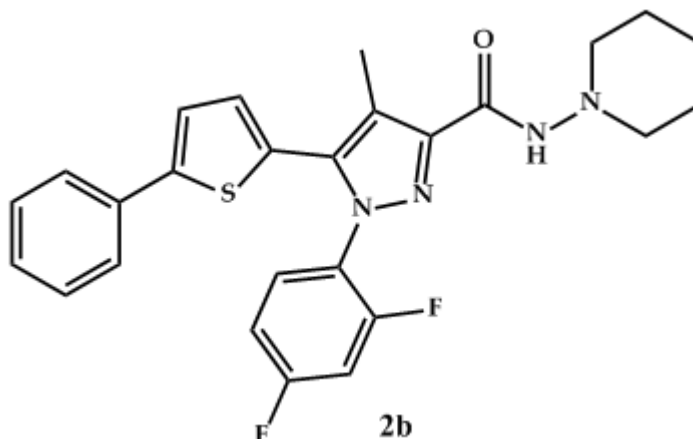
**IR:**  $\nu = 1675, 3325$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.39-1.47$  (bs, 2H), 1.73-1.77 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.86 (bs, 4H), 6.81 (d, 1H,  $J=3.8$  Hz), 7.17 (d, 1H,  $J=3.8$  Hz), 7.29 (d, 1H,  $J=7.3$  Hz), 7.33-7.38 (m, 4H), 7.49-7.52 (m, 3H), 7.62 (s, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.9, 23.5, 25.6, 57.2, 119.2, 123.3, 126.0, 128.1, 128.3, 129.1, 129.8, 130.5, 131.0, 133.7, 134.1, 136.5, 138.0, 144.6, 146.9, 160.2$ ;

**ESI-MS** (MeOH):  $m/z$  calcd. 534.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 533.1.

**1-(2,4-Difluorofenil)-4-metil-5-(5-feniltiofen-2-il)-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazole-3-carbossammide (2b).**



La procedura generale V è stata usata per convertire **1b** e l'acido fenilboronico **10a** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 7:3) per ottenere **2b** (0.10g, resa 64.3%) come solido bianco.  $R_f = 0.25$  (etere di petrolio/EtOAc, 8:2);

**m.p.:** 125-130 °C;

**FT-IR:**  $\nu = 1681, 3325$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.44$  (bs, 2H), 1.74-1.81 (m, 4H), 2.50 (s, 3H), 2.86 (bs, 4H), 6.83 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 6.88-7.00 (m, 2H), 7.19 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz), 7.27-7.30 (m, 1H), 7.34-7.37 (m, 2H), 7.40-7.46 (m, 1H), 7.50-7.53 (m, 2H), 7.63 (bs, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.8, 23.5, 25.6, 57.2, 105.3$  (splittato), 112.2 (splittato), 119.5, 123.2, 124.1, 125.9, 128.0, 128.2, 129.1, 129.8, 130.5, 131.0, 133.6, 134.1, 138.1, 144.6, 146.8, 157.5 (splittato), 160.2, 162.5 (splittato);

**ESI-MS** (MeOH):  $m/z$  calc. 501.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 501.2.

Autore: Marilena Pira

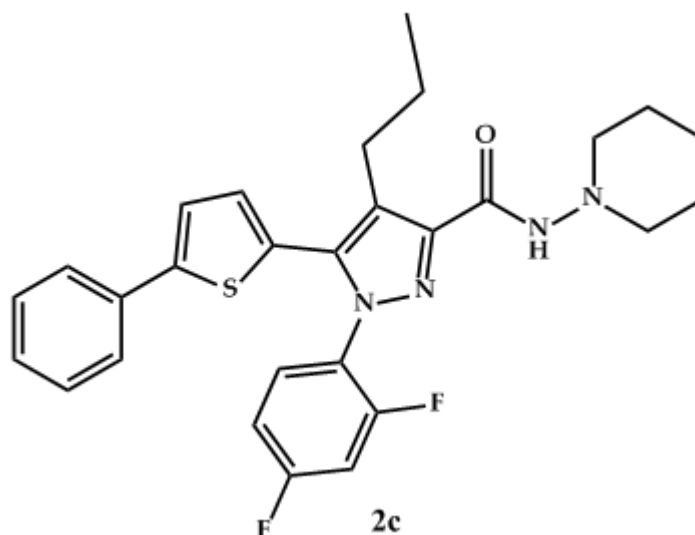
Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**1-(2,4-Difluorofenil)-4-propil-5-(5-feniltiofen-2-il)-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (2c).**

La procedura generale V è stata usata per convertire **1c** e l'acido fenilboronico **10a** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **2c** (0.80g, resa 52%) come solido bianco.  $R_f = 0.36$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);



**m.p.:** 130-135 °C;

**FT-IR:**  $\nu = 1683, 3312$ ;

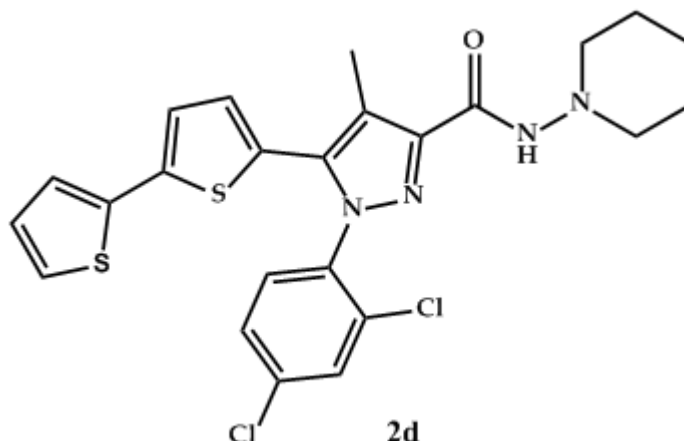
**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.96 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz), 1.41-1.46 (m, 2H), 1.67-1.77 (m, 6H), 2.80-2.89 (m, 6H), 6.82 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 6.92-7.00 (m, 2H), 7.18 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 7.28-7.30 (m, 1H), 7.33-7.44 (m, 3H), 7.51-7.55 (m, 2H), 7.63 (s, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14.5, 23.4, 24.6, 25.6, 26.1, 57.4, 105.2$  (sdoppiato), 112.1 (sdoppiato), 123.2, 125.0, 127.9, 128.2, 129.1, 129.9, 130.4, 130.5 (sdoppiato), 133.7, 137.8, 144.4, 146.9, 157.2 (sdoppiato), 159.7, 163.1 (sdoppiato);

**ESI-MS** (MeOH):  $m/z$  calc. 529.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 529.5.



**5-(2,2'-Ditiofen-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (2d).**



La procedura generale V è stata usata per convertire **1a** e l'acido fenilboronico **10b** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **2d** (0.16 g, resa 65%) come solido bianco.  $R_f = 0.39$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**m.p.:** 128-136 °C;

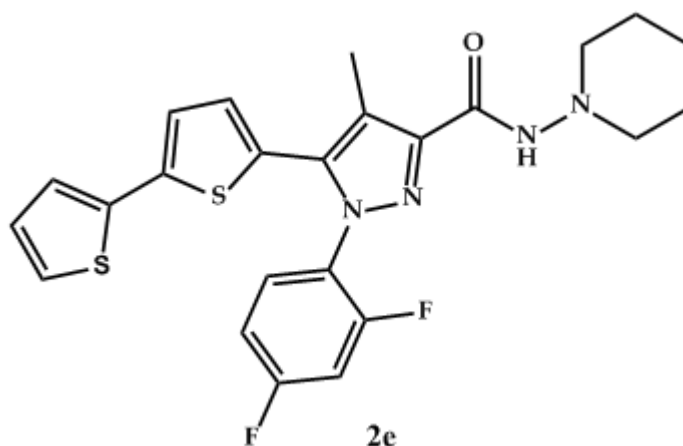
**FT-IR:**  $\nu = 1682, 3425$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.39\text{-}1.46$  (m, 2H),  $1.72\text{-}1.78$  (m, 4H),  $2.50$  (s, 3H),  $2.87$  (bs, 4H),  $6.73$  (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz),  $6.99$  (dd, 1H,  $J = 3.6, 5.1$  Hz),  $7.02$  (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz),  $7.12$  (dd, 1H,  $J = 1.1, 3.6$  Hz),  $7.22$  (dd, 1H,  $J = 1.1, 5.1$ ),  $7.36$  (d, 2H,  $J = 3.1$ ),  $7.49\text{-}7.50$  (m, 1H),  $7.63$  (bs, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.9, 23.5, 25.6, 57.2, 119.3, 123.7, 124.4, 125.0, 125.2, 127.4, 128.0, 128.1, 129.4, 130.4, 131.0, 133.9, 136.2, 136.5, 137.7, 139.9, 144.5, 160.1$ ;

**ESI-MS**  $m/z$  calc.  $540.5$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato  $541.1$ .

**5-(2,2'-ditiofen-5-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (2e).**



La procedura generale V è stata usata per convertire **1b** e l'acido fenilboronico **10b** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **2e** (0.12g, resa 60.4%) come solido bianco.  $R_f = 0.25$  (etere di petrolio/EtOAc, 8:2);

**m.p.:** 124-127 °C;

**FT-IR:**  $\nu = 1682, 3298$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.44$  (bs, 2H), 1.72-1.78 (m, 4H), 2.48 (s, 3H), 2.84-2.87 (m, 4H), 6.76 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 6.89-6.98 (m, 2H), 7.00 (dd, 1H,  $J = 3.6, 5.1$  Hz), 7.05 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz); 7.12 (dd, 1H,  $J = 1.1, 3.6$  Hz), 7.22 (dd, 1H,  $J = 1.1, 5.1$  Hz); 7.39-7.45 (m, 1H), 7.62 (bs, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 9.8, 23.5, 25.6, 57.2, 105.3$  (splittato), 112.1 (splittato), 119.6, 123.8, 124.0, 124.5, 125.3, 126.8, 128.1, 129.6, 130.5, 136.6, 137.9, 140.0, 144.7, 146.8, 158.1

**ESI-MS**  $m/z$  calc. 507.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 507.1.

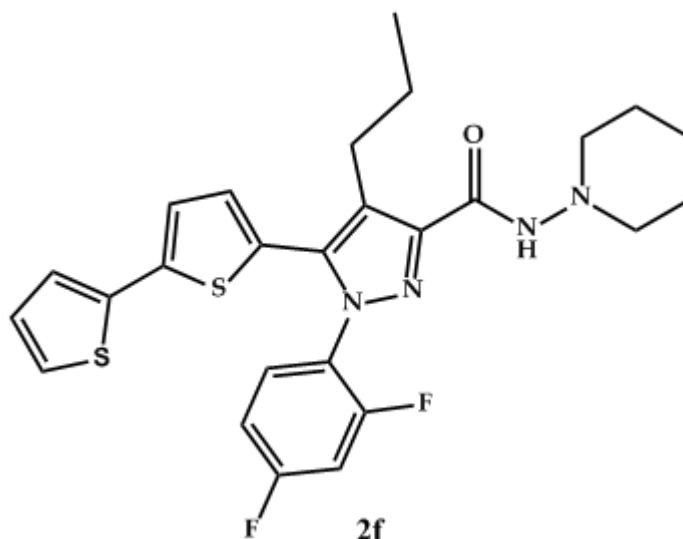
Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**5-(2,2'-ditiofen-5-il)-1-(2,4-difluorofenil)-4-propil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (2f).**



La procedura generale V è stata usata per convertire **1c** e l'acido fenilboronico **10b** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) seguita da ricristallizzazione (etere di petrolio/EtOAc, 6:4) per ottenere **2f** (0.10g, resa 48.0%) come solido bianco.  $R_f = 0.38$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**m.p.:** 122-129 °C;

**FT-IR:**  $\nu = 1602, 3309$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.96 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz), 1.41-1.46 (m, 2H), 1.66-1.78 (m, 6H), 2.80-2.87 (m, 6H), 6.74 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 6.86-7.01 (m, 3H), 7.03 (d, 1H,  $J = 3.8$  Hz), 7.13 (dd, 1H,  $J = 1.1, 3.6$  Hz), 7.23 (dd, 1H,  $J = 1.1, 5.1$  Hz), 7.38-7.46 (m, 1H), 7.63 (s, 1H);

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14.4, 23.5, 24.6, 25.5, 26.1, 57.3, 105.2$  (splittato), 112.1 (splittato), 123.7, 124.4, 125.1, 125.2, 127.4, 128.1, 129.6, 130.4 (splittato), 136.6, 137.6, 140.0, 144.4, 157.2 (splittato), 159.7, 163.1 (splittato);

**ESI-MS**  $m/z$  calc. 535.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , trovato 535.5.

Autore: Marilena Pira

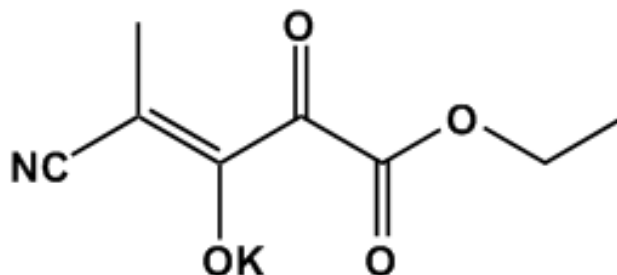
Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

## 6.2 Derivati piridinici.

### Sintesi del 3-Ciano-1-etossi-1-ossobut-2-en-2-olato di potassio (31)

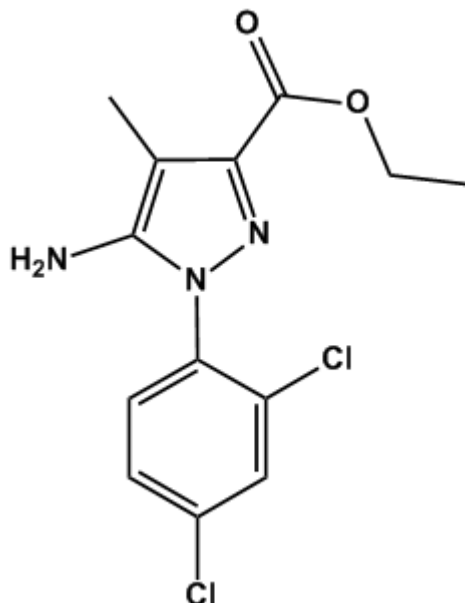


Ad una sospensione di *t*-BuOK (1 eq) in THF anidro (40 mL), raffreddata a 0°C, viene aggiunto il dietilossalato (1 eq, 42.12 mmol) e di seguito il propionitrile (**30**) (1 eq). La miscela viene scaldata a 60°C per 1.5h e quindi agitata a temperatura ambiente per 1h. Il solido formatosi viene filtrato, lavato con Et<sub>2</sub>O e asciugato all'aria per dare **31** (6.53g, resa 80%) come solido giallino.

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ=1.22 (s, 3H, J=6.8 Hz) 1.53 (s, 3H) 4.05 (q, 2H, J=6.8 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ=14.1, 15.2, 64.4, 92.6, 118.4, 149.8, 162.4.

**Sintesi dell' etil 5-ammino-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (32)**

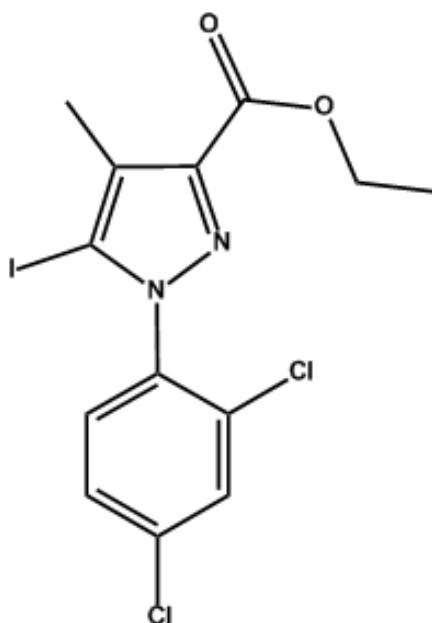


Ad una sospensione del 3-ciano-1-etossi-1-ossobut-2-en-2-olato di potassio (**31**) (1 eq, 53.69 mmol) in etanolo (83.3 mL) viene aggiunta la 2,4-diclorofeilidrazina · HCl (1.1 eq) e la miscela viene scaldata a riflusso per 16h. Dopo raffreddamento il solvente viene allontanato mediante evaporazione a pressione ridotta e il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) per ottenere **32** (3.29g, resa 19.5%) come solido giallo.  $R_f = 0.46$  (etere di petrolio/EtOAc, 8:2).

**FT-IR:**  $\nu = 1718, 3245$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.39$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz)  $2.21$  (s, 3H)  $3.43$  (bs, 2H)  $4.40$  (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz)  $7.39$  (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz)  $7.42$  (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz)  $7.55$  (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz).

**Sintesi dell'Etil 5-iodo-1-(2,4-dichlorofenil)-1H-pirazol-3-carbossilato (35)**

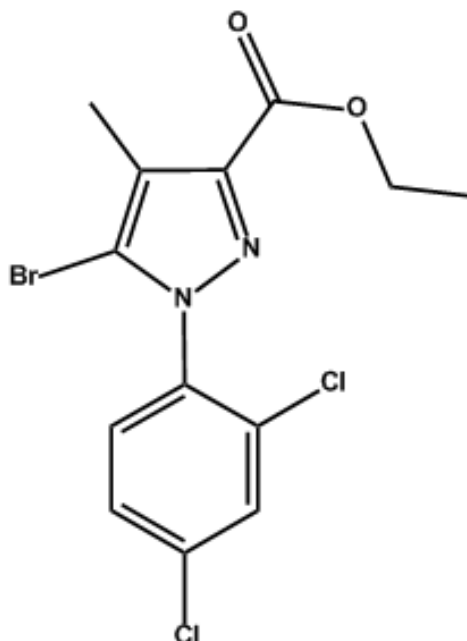


Il 5-ammino-pirazolo **32** (1 eq, 1.91 mmol) viene disciolto in CH<sub>3</sub>CN (21 mL) in atmosfera inerte, quindi viene aggiunto lo iodio solido (4.3 eq) e la soluzione viene agitata a temperatura ambiente. Una volta completata la dissoluzione dello iodio, il *tert*-butil nitrito (1.2 eq) viene fatto gocciolare molto lentamente. La miscela così ottenuta viene scaldata a 45°C per 30 minuti, quindi viene versata in una soluzione satura di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche combinate vengono lavate con acqua, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) per ottenere **20** (0.69g, resa 85%) come solido giallo.  $R_f = 0.72$  (etere di petrolio/EtOAc, 8:2).

**FT-IR:**  $\nu = 1718$ ;

**<sup>1</sup>H NMR** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.42$  (t, 3H, J=7.3 Hz) 2.39 (s, 3H) 4.43 (q, 2H, J=7.3 Hz) 7.33 (d, 1H, J=8.4 Hz) 7.36 (dd, 1H, J=8.4, 2.1 Hz) 7.55 (d, 1H, J= 2.1 Hz).

**Sintesi dell'Etil 5-bromo-1-(2,4-dichlorofenil)-1H-pirazol-3-carbossilato (35)**



Ad una soluzione di  $\text{CuBr}_2$  (1.2 eq) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (7.5 mL), in atmosfera inerte, viene aggiunto il *tert*-butil nitrito (1.5 eq), quindi viene fatta gocciolare una soluzione del 5-ammino-pirazolo **32** (1 eq, 1.59 mmol) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (7.5 mL). La miscela così ottenuta viene fatta reagire a  $90^\circ\text{C}$  per 2 h, quindi raffreddata a temperatura ambiente ed il solvente eliminato per evaporazione a pressione ridotta. Il solido ottenuto viene sospeso in acqua e ghiaccio ed estratto con AcOEt. Le fasi organiche combinate vengono lavate con acqua, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 8:2) per ottenere **35** (0.37g, resa 76%) come solido giallo.  $R_f = 0.78$  (etere di petrolio/EtOAc, 8:2).

**FT-IR:**  $\nu = 1708$ ;

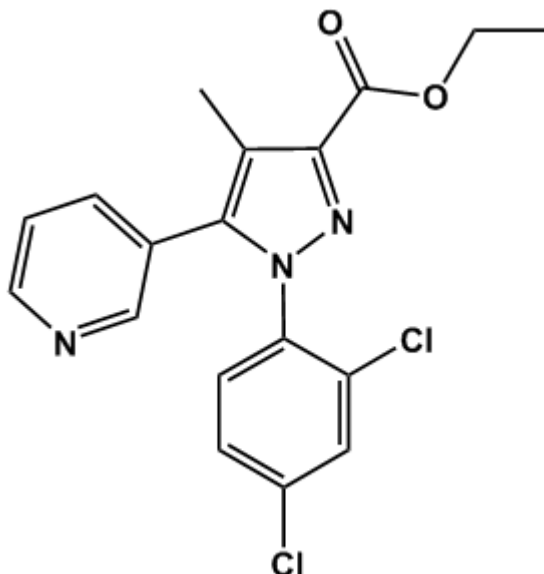
**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.41$  (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz) 2.34 (s, 3H) 4.41 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz) 7.35 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz) 7.39 (dd, 1H,  $J = 8.4, 2.1$  Hz) 7.55 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz).

**Procedura generale VI: sintesi dei Carbossilati (34a-c, 36a-d).**

Una soluzione in DME (5.0 ml) dell'etil 1-(2,4-dichlorofenil)-5-iodo-1*H*-pirazol-3-carbossilato **35** (1 eq., 0.7 mmol) viene trasferita in un pallone sotto flusso di azoto. Dopo aver saturato la soluzione con N<sub>2</sub>, viene aggiunto il tetrakis(trifenilfosfina)palladium(0) (0.05 eq.) seguito dall'appropriato acido boronico **28** e da una soluzione acquosa di sodio carbonato (1.3 eq.) in acqua (2.5 ml). La miscela così ottenuta viene scaldata a 80°C per 24h, quindi raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche combinate vengono lavate con acqua, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e concentrate a pressione ridotta. Il prodotto analiticamente puro viene isolato mediante cromatografia flash seguita da ricristallizzazione, come indicato in seguito.



**Etil 1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-5-(piridin-3-il)-1H-pirazol-3-carbossilato (34a)**

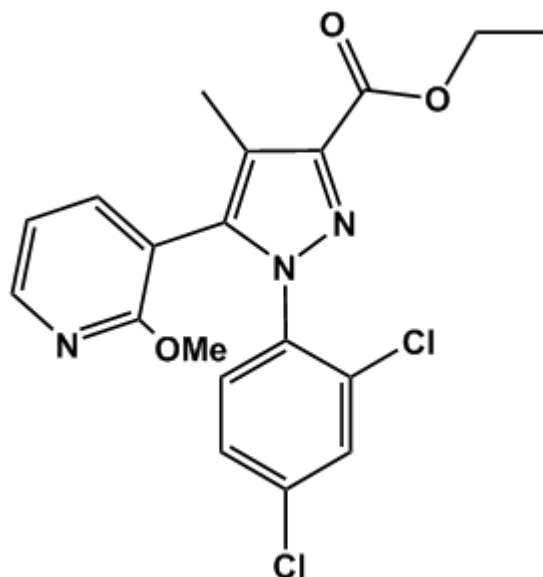


La procedura generale VII è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28b** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/AcOEt, 7:3) per ottenere **34a** (0.16g, resa 78.9 %) come solido bianco.  $R_f = 0.42$  (etere di petrolio/AcOEt, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2929, 2982, 3082$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.42$  (t, 3H,  $J=7.1$  Hz)  $2.35$  (s, 3H)  $4.46$  (q, 2H,  $J=7.1$  Hz)  $7.25$ - $7.32$  (m, 2H)  $7.35$ - $7.40$  (m, 2H)  $7.44$ - $7.48$  (m, 1H)  $8.41$  (bs, 1H)  $8.56$  (dd, 1H  $J=4.9, 1.6$  Hz).

**Etil 1-(2,4-diclorofenil)-5-(2-metossipiridin-3-il)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (34b)**

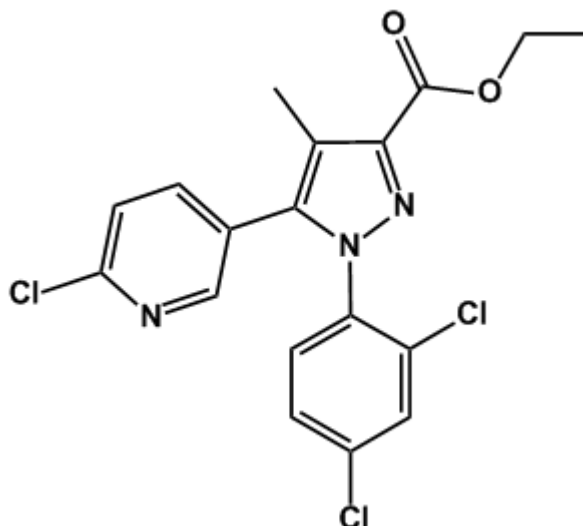


La procedura generale VI è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28c** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1) per ottenere **34b** (0.205g, resa 93.0 %) come solido bianco.  $R_f = 0.48$  (etere di petrolio/etil acetato, 9:1);

**FT-IR:**  $\nu = 1712, 2810, 2854, 2947$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.42$  (t, 3H,  $J=7.1$  Hz)  $2.25$  (s, 3H)  $3.75$  (s, 3H)  $4.45$  (q, 2H,  $J=7.1$  Hz)  $6.90$  (dd, 1H,  $J=7.2, 5.1$  Hz)  $7.23$  (dd, 1H,  $J=8.5, 2.2$  Hz)  $7.31$  (bs, 1H)  $7.34$  (d, 1H,  $J=1.9$  Hz)  $7.44$  (d, 1H,  $J=6.1$  Hz)  $8.17$  (dd, 1H,  $J=5.1, 1.9$  Hz).

**Etil 5-(6-cloropiridin-3-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (19c)**

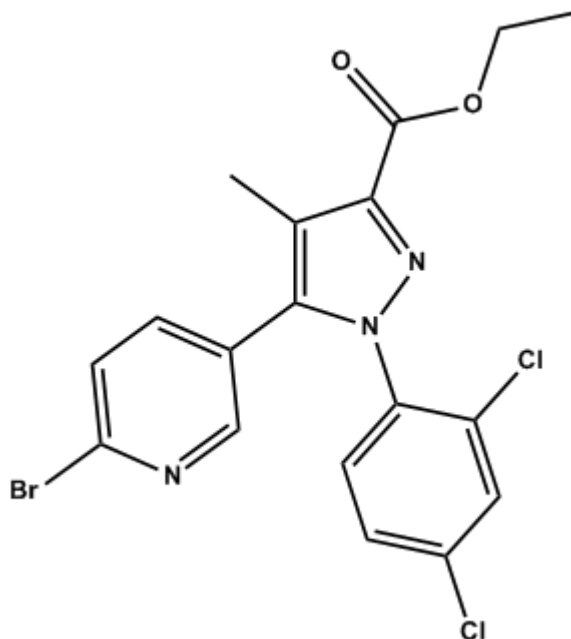


La procedura generale VII è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **33** e l'acido boronico **28d** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3) per ottenere **34c** (0.25g, resa 52.0 %) come solido giallino.  $R_f = 0.68$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2850, 2927, 3322$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.43$ (t, 3H,  $J=7.1$  Hz) 2.35 (s, 3H) 4.46 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz) 7.29-7.35 (m, 2H) 7.39 (d, 1H,  $J=1.6$  Hz) 7.39-7.45 (m, 2H) 8.18 (d, 1H,  $J=2.1$  Hz).

**Etil 5-(6-bromopiridin-3-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (36a)**

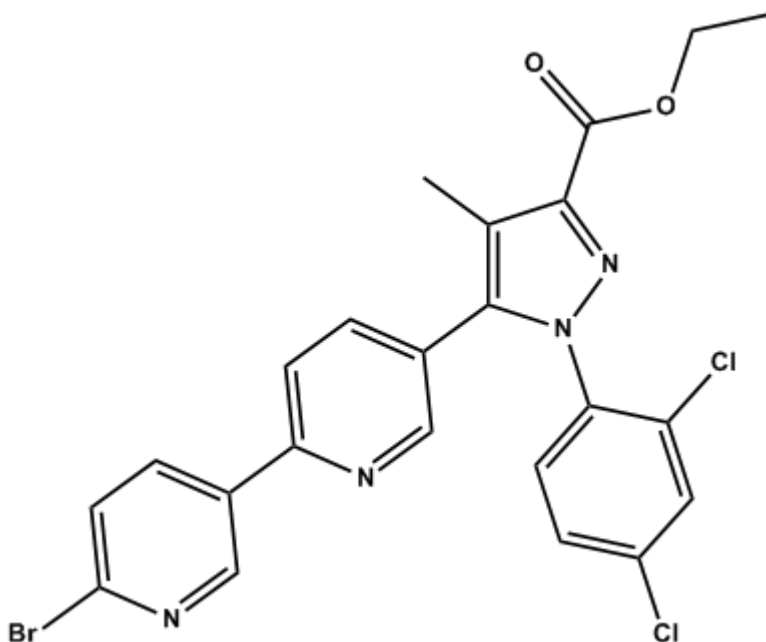


La procedura generale VI è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28a** nel prodotto sopra riportato. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **36a** (0.05g, resa 6.7 %) come solido giallino.  $R_f = 0.7$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3).

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2853, 2923, 2957$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.42(\text{t}, 3\text{H}, J=7.3 \text{ Hz})$   $2.35(\text{s}, 3\text{H})$   $4.46(\text{q}, 2\text{H}, J=7.3 \text{ Hz})$   $7.30-7.34(\text{m}, 2\text{H})$   $7.9(\text{d}, 1\text{H}, J=1.9 \text{ Hz})$   $7.40(\text{d}, 1\text{H}, J=8.3 \text{ Hz})$   $7.48(\text{d}, 1\text{H}, J=8.3 \text{ Hz})$   $8.16(\text{d}, 1\text{H}, J=1.9 \text{ Hz})$ .

Etil 5-(6'-bromo-2,3'-dipiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (36b)

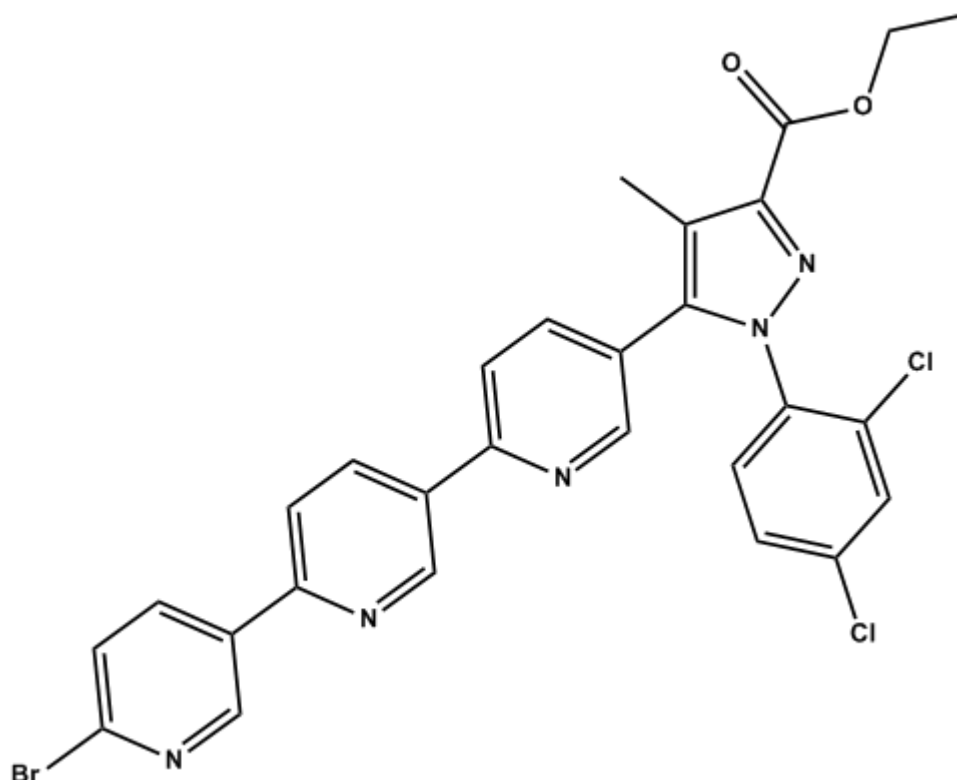


La procedura generale VI è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28a** nel prodotto sopra riportato. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **36b** (0.06g, resa 6.9 %) come solido giallino.  $R_f = 0.45$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3)

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2853, 2923, 2957$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.43$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz) 2.40 (s, 3H) 4.46 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz) 7.33 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 7.39 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 7.43 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.54-7.60 (m, 2H) 7.72 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 8.19 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.50 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz) 8.93 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz).

**Etil 5-(6''-bromo-2,2',3''-tripiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (36c)**



La procedura generale VI è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28a** nel prodotto sopra riportato. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **36c** (0.10g, resa 10.0 %) come solido giallino.  $R_f = 0.25$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3)

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2854, 2921, 2950$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.43$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz) 2.40 (s, 3H) 4.46 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz) 7.33 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 7.39 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 7.43 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.55-7.61 (m, 2H) 7.77 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.85 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz) 8.24 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.43 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.52 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz) 9.01 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 9.28 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz)

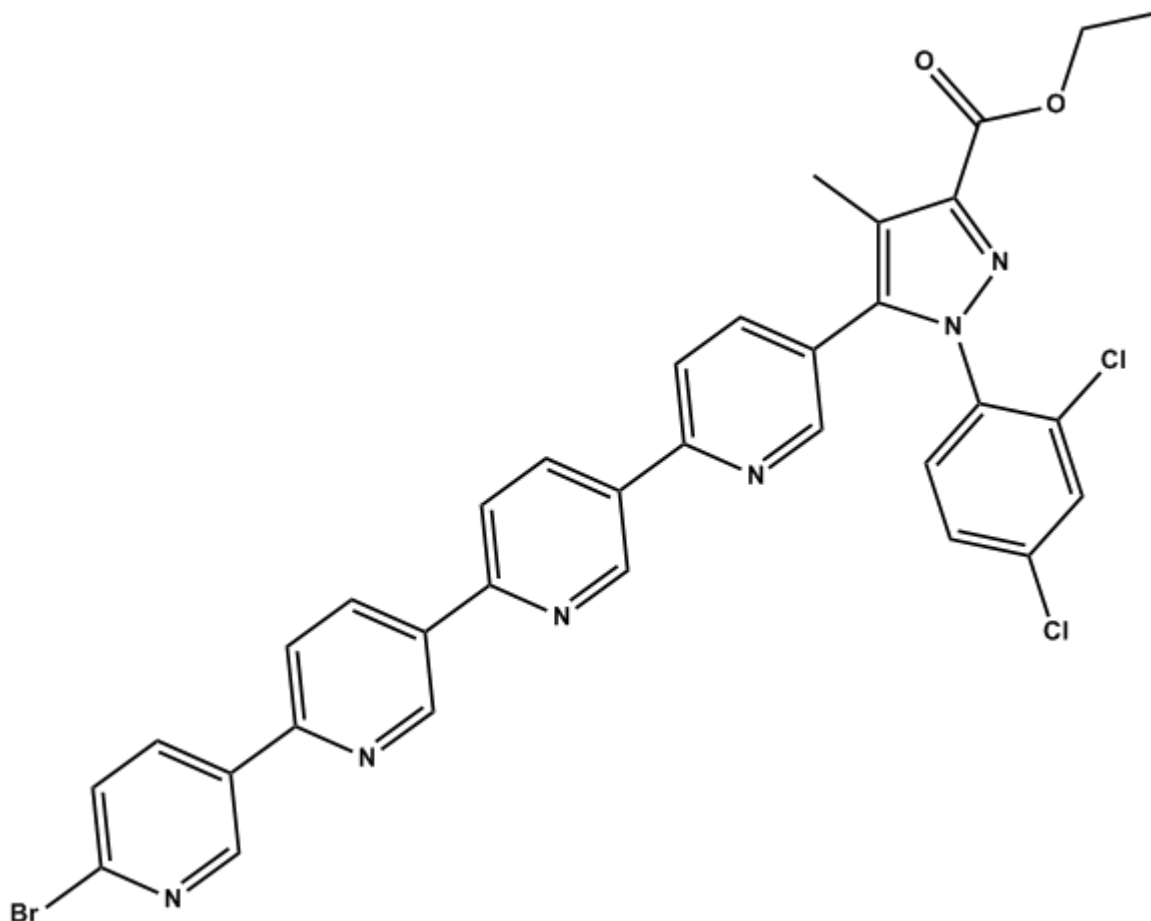
Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**Etil 5-(6'''-bromo-2,2',2'',3'''-tetrapiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (36d)**



La procedura generale VI è stata usata per convertire lo iodo-pirazolo **35** e l'acido boronico **28a** nel prodotto sopra riportato. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **36d** (0.022g, resa 2.0 %) come solido giallino.  $R_f = 0.11$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3).

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2853, 2923, 2957$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.45$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz) 2.43 (s, 3H) 4.47 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz) 7.34 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 7.40 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 7.46 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.58-7.64 (m, 2H) 7.81 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.87 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz) 7.92 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz) 8.30 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.47 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.52 (dd, 1H,  $J = 8.8, 2.4$  Hz) 8.55 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz) 9.02 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 9.32 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz) 9.36 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz).

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

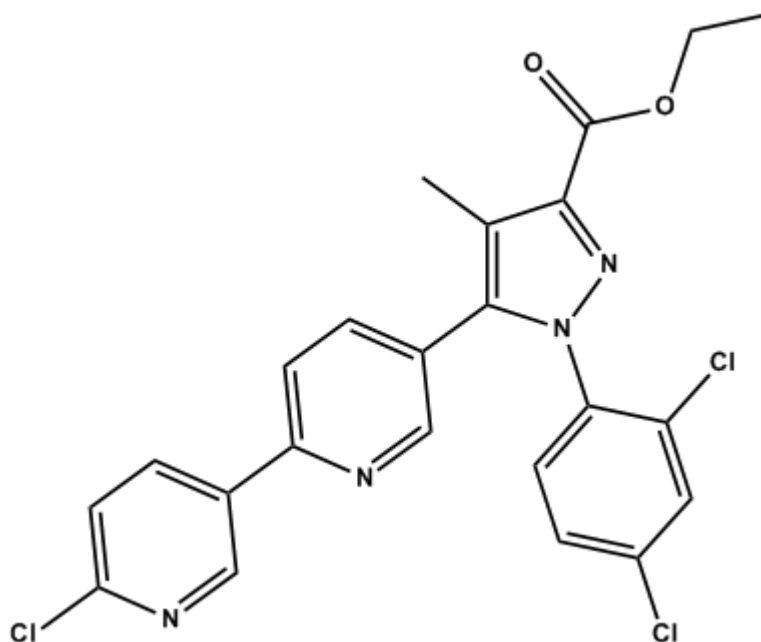
Università degli Studi di Sassari

**Sintesi dei Carbossilati (37a-c).**

Una soluzione in DME (5.0 ml) dell' etil 5-bromo-1-(2,4-dichlorofenil) -1*H*-pirazol-3-carbossilato **33** (1 eq., 0.7 mmol) viene trasferita in un pallone sotto flusso di azoto. Dopo aver saturato la soluzione con N<sub>2</sub>, viene aggiunto il tetrakis(trifenilfosfina)palladium(0) (0.05 eq.) seguito dall'appropriato acido boronico **28c** e da una soluzione acquosa di sodio carbonato (1.3 eq.) in acqua (2.5 ml). La miscela così ottenuta viene fatta reagire a 80°C per 24 h, quindi raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua ed estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche combinate vengono lavate con acqua, anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e concentrate a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **34c** più i composti **37a-c** riportati di seguito.



**Etil 5-(6'-cloro-2,3'-dipiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (37a)**

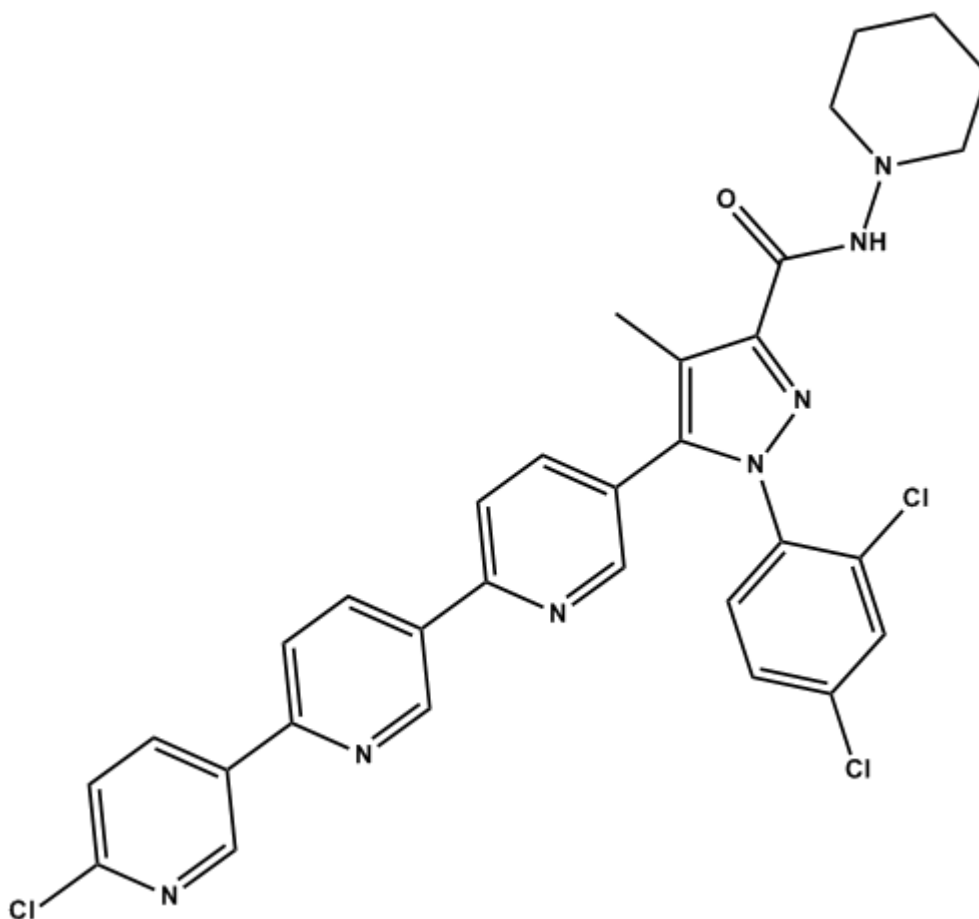


Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **37a** (0.02g, resa 6.1 %) come olio giallino.  $R_f = 0.41$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3).

**FT-IR:**  $\nu = 1725, 2852, 2920, 2960$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.44$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz) 2.40 (s, 3H) 4.47 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz) 7.35 (dd, 1H,  $J = 8.5, 1.9$  Hz) 7.40 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz) 7.42-7.46 (m, 2H) 7.58 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 7.71 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 8.30 (dd, 1H,  $J = 8.2, 2.5$  Hz) 8.50 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz) 8.96 (d, 1H,  $J = 2.5$  Hz).

Etil 5-(6''-cloro-2,2',3''-tripiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossilato (**37b**)



Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **37b** (0.03g, resa 7.6 %) come olio giallino.  $R_f = 0.37$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3)

**FT-IR:**  $\nu = 1709, 2849, 2926, 2952$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.44$  (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz) 2.40 (s, 3H) 4.47 (q, 2H,  $J = 7.3$  Hz) 7.34 (dd, 1H,  $J = 8.5, 1.9$  Hz) 7.40 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz) 7.42-7.46 (m, 2H) 7.60 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 7.80 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz) 7.83 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz) 8.38 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 8.44 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 8.54 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz) 9.03 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz) 9.28 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz).

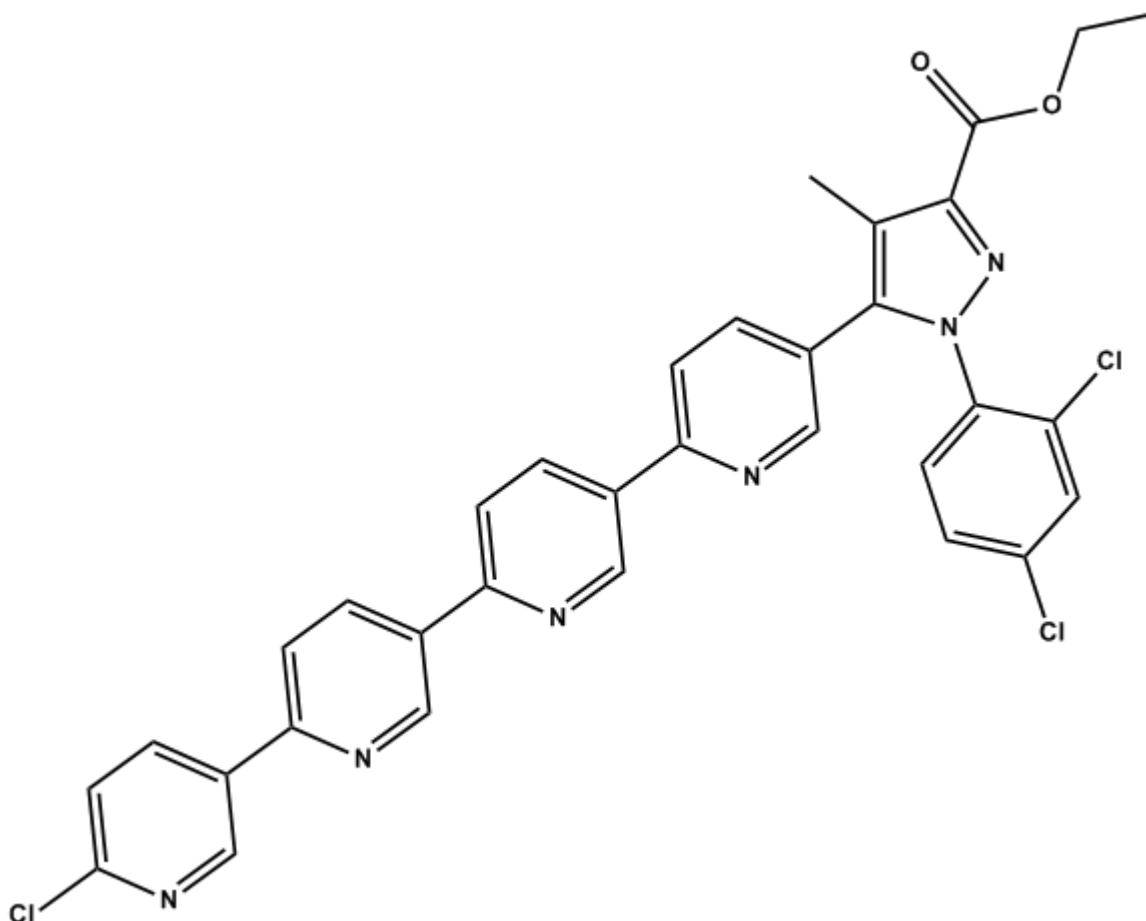
Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**Etil 5-(6'''-cloro-2,2',2'',3'''-tetrapiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossilato (37c)**



Il grezzo di reazione viene purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 9:1→7:3) per ottenere **37c** (0.01g, resa 3.5 %) come solido bianco.  $R_f = 0.11$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3).

**FT-IR:**  $\nu = 1714, 2853, 2923, 2957$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.45$  (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz) 2.43 (s, 3H) 4.48 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz) 7.35 (dd, 1H,  $J = 8.5, 2.2$  Hz) 7.40 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz) 7.42-7.46 (m, 2H) 7.60 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 7.81 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.86 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 7.92 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz) 8.40 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 8.47 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 8.52 (dd, 1H,  $J = 8.3, 2.2$  Hz) 8.55 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz) 9.05 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz) 9.32 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz) 9.36 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz).

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

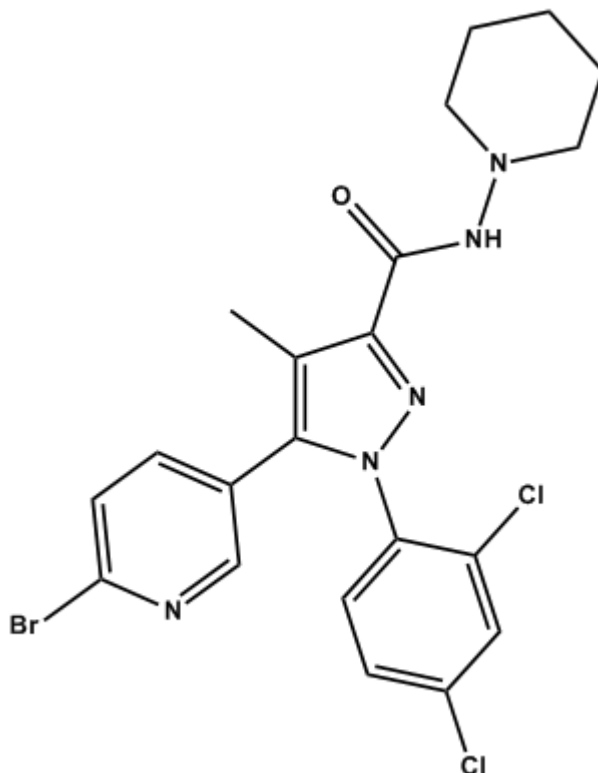
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

**Procedura generale VII: sintesi delle Piridinil-arbossammidi (12a-b, 11a-c).**

Ad una soluzione dell'appropriato ethyl 5-(pyridinil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossilato **34** o **36** (1 eq., 0.11 mmol) in una miscela di metanolo (0.88 mL) e acqua (0.22 mL) si aggiunge del LiOH·H<sub>2</sub>O solido (2 eq). La miscela risultante viene agitata a temperatura ambiente per 16 ore quindi viene acidificata con HCl 1N e riportata a pH neutro con NaHCO<sub>3</sub> al 5%. Il solvente viene evaporato completamente a pressione ridotta e il solido ottenuto è trattato con CHCl<sub>3</sub>. Il residuo insolubile viene filtrato ed il solvente è eliminato a pressione ridotta. Il solido ottenuto viene disciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) insieme all' *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N*-etilcarbodiimmide · HCl (1.2 eq.) e 1-idrossibenzotriazolo idrato (1.2 eq.) e la miscela viene agitata a temperatura ambiente. Dopo ½ ora viene aggiunta goccia a goccia l'1-aminopiperidina e la soluzione arancio ottenuta viene fatta reagire per 16 ore a temperatura ambiente. Il solvente viene quindi evaporato ed il prodotto analiticamente puro viene isolato mediante cromatografia flash, come indicato in seguito.

**5-(6-Bromopiridin-3-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (12a)**

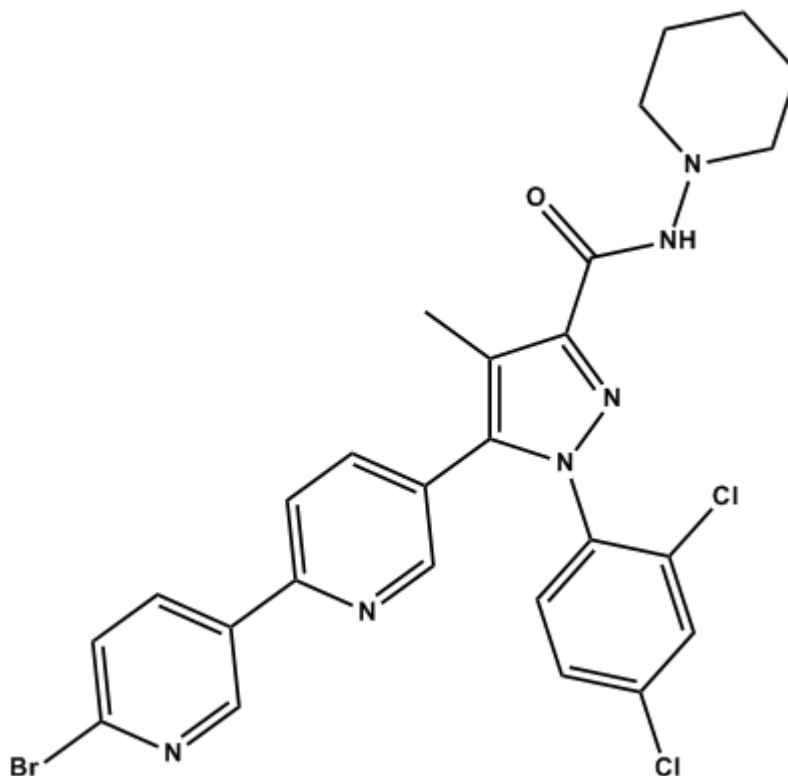


La procedura generale VII è stata usata per convertire il carbossilato **36a** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3→6:4) per ottenere **12a** (0.023g, resa 41.0 %) come solido giallino.  $R_f$  = 0.14 (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu$ = 1725, 2952, 2931;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ =1.41-1.45(m, 2H) 1.73-1.78 (m, 4H) 2.38 (s, 3H) 2.86 (bs, 4H) 7.31 (dd, 1H,  $J$ =8.3, 2.4 Hz) 7.35 (d, 2H,  $J$ =1.2 Hz) 7.42-7.44(m, 1H) 7.47 (d,  $J$ =8.1 Hz) 7.61 (bs, 1H) 8.13 (d, 1H,  $J$ =2.13 Hz).

**5-(6'-Bromo-2,3'-dipiridin-5-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (12b)**

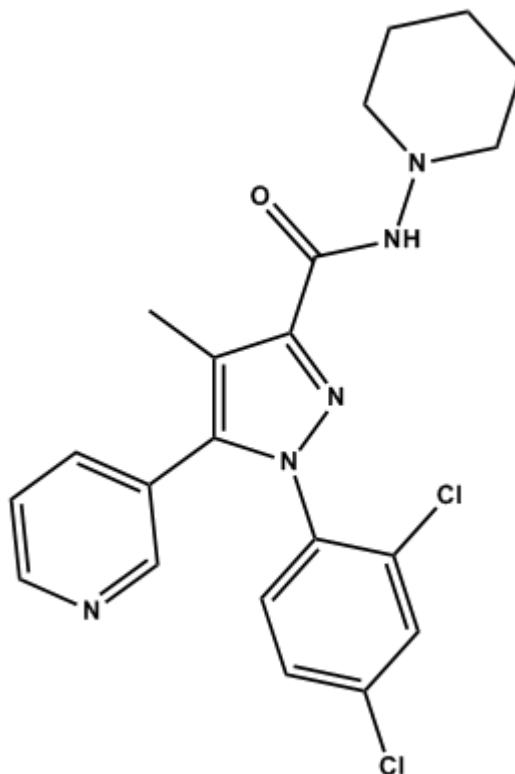


La procedura generale VI è stata usata per convertire il carbossilato **36b** nel prodotto sopra riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3→1:1) per ottenere **12b** (0.035g, resa 54.0 %) come olio giallino.  $R_f$  = 0.12 (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu$ = 1723, 2854, 2934;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ =1.38-1.45(m, 2H) 1.76-1.79 (m, 4H) 2.45 (s, 3H) 2.87-2.88 (m, 4H) 7.35-7.42 (m, 2H) 7.44-7.45 (m, 3H) 7.73(dd, 1H  $J$ =8.2, 0.8 Hz) 8.20 (dd, 1 H  $J$ =8.2, 2.6Hz) 8.48-8.49 (m, 1H) 8.94 (d, 1H  $J$ =2.6).

**1-(2,4-Diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-5-(piridin-3-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (11a)**

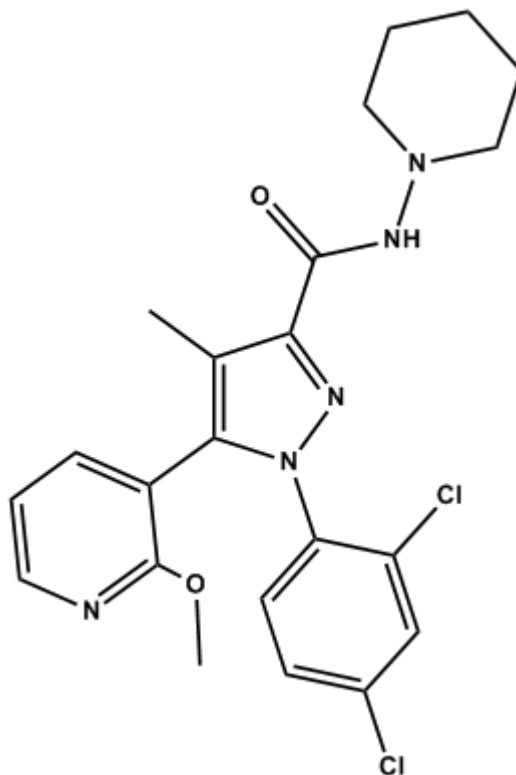


La procedura generale VI è stata usata per convertire il carbossilato **34a** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone, 98:2) per ottenere **11a** (0.065g, resa 52.0 %) come solido giallino.  $R_f = 0.24$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetone, 98:2);

**FT-IR:**  $\nu = 1738, 2855, 2923, 3254$ ;

**<sup>1</sup>H NMR** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.41-1.45$  (m, 2H)  $1.73-1.78$  (m, 4H)  $2.39$  (s, 3H)  $2.86-2.88$  (m, 4H)  $7.25-7.30$  (m, 1H)  $7.31-7.34$  (m, 2H)  $7.41$  (dd, 1H,  $J = 1.8, 0.6$  Hz)  $7.44-7.49$  (m, 1H)  $7.64$  (s, 1H)  $8.40$  (dd, 1H  $J = 2.2, 0.7$  Hz)  $8.56$  (dd, 1H  $J = 4.9, 1.6$  Hz).

**1-(2,4-Diclorofenil)-5-(2-metossipiridin-3-il)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammide (11b)**



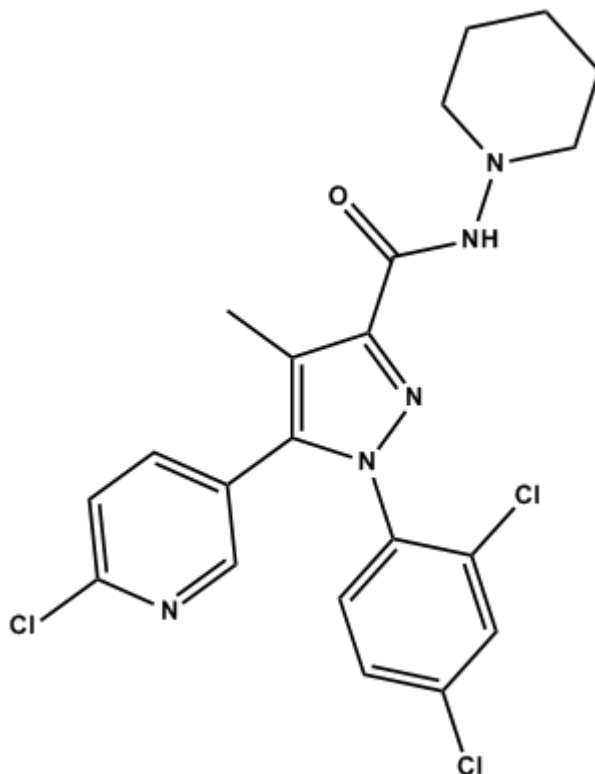
La procedura generale VI è stata usata per convertire il carbossilato **34b** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3→1:1) per ottenere **11b** (0.08g, resa 72.0 %) come olio giallino.  $R_f$  = 0.15 (etere di petrolio/etil acetato, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu$ = 1676, 2804, 2855, 2940;

**$^1\text{H}$  NMR** (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ =1.39-1.42(m, 2H) 1.71-1.77 (m, 4H) 2.27 (s, 3H) 2.84- 2.86 (m, 4H) 3.72 (s, 3H) 6.88-6.91 (m, 1H) 7.24-7.25 (m, 1H) 7.43 (dd, 2H  $J$ = 7.3, 1.9 Hz) 7.66 (s, 1H) 8.5 (dd , 1H  $J$ =5, 1.9 Hz).



**5-(6-cloropiridin-3-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carbossammide (11c)**



La procedura generale VI è stata usata per convertire il carbossilato **34c** nel prodotto sotto riportato. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/etil acetato, 7:3→6:4) per ottenere **11c** (0.14g, resa 52.0 %) come olio giallino.  $R_f = 0.28$  (etere di petrolio/EtOAc, 7:3);

**FT-IR:**  $\nu = 1677, 2855, 2965$ ;

**$^1\text{H NMR}$**  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.41-1.45$ (m, 2H) 1.70-1.77 (m, 4H) 2.37 (s, 3H) 2.84 (bs, 4H) 7.29 (dd, 1H,  $J=8.3, 0.7$  Hz) 7.33 (d, 2H,  $J=1.2$  Hz) 7.39-7.43 (m, 2H) 7.60 (bs, 1H) 8.13 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz).

## **7.0 Bibliografia**

- 1) Lambert D. M., Fowler C. J., *J. Med. Chem.* **2005**, 48(16), 5059-5087.
- 2) Di Marzo V., *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27(3), 134-140.
- 3) Gaoni Y., Mechoulam R., *Journal of the American Chemical Society* 1964, 86 (8), 1646-1647.
- 4) Clementi F., Fumagalli G., *Farmacologia generale e molecolare*, **2004**, 790.
- 5) Stahl Stephen M., *Psicofarmacologia essenziale. Basi neuroscientifiche e applicazioni pratiche. II ed*, **2002**, 612.
- 6) Nocerino E., Amato M., Izzo A. A. *Cannabis and cannabinoid receptors. Fitoterapia*, **2000**, 71, S6-S12.
- 7) Reggio P. H. et al, *Curr. Pharm. Des.*, **2003**, 9, 1607-1633.
- 8) Reddy K. S., *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 2438-40.
- 9) Grottenhermen F., *Cannabinoids*, **2006**, 1(1), 10-14.
- 10) Di Marzo V., Silvestri C., *Cell Met.*, **2013**, 17, 475-490.
- 11) Mackie K. Ann., *Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, 46, 101-122.
- 12) Fernández-Ruiz J., Romero J, Velasco G., Tolòn R.M., Ramos J. A., Guzman M., *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 28(1), 39-45.
- 13) Ford E. S., Ajani U. A., Croft J. B., et al., *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 2388-98.
- 14) Pagotto U., Vicennati V., Pasquali R., *Il sistema endocannabinoide e il controllo del metabolismo energetico: fisiologia e fisiopatologia*, **2008**.
- 15) Lan R., Liu Q., Fan P., Lin S., Fernando. S. R., McCallion D., Pertwee R., Makriyannis A., *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 769-776.
- 16) Hampf C., Hartzema A. G., Kauf T. L., *Value of Health*, **2008**, 11, 389-399.
- 17) Bensaid M., Gary-Bobo M., Esclangon A., Maffrand J., Le Fur G., Oury-Donat F., Soubrie P., *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 63, 908-914.
- 18) Di Marzo V., Goparaju S. K., Wang L., Liu J., Bátkai S., Járjai Z., Fezza F., Miura G. I., Palmiter R. D., Sugiura T., Kunos G., *Nature*, **2001**, 410, 822-825.
- 19) Liu Y, Connoley I, Wilson C, Stock M, *Int. J. Obesity*, **2004**, 29, 183-187.
- 20) Vickers S, Webster L, Wyatt A, Dourish C, Kennett G, *Psychopharmacol.*, **2003**, 167, 103-111.

- 21) Murineddu G., Ruiu S., Loriga G., Manca I., Lazzari P., Reali R., Pani L., Toma L., Pinna G. A., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7351-7362.
- 22) Matias I, Di Marzo V. *Trends Endocrin. Met.*, **2007**, *18*, 27-37.
- 23) Barth F., Casellas P., Congy C., Martinez S., Renaldi M., Anne-Archard G., *PCT US* 5,624,941, **1997**.
- 24) Silvestri C., Di Marzo V., *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2012**, *21(9)*, 1309-1321.
- 25) Kunos G., *5th Diabetes Drug Discovery & Development, Boston, MA (USA)*, **2012**.
- 26) Hung M. S., Chang C. P., Li T. C., et al., *Chem. Med. Chem.*, **2010**, *5(9)*, 1439-1443.
- 27) Hortala I., Rinaldi-Carmona M., Congy C., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20(15)*, 4573-4577.
- 28) Tseng S. L., Hung M. S., Chang C. P., Song J. S., Tai C. L., Chiu H. H., Hsieh W. P. Lin Y, Chung W. L., Kuo C. W., Wu C. H., Chu C. M., Tung Y. S., Chao Y. S., Shia K. S., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5397-5412.
- 29) Chen J. Z., Han, X. W, Liu Q., Makryannis A., Wang J., Xie X.Q., *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 625-636.
- 30) Lazzari P., Ruiu S., Pinna G. A., Murineddu G., *PCT US* 7,659,407, **2010**.
- 31) Mussino J. M., Ruiu S., Mulè A. C., Pau A., Carai M. A. M., Loriga G., Murineddu G., Pinna G.A., *Bioorg. & Med. Chem.* **2003**, *11*, 251-263.
- 32) Mussino J. M., Ruiu S., Grella G. E., Carai M. A. M., Loriga G., Murineddu G., Lazzari P., Pani L., Pinna G. A., *Bioorg. & Med. Chem.* **2005**, *13*, 3309-3320.
- 33) Murineddu G., Ruiu S., Loriga G., Manca I., Lazzari P., Reali R., Pani L., Toma L., Pinna G. A., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7351-7362.
- 34) Murineddu G., , Lazzari P., Ruiu S., Sanna A., Loriga G., Manca I., Falzoi M., Dessì C., Curzu M. M., Chelucci G., Pani L., Pinna G. A., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7502-7512.
- 35) Lazzari P., Loriga G., Manca I., Pinna G. A., Pani L., *PCT US*2010215741 A1, **2010**.
- 36) Howlett A.C., Barth F., Bonner T. I., Cabral G., Casellas P., Devane W. A., Felder C. C., Herkenham M., Mackie K., Martin B. R., Mechoulam R., Pertwee R. G., *Pharmacological Reviews*, **2002** , *54*, 2161-2202.
- 37) H. J. Seo et al. , *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1149–1162.
- 38) Portier M, Rinaldi-Carmona M, Pecceu F, Combes T, Poinot-Chazel C, Calandra B, Barth F, le Fur G, Casellas P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *288(2)*, 582-589.

- 39) Howlett A. C., Wilken G. H., Pigg J. J., Houston D. B., Lan R., Liu Q., Makriyannis A., *J. Neurochem.*, **2000**, *74*, 2174–2181.
- 40) Rinaldi-Carmona M., Barth F., Millan J, Deroc J.-M., Casellas P., Congy C., Oustric D., Sarran M., Bouboula M., Calandra B., et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, *284*, 644–650.
- 41) Wiley J. L., Jefferson R. G., Grier M. C., Mahadeyan A., Razdan R. K., Martin B. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *296*, 1013–1022.
- 42) Thomas B. F., Gillia, A. F., Burch D. F., Roche M. J., Seltzman H. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**, *285*, 285–292.
- 43) Barth F. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4573-4577.
- 44) Maitra R. et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2820-2834.
- 45) Maitra R. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5711-5714.
- 46) Lazzari P., Pau A., Tambaro S., Asproni B., Ruiu S., Pinna G., Mastinu A., Curzu M. M., Reali R., Bottazzi M. E., Pinna G. A., Murineddu G., *Centr. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **2012**, *12(4)*, 254-276.
- 47) Makriannis, A.; Liu, Q.; Thotapally, R. U.S. Patent 7,393,842B2, **2008**.
- 48) Goodwin J. T., Clark D. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, *315(2)*, 477-483.
- 49) Waterhouse R. N., *Mol. Imaging Biol.*, **2003**, *5(6)*, 376-389.
- 50) Shityakov S., Salvador E., Förster C., *OA Anaesthetics*, **2013**, *1(2)*, 1-14.
- 51) Clark D.E., *J Pharm Sci* **1999**, *88*, 815–821.
- 52) Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B., Feeney P. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, *46(1-3)*, 3-26.
- 53) Clark D. E., *Drug Discov. Today*, **2003**, *8(20)*, 927-933.
- 54) Rishton GM, LaBonte K, Williams AJ, Kassam K, Kolovanov E., *Curr. Opin. Drug Discov. Develop*, **2006**, *9(3)*, 303-313.
- 55) Viswanadhan, V. N., Ghose, A. K., Revankar, G. R., Robins, R. K., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1989**, *29*, 163-172.
- 56) Ferrara, P., Apostolakis J., Caflisch A., *Proteins* 2002, *46*, 24-33.
- 57) Kloska A., Narajczyk M., Jakóbkiewicz-Banecka J., Gryniewicz G., Szeja W., Gabig-Cimińska M. and Węgrzyn G., *J. Trasl. Med.* **2012**, *10*, 153-157.
- 58) OECD *Guideline for Testing of Chemicals 117, Partition Coefficient (n-Octanol/Water), High performance Liquid Chromatography (HPLC) Method*, OECD **2004**.

Autore: Marilena Pira

Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

- 59) Harnisch M., Möckel H. J., Schulze G., *J. Chromatogr.*, **1983**, 282, 315-332.
- 60) Donovan S. F., Pescatore M. C, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 952, 47-61.
- 61) Ruiu S., Pinna G. A., Marchese G., Mussinu J.-M., Saba P., Tambaro S., Casti P., Vargiu R., Pani L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 306, 363-370.
- 62) Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., *Br. J. Pharmacol.* **1993**, 110, 1483-1490.
- 63) Arunlakshana and Shild, *Br. J. Pharmacol.* **1959**, 14, 48-58. A.
- 64) Lipina C., Rastedt W., Irving A. J., Hundal H. S., *BioEssays*, **2012**, 34, 681-691.
- 65) Mastinu, M. Pira, L. Pani, G. A. Pinna, P. Lazzari, *Behav. Brain Res.*, **2012**, 234(2), 192-204.
- 66) Zhang N., Vozzolo J., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1703-1704.
- 67) Misra R. N. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2405-2408.
- 68) Chappell M. D., Conner S. E., Gonzale Valcarcel I. C., Larmar J. E., Li J., Moyers J. S., Owens R.A., Tripp A. E., Zhu G., *PCT US2008125468 A1*, **2008**.
- 69) Beaulieu P. L., Gillard J., et al., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4987-4993.
- 70) Dobs C., Yamamoto T., Inagaki A., Akita M., *Organometallics* **2006**, 25, 1344-1358.
- 71) Lee S. H., Seo H. J., Lee S. H., et al., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7216-7233.
- 72) Zhang, J.; Didierlaurent, S.; Fortin, M; Lefrançois, D.; Uridat, E. ; Vevert, J. P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2575-2578.
- 73) Corpino P. A., Dow R. L., *PCT US 2004/0214855 A1*, **2004**.
- 74) Zauhar J., Ladouceur B. F., *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 1079-1091.
- 75) So C. M.; Lau C. P.; Chan A. S. C.; Kwong F. Y., *J. Org. Chem* **2008**, 73, 7731-7734.
- 76) So C. M., Lau C. P., Kwong F. Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8059-8063.
- 77) Silvestri R., Cascio M. G., La Regina G., Piscitelli F., Lavecchia A., Brizzi A., Pasquini S., Botta M., Novellino E., Di Marzo V., Corelli F., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1560-1576.
- 78) Burzicki G., Voisin-Chiret A.S., Oliveira Santos J. S., Rault S., *Tetrahedron* **2009**, 65, 5413-5417.
- 79) Kiyama R., Kawasuji, *PCT US 2010068695*, **2010**.
- 80) Li Y., Dolphin D., *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3562-3566.
- 81) Srivastava B. K., Soni R., Patel J. Z., Joharapurkar A., Sadhwani N., Kshirsagar S., Mishra B., Tarale V., Gupta S., Panda P., Kapadnis P., Solanki M., Patel H., Mitra P, Jain M. R., Patel P. R., *Bioorg & Med. Chem Lett.* **2009**, 19, 2546-2550.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari

- 82) Kotagiri, V. K., Sutrapu S., Reddy J. M., Rao C. P., Bollugoddu V., Bhattacharya A., Bandichhor R., *Org. Process. Res. Dev.* **2007**, *11*, 910-912.
- 83) Rinaldi-Carmona M., Barth. F., Héaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., martinez S., Maruani J., Néliat G., Caput D., Ferrara P., Soubrié P., Brelière J. C., Le Fur G., *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240-244.
- 84) Alekseeva O. O., Mahadevan A., Wiley J. L., Martin P. R., Razdan R. K., *Tetrahedron Lett.* **2005**, *12*, 2159-2161.
- 85) Barth F., Casellas P., Congy C., Martinez S., Rinaldi M., *PTC US* 5,462,960, 1995.
- 86) Rosa F. A., Machado P., Vargas P. S., Bonacorso H. G., Zanatta N., Martinis M. A. P., *Synlett* **2008**, 1673-1678.
- 87) Finn J., Mattia K., Morytko M., Ram S., Yang Y., Wu X., Mak E., Gallant P., Keith D., *Bioorg & Med. Chem Lett.* **2003**, *13*, 2231-2234.
- 88) Borowitz I. J., Parnesh H., Lord E., Yee K. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *19*, 6817-6822.
- 89) Laha J. K., Muthah C., Taniguchi M., McDowell B., Patszek M., Lindsey J. S, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4092-4102.
- 90) Raimondi M. V., Schillaci D., Petruso S., *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 1407-1471.
- 91) Trost B. M., Dong G., *Chem Eur. J.* **2009**, *15*, 6910-6919.

Autore: Marilena Pira

**Titolo: Progettazione e sintesi di nuovi antagonisti CB1 a struttura 5-eteroaril-1-(2',4'-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossammidica quali potenziali candidati per il trattamento dell'obesità.**

Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche – indirizzo di Scienze Farmaceutiche.

Università degli Studi di Sassari