



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE
XXVI CICLO

NUOVI PRINCIPI ATTIVI E RELATIVE
FORMULAZIONI PER LA TERAPIA DEL DOLORE
ED IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

Dottorando: Dott. Paolo Lazzari

Tutore: Professor Gérard Aimè Pinna

Direttore della Scuola: Professor Stefano Enzo

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 - NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEI CANNABINOIDI CON POTENZIALE ATTIVITA' ANALGESICA	3
1.1 Introduzione	3
1.1.1 Il dolore	3
1.1.2 Strategie farmacologiche per la terapia del dolore	4
1.1.3 Potenzialità terapeutiche dei cannabinoidi nella terapia del dolore	6
1.2 Nuovi agonisti dei recettori dei cannabinoidi CB₂	11
1.2.1 Sintesi	14
1.2.2 Affinità e selettività dei nuovi composti verso i recettori CB ₂	18
1.2.3 Attività intrinseca dei nuovi composti CB ₂	20
1.3 NESS10SM: un nuovo agonista dei recettori dei cannabinoidi CB₁	22
1.3.1 Sintesi	23
1.3.2 Valutazione dell'affinità e della selettività del composto per i recettori dei cannabinoidi CB ₁	24
1.3.3 Attività intrinseca del composto NESS10SM	25
1.4 Conclusioni	28
1.5 Referenze	29
CAPITOLO 2 - NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPPIOIDI DELTA	39
2.1 Introduzione	39
2.1.1 I recettori degli oppioidi	39
2.1.2 Analgesici oppioidi	40
2.1.3 Oppioidi delta selettivi	42
2.2 Sintesi	48

2.3 Affinità e selettività dei nuovi composti verso i recettori degli oppioidi <i>delta</i>	54
2.4 Attività intrinseca dei nuovi composti	56
2.5 Conclusioni	58
2.6 Referenze	59
CAPITOLO 3 - NESS002ie: UN NUOVO TIOLO FLUORURATO INIBITORE DELLE ENDOPEPTIDASI	66
3.1 Introduzione	66
3.2 Metodi	70
3.2.1 Sintesi dei composti	70
3.2.2 Valutazione in vitro dell'attività inibitoria verso differenti metallopeptidasi	71
3.2.3 Saggi in vivo per la valutazione dell'attività analgesica dei nuovi inibitori delle metallopeptidasi	74
3.3 Risultati	75
3.3.1 Test enzimatici	75
3.3.2 Test della formalina	76
3.4 Discussione	81
3.5 Conclusioni	83
3.6 Referenze	83
CAPITOLO 4 - MICROEMULSIONI PER LA VEICOLAZIONE IN ACQUA DI CANNABINOIDI: CARATTERIZZAZIONE DELLA MICROSTRUTTURA DI MICROEMULSIONI NONIONICHE CONTENENTI Δ^9-TETRAIDROCANNABINOLO	89
4.1 Introduzione	89
4.2 Materiali e Metodi	90
4.2.1 Materiali	90
4.2.2 Diagramma di fase	91
4.2.3 Reologia	91
4.2.4 Misure di conducibilità	91

4.2.5 Misure di <i>Dynamic Light Scattering</i>	92
4.2.6 Misure NMR	92
4.2.7 Esperimenti ¹ H NMR di <i>self-diffusion</i>	92
4.3 Risultati e Discussione	93
4.3.1 Diagramma di fase	93
4.3.2 Proprietà reologiche e di trasporto	93
4.3.3 Diffusione del tensioattivo	96
4.3.4 Impatto di Δ^9 -THC sulla diffusione del tensioattivo	97
4.4 Conclusioni	98
4.5 Referenze	99
CAPITOLO 5 - MICROEMULSIONI LIPIDICHE CONTENENTI	101
NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPIOIDI CON	
ATTIVITA' ANALGESICA	
5.1 Introduzione	101
5.2 Materiali e Metodi	104
5.2.1 Materiali	104
5.2.2 Definizione dell'attività intrinseca dei composti per i recettori degli oppioidi μ	106
5.2.3 Diagramma di fase	107
5.2.4 Preparazione e caratterizzazione di microemulsioni contenenti oppioidi	108
5.2.5 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e misure di Self-diffusion NMR	109
5.2.6 Attività analgesica	110
5.3 Risultati e Discussione	111
5.3.1 Attività intrinseca dei composti	111
5.3.2 Diagramma di fase	112
5.3.2 Caratterizzazione delle microemulsioni	113
5.3.3 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e misure di Self-diffusion	115
5.3.4 Attività analgesica	119

5.4 Conclusioni	122
5.5 Referenze	122
CAPITOLO 6 - NUOVI DERIVATI DELLE TUBULISINE	126
6.1 Introduzione	126
6.2 Sintesi dei composti	131
6.3 Valutazione in vitro della citotossicità dei nuovi derivati delle tubulisine	136
6.4 Valutazione preliminare del meccanismo d'azione dei nuovi derivati delle tubulisine	139
6.5 Saggi in vivo	141
6.6 Conclusioni	142
6.7 Referenze	143
CAPITOLO 7 - SINTESI E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI COMPOSTI OTTENUTI	145
7.1 Nuovi agonisti dei recettori dei cannabinoidi	145
7.1.1 Sintesi di nuovi composti agonisti dei recettori dei cannabinoidi CB ₂	145
7.1.2 Sintesi dell'agonista CB ₁ NESS10SM	152
7.2 Nuovi agonisti dei recettori degli oppioidi delta	154
7.3 NESS002ie: un nuovo tiolo fluorurato inibitore delle endopeptidasi	163
7.4 Agonisti dei recettori degli oppioidi con attività analgesica	166
7.5 Nuovi derivati delle tubulisine	168
7.5 Referenze	202
RINGRAZIAMENTI	204

INTRODUZIONE

Il dolore cronico differisce dal dolore acuto sia per la sua eziologia sia per la sua fisiopatologia, inoltre risulta refrattario a molte delle strategie farmacologiche ad oggi disponibili. L'impiego degli analgesici convenzionali per il trattamento di questa patologia non sempre costituisce un rimedio adeguato e spesso determina l'insorgenza di marcati effetti collaterali. Sussiste quindi la necessità di individuare nuove classi di farmaci che siano più efficaci nel controllo del dolore cronico e che inducano ridotti effetti collaterali. I composti ad azione cannabinoidergica hanno suscitato un crescente interesse negli ultimi anni per lo sviluppo di strategie farmacologiche innovative per il trattamento del dolore, con particolare riferimento al dolore cronico/infiammatorio e neuropatico. Nuovi derivati ad azione oppioidergica, caratterizzati da un meccanismo d'azione differente da quello della morfina, potrebbero rappresentare ulteriori valide strategie per il trattamento di questa patologia.

Le ricerche di base e cliniche svolte negli ultimi decenni hanno fornito numerosi importanti contributi allo sviluppo della chemioterapia antitumorale, tuttavia per molti tumori la terapia medica è tuttora di limitata efficacia. La prevenzione o la riduzione degli effetti collaterali e la possibilità di aggirare specifici meccanismi di resistenza innata o acquisita rappresentano due aspetti chiave per l'identificazione e lo sviluppo di nuovi principi attivi alla base di strategie chemoterapiche innovative e di maggiore efficacia per il trattamento dei tumori.

Allo scopo di contribuire alla definizione di nuove strategie farmacologiche in grado di rispondere alle esigenze sopra indicate, la presente ricerca è stata focalizzata verso (i) la sintesi di nuovi potenziali principi attivi e l'individuazione di nuove formulazioni liquide per la terapia del dolore, con particolare riferimento al dolore cronico, e (ii) l'implementazione di processi di sintesi totale per l'ottenimento di nuovi derivati delle tubulisine quali potenziali chemioterapici caratterizzati da elevata citotossicità.

Per quanto concerne l'individuazione di nuovi potenziali principi attivi con attività antinocicettiva, la ricerca è stata in particolare mirata allo sviluppo di nuove strategie di sintesi per l'ottenimento di (i) nuove classi di composti con affinità e selettività per i recettori dei cannabinoidi e degli oppioidi, (ii) nuovi inibitori delle zinco metallopeptidasi.

Considerando le difficoltà nell'ottenimento di formulati liquidi acquosi iniettabili contenenti principi attivi ad azione cannabinoidergica o oppioidergica con proprietà analgesiche, una parte della ricerca è stata inoltre orientata verso l'individuazione e la caratterizzazione di nuovi formulati acquosi ad elevata stabilità (microemulsioni), in grado di solubilizzare sia i nuovi composti ottenuti che analoghi di riferimento.

Le strategie di *Medicinal Chemistry* e formulative adottate sono state validate sia attraverso la determinazione del profilo farmacologico di base, sia mediante saggi specifici in grado di valutare le reali potenzialità terapeutiche dei composti sintetizzati e dei relativi formulati.

L'attività di ricerca, condotta nell'ambito della collaborazione tra il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari e le società PharmaNess Scarl e KemoTech Srl, ha riguardato in particolare:

- La sintesi di nuovi composti tricyclici condensati a struttura base pirazolica con affinità per i recettori dei cannabinoidi CB₂ e/o CB₁, caratterizzati da attività analgesica.
- L'ottenimento di nuovi agonisti dei recettori degli oppioidi *delta* con una struttura diazatricicloalcanica, attraverso procedure sintetiche esemplificate rispetto a quelle di analoghi composti, quali nuovi potenziali analgesici con ridotti effetti collaterali.
- La sintesi di un nuovo tiolo fluorurato inibitore delle zinco metallopeptidasi e la valutazione dell'attività analgesica del composto sintetizzato in un modello animale di dolore cronico.
- La caratterizzazione chimico-fisica della microstruttura del tensioattivo commerciale nonionico Solutol[®] HS15 in acqua e di relativi formulati a base di microemulsioni contenenti Δ⁹-tetraidrocannabinolo, quali sistemi modello per la veicolazione di cannabinoidi in mezzi acquosi.
- L'individuazione e la caratterizzazione di microemulsioni nonioniche contenenti nuovi oppioidi diazabicycloalcanici a struttura base omopiperazinic, aventi profilo recettoriale paragonabile a quello della morfina.
- La sintesi di nuovi derivati sintetici delle tubulisine naturali quali potenziali nuovi chemioterapici ad elevata citotossicità.
- L'individuazione di *lead compounds* con elevata citotossicità anche verso linee cellulari tumorali resistenti ai chemioterapici convenzionali.
- L'identificazione del meccanismo d'azione e la valutazione delle proprietà antitumorali dei nuovi derivati delle tubulisine in opportuni modelli animali tumorali.

CAPITOLO 1

NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEI CANNABINOIDI CON POTENZIALE ATTIVITA' ANALGESICA

1.1 Introduzione

1.1.1 Il dolore

Il dolore viene considerato il principale meccanismo di difesa dell'organismo. Questo segnale di allarme ha un ruolo fondamentale in quanto consente di individuare la presenza di stimoli pericolosi esterni e segnala l'instaurarsi di una condizione patologica.

In generale la percezione del dolore è considerata un fenomeno sensoriale composto da una componente percettiva, responsabile del trasporto del segnale al sistema nervoso centrale, e da una componente emozionale, correlata ad uno stato psichico che si fonda su percezioni spiacevoli collegate ad esperienze pregresse.

Sulla base della persistenza ed in relazione alle cause scatenanti, il dolore viene normalmente distinto in diverse forme. In relazione al tempo di persistenza, il dolore è in particolare differenziato tra dolore acuto e dolore cronico. In generale il dolore acuto è un meccanismo di difesa innescato da cause fisiche specifiche, ha breve durata e termina nel momento in cui la lesione viene risolta o l'agente nocicettivo viene allontanato. Il dolore cronico è invece un dolore persistente che dura più a lungo della lesione tissutale che lo causa. In base alla causa scatenante, il dolore viene invece definito:

- a. nocicettivo, quando è causato da uno stimolo termico, chimico o meccanico;
- b. neuropatico, quando è determinato da una lesione o da un malfunzionamento della trasmissione nervosa;
- c. infiammatorio, nel caso di un dolore spontaneo e di una ipersensibilità dovuta ad un danno tissutale o ad infiammazione;
- d. funzionale (non nocicettivo, e non neuropatico), quando può essere dovuto ad un aberrante funzionamento del sistema nervoso nell'elaborazione e nella risposta allo stimolo doloroso che si traduce in iperalgesia e allodinia;
- e. somatoforme o esistenziale, caratterizzato da una forte componente psicologica, quando si manifesta in assenza di cause rilevabili.

1.1.2 Strategie farmacologiche per la terapia del dolore

Il dolore rappresenta una delle principali patologie della popolazione mondiale. Dal punto di vista farmacologico, il dolore acuto non rappresenta un problema clinico rilevante in quanto questa patologia risponde adeguatamente al trattamento con farmaci convenzionali quali oppioidi e antiinfiammatori non steroidei (FANS). Il dolore cronico costituisce invece uno dei principali problemi sanitari a livello mondiale determinando gravi effetti sulla vita delle persone afflitte da questa patologia. Studi epidemiologici hanno evidenziato un'incidenza media del dolore cronico nella popolazione mondiale pari al 30% circa, con un incremento di casi fino anche a percentuali superiori al 50% nella popolazione al di sopra dei 65 anni.¹⁻⁴ A livello europeo, sulla base di una ricerca condotta nel 2003, il dolore cronico riguarda circa il 20% della popolazione, con una percentuale superiore alla media europea per quanto concerne l'Italia (26%).

L'impatto del dolore cronico sui pazienti e sui loro familiari è di notevole entità. E' inoltre da rilevare quanto questa patologia possa essere considerata la causa di altri disturbi quali ansia e depressione.⁵

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'interesse da parte della comunità mondiale nell'individuazione di strategie farmacologiche in grado di contrastare o alleviare la sintomatologia correlata al dolore cronico. Attualmente i farmaci maggiormente prescritti nella pratica clinica sono gli analgesici convenzionali quali FANS, oppioidi e anestetici locali. Altri farmaci sviluppati ed utilizzati per il trattamento di altre patologie, trovano tuttavia riscontro nella pratica clinica della terapia de dolore, come ad esempio gli antidepressivi triciclici, gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, gli antiepilettici, i composti adrenergici e gli antagonisti del recettore dell'NMDA.

I FANS mostrano un ampio spettro d'azione ed agiscono attraverso l'inibizione delle cicloossigenasi e, conseguentemente, inibendo la sintesi di modulatori di processi infiammatori quali le prostaglandine. I FANS sono farmaci di comprovata efficacia nel trattamento del dolore acuto e del dolore cronico di natura flogistica (ad es. artrite reumatoide, artrosi, dolori muscolo-scheletrici), ma la loro efficacia nella cura di altre forme di dolore cronico come il dolore neuropatico è risultata nulla o limitata. Sono inoltre ampiamente riconosciuti gli effetti collaterali indotti dall'uso dei FANS, quali quelli che si manifestano a livello gastrico, renale, polmonare e piastrinico.

Gli oppioidi sono ampiamente utilizzati per la terapia del dolore in pazienti oncologici e terminali, mentre la loro attività analgesica nel dolore cronico risulta spesso poco efficace.

L'effetto analgesico di questi composti è mediato dai recettori degli oppioidi espressi a livello del sistema nervoso centrale e nel midollo spinale. Il loro effetto determina l'iperpolarizzazione delle cellule neuronali, l'inibizione della conduzione nervosa e l'inibizione presinaptica della liberazione di neurotrasmettitori. Per assicurare un adeguato effetto analgesico, è spesso richiesta una dose elevata di oppioidi che determina allo stesso tempo insorgenza di importanti effetti indesiderati, i più importanti dei quali sono stipsi, sedazione e depressione respiratoria.

Gli anestetici locali quali la lidocaina sono utilizzati nella pratica clinica per il trattamento di specifiche forme di dolore, quale ad esempio la nevralgia post-erpetica.

Nonostante il meccanismo d'azione non sia ancora del tutto chiaro, nella pratica clinica per il trattamento cronico vengono utilizzati anche antidepressivi triciclici quali ad esempio l'Amitriptilina. La somministrazione di questi composti determina infatti un miglioramento della sintomatologia del dolore cronico. E' tuttavia da rilevare come l'uso degli antidepressivi triciclici sia correlato all'insorgenza di effetti collaterali importanti quali sedazione, offuscamento visivo, secchezza delle fauci.

Gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, come ad esempio citalopram, fluoxetina e sertralina, vengono utilizzati quali coadiuvanti nel trattamento delle conseguenze psicologiche correlate al dolore cronico che ne incrementano la percezione. Questi composti presentano in generale effetti collaterali ridotti rispetto agli antidepressivi triciclici, ma il loro uso determina in ogni caso sonnolenza, variazione del peso corporeo e disturbi della memoria.

Gli antiepilettici sia di prima (carbamazepina e valproato) che di seconda generazione (gabapentina e topiramato) trovano impiego nel trattamento di alcune forme di dolore cronico, come ad esempio la nevralgia del trigemino. La loro azione appare tuttavia limitata ad alcuni sottogruppi di pazienti, inoltre il loro uso determina effetti collaterali quali tossicità epatica e teratogenesi, oltre che altri effetti più lievi (ad es. cefalea, sonnolenza, aumento di peso).

Poiché il blocco della trasmissione adrenergica può intervenire ad alleviare i sintomi del dolore derivante dalla lesione di nervi periferici, l'uso di agonisti per i recettori adrenergici alfa 1 e alfa 2 costituisce una delle strategie perseguibili per il trattamento del dolore cronico. A questo scopo sono utilizzati ad esempio la clonidina e la fentolamina, la somministrazione delle quali determina comunque effetti indesiderati quali sonnolenza, stitichezza, ipotensione, bradicardia.

L'iperstimolazione del recettore NMDA è una delle cause principali che determinano sensitizzazione periferica a seguito dell'insorgenza di dolore neuropatico. Sulla base di questo presupposto, antagonisti del recettore NMDA come ketamina e, più recentemente, amantadina sono stati impiegati con successo nella terapia del dolore neuropatico. Anche a seguito del

trattamento con questi composti sono stati comunque individuati effetti collaterali significativi quali problemi e disturbi comportamentali, motori, di apprendimento e di memoria.

1.1.3 Potenzialità terapeutiche dei cannabinoidi nella terapia del dolore

In base ai limiti evidenziati dalle differenti strategie farmacologiche ad oggi impiegate nel trattamento delle varie forme di dolore cronico ed in relazione ai numerosi ed importanti effetti collaterali ricollegabili all'uso delle classi di farmaci riportate al paragrafo precedente, risulta evidente la necessità di individuare e sviluppare nuove entità chimiche che possano contrastare questa patologia invalidante.

Tra le possibili nuove strategie farmacologiche per il trattamento del dolore cronico, negli ultimi anni ha riscontrato un crescente interesse quella basata sull'uso di composti ad azione cannabinoidergica.⁶⁻¹¹ Nonostante il potenziale terapeutico della *Cannabis sativa L.* fosse noto dall'antichità, solo recentemente, a seguito dell'individuazione del sistema cannabinoidergico endogeno (ECS) e dei recettori dei cannabinoidi CB₁ e CB₂ in particolare, è stato possibile adottare opportune strategie al fine di (i) comprendere i meccanismi d'azione dei cannabinoidi naturali, (ii) verificare e validare le potenzialità terapeutiche di detti composti, (iii) individuare nuovi composti ad azione cannabinoidergica che potessero mimare o migliorare il profilo farmacologico dei corrispondenti derivati naturali.

I recettori dei cannabinoidi afferiscono al sistema endogeno dei cannabinoidi del quale fanno parte anche i ligandi endogeni per questi recettori (endocannabinoidi) anandamide (N-arachidonoiletanolamina) e 2-arachidonoilglicerolo, ed i corrispondenti *pathways* metabolici per la loro sintesi, degradazione e ri-uptake (nel caso di anandamide).¹²⁻¹⁶ I recettori dei cannabinoidi, individuati per la prima volta negli anni novanta, si differenziano in due sottotipi recettoriali, i recettori CB₁ e i recettori CB₂.¹³ Questi recettori appartengono all'ampia classe della famiglia *rhodospin-like* di recettori accoppiati alle proteine G di membrana (GPCRs) che controllano numerosi *pathways* di trasduzione di segnali intracellulari multipli. Negli umani i due sottotipi recettoriali presentano complessivamente circa un 40% di omologia, che raggiunge circa il 70% nelle sequenze amminoacidiche dei domini di transmembrana.¹⁷ I recettori CB₁ presentano un elevato grado di omologia tra diverse specie animali; in contrasto i recettori CB₂ divergono significativamente tra la specie umana e gli altri animali, come nel caso dei roditori. Ad esempio è stata riportata un'omologia della sequenza amminoacidica tra ratti e topi del 93%, mentre quella tra ratti e umani è pari a circa l'80%.¹⁸

I recettori CB₁ sono espressi sia nel sistema nervoso centrale che in differenti organi e tessuti. Nel cervello sono principalmente espressi nell'ippocampo, nelle regioni corticali, nel cervelletto e all'interno dei gangli basali.¹⁹⁻²⁰ A livello periferico, i recettori CB₁ sono stati individuati nell'occhio, nell'intestino, nel pancreas, nel fegato, nei testicoli, nel vaso deferente, nella vescica, nel tessuto adiposo, nella tiroide.²¹⁻²⁷ Questi recettori sono coinvolti nella regolazione dell'appetito e dell'omeostasi energetica, così come in altri processi fisiologici quali ad esempio la motilità intestinale, il dolore, l'attività locomotoria, l'apprendimento e la memoria.²⁸ Considerando l'ampia distribuzione dei recettori CB₁ ed il loro coinvolgimento in diversi processi fisiologici, i composti in grado di interagire con questa classe di sottotipi recettoriali sono stati proposti quali potenziali candidati per nuove strategie farmacologiche per il trattamento e la cura di numerose patologie e disturbi quali ad esempio: obesità,²⁹⁻³⁵ sindrome metabolica,³⁶ dislipidemia,³⁶ steatosi epatica associata all'obesità,³⁷ fibrosi del fegato,³⁸ dolore,³⁹ glaucoma,⁴⁰ infiammazione,⁴¹ dipendenza da droghe e alcool,⁴²⁻⁴⁴ tabagismo,⁴² vomito e nausea,⁴⁵⁻⁴⁶ malattie neurodegenerative e disturbi ad esse correlate (ad esempio malattie di Parkinson, Alzheimer, Huntington),⁴⁷⁻⁴⁸ melanoma,⁴⁹ disfunzioni sessuali,⁵⁰ infarto e malattie cardiovascolari.⁵¹

A differenza dei recettori CB₁, i recettori CB₂ sono prevalentemente espressi in organi periferici. Questi sottotipi recettoriali dei cannabinoidi sono stati in particolare individuati nelle tonsille, nella milza, nel pancreas e nel timo.²¹⁻²³ I recettori CB₂ sono inoltre espressi nei terminali dei nervi periferici, nelle cellule dei tumori della pelle, in varie cellule infiammatorie così come in molte tipologie di cellule coinvolte nel sistema immunitario come macrofagi, monociti, cellule del midollo osseo, cellule T4 e T8, leucociti polimorfonucleati, in particolare cellule chiamate "natural killer" e linfociti B.^{28,52-58} I recettori CB₂ sono coinvolti nella regolazione del sistema immunitario sul quale intervengono attraverso effetti sia immunosoppressori che immunostimolanti. In particolare, mostrano un ruolo rilevante nelle fasi iniziali del processo di maturazione delle cellule del sistema immunitario. In modelli murini, è stato inoltre evidenziato un effetto inibitorio significativo da parte dei recettori CB₂ sulla crescita dei linfomi, così come di cellule leucemiche.⁵⁹ E' da rilevare come negli ultimi anni sia stata evidenziata la presenza dei recettori CB₂ anche a livello del sistema nervoso centrale,⁶⁰⁻⁶⁵ soprattutto in relazione allo sviluppo di alcune patologie e disturbi correlati a stati infiammatori. L'espressione di recettori CB₂ è stata infatti rilevata nelle cellule microgliali di ratto,⁶⁰ nella retina di ratti adulti,⁶¹ nelle cellule microgliali associate alle placche neuritiche nei cervelli di pazienti con malattia di Alzheimer.⁶³

I composti in grado di interagire con i recettori CB₂ possono pertanto essere potenzialmente impiegati nel trattamento di malattie nelle quali sono implicate cellule del sistema immunitario o disordini immunitari, come ad esempio l'artrite reumatoide e l'uveite.⁶⁶⁻⁶⁷ La modulazione dei recettori CB₂ risulta altresì importante nel trattamento di altre patologie, come ad esempio l'osteoporosi, l'ischemia renale, il dolore neuropatico, il dolore cronico, gli stati infiammatori, sclerosi laterale amiotropica, malattie neurodegenerative come la malattia di Huntington.^{22,68-73} Alla luce delle evidenti potenzialità terapeutiche dei composti con affinità per i recettori CB₁ e/o CB₂, sono stati condotti negli ultimi anni anche studi clinici mirati alla validazione dei risultati ottenuti nell'ambito dei modelli animali e all'individuazione di nuove strategie farmacologiche basate su queste classi di composti.

Il primo caso di composto cannabinoide di sintesi sviluppato in clinica fino al posizionamento nel mercato farmaceutico, è rappresentato da rimonabant (Acomplia[®]). Questo composto (Figura 1), antagonista/agonista inverso dei recettori CB₁, è stato in particolare sviluppato per il trattamento dell'obesità e per il miglioramento del profilo plasmatico di fattori di rischio cardiovascolare.⁷⁴⁻⁷⁵ Il farmaco è stato tuttavia ritirato dall'EMA a pochi mesi dall'immissione sul mercato europeo a seguito della segnalazione di importanti effetti collaterali e, soprattutto, di alcuni casi di suicidio di pazienti sotto trattamento farmacologico con Acomplia[®].⁷⁶

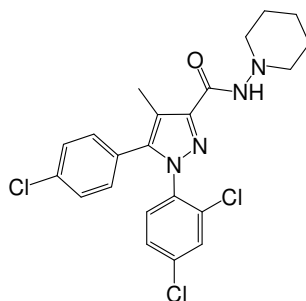


Figura 1. Formula di struttura del composto CB₁ antagonista/agonista inverso rimonabant (Acomplia[®]).

Lo sviluppo di nuovi antagonisti dei recettori dei cannabinoidi CB₁ è stato pesantemente e negativamente influenzato negli ultimi anni dalle vicende legate a rimonabant e solo recentemente ha avuto nuovi impulsi. Sono state infatti definite al riguardo nuove strategie basate principalmente sull'individuazione di antagonisti neutri dei recettori CB₁ o di antagonisti CB₁ incapaci di oltrepassare la barriera emato-encefalica e quindi in grado di agire selettivamente sui recettori CB₁ periferici.⁷⁷⁻⁸⁰

Relativamente allo sviluppo di agonisti sintetici dei recettori dei cannabinoidi, la cui implicazione farmacologica principale riguarda il trattamento del dolore e dell'inflammatione, l'interesse è stato rivolto verso la sintesi di differenti classi di composti, con particolare riferimento a (Figura 2):

- derivati basati sulla struttura base benzopirranica di Δ^9 -THC;
- cannabinoli biciclici afferenti alla classe del composto CP-55,940;
- indoli, pirroli e indeni, correlati ad esempio alla struttura del composto WIN55,212-2;
- eicosanoidi riferibili alla struttura dell'endocannabinoide anandamide.

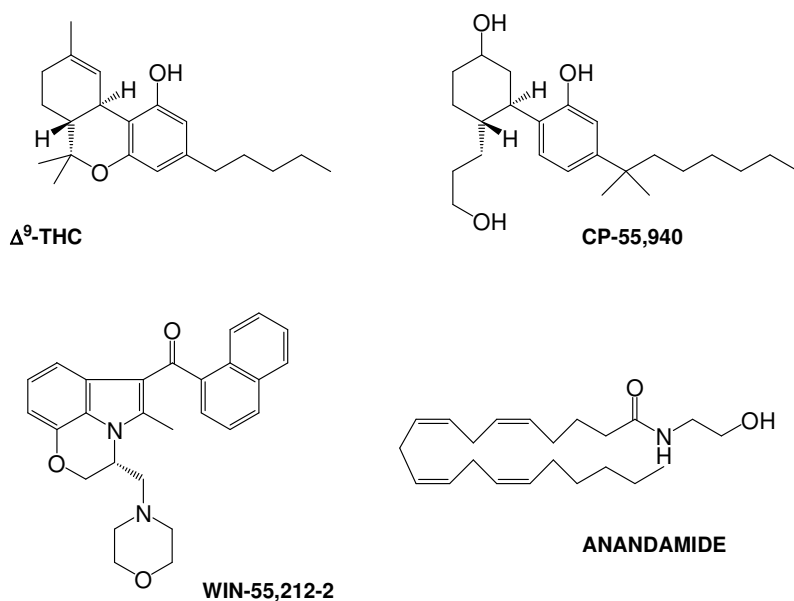


Figura 2. Formula di struttura dei composti cannabinoidergici Δ^9 -tetraidrocannabinolo, CP-55,940, WIN-55,212-2, Anandamide.

In relazione ai potenziali effetti psicotropi e ad altri disturbi associati ad un'azione centrale indotti dalla somministrazione di agonisti dei recettori CB_1 (ad es. distorsione della percezione, effetto sedativo, ansia, perdita di coordinazione motoria), l'interesse è stato indirizzato negli ultimi anni verso lo sviluppo di agonisti dei recettori CB_2 . Studi preclinici hanno infatti dimostrato che composti con affinità e selettività per i recettori CB_2 sono in grado di determinare effetti farmacologici positivi in differenti modelli animali di diverse patologie quali disturbi del sistema immunitario e malattie correlate a stati infiammatori, oltre che nel trattamento del dolore cronico e neuropatico.⁷¹⁻⁷² Studi più recenti, seppur ancora allo stadio

preliminare, hanno inoltre evidenziato le potenzialità terapeutiche di questi composti anche nel trattamento dell'osteoporosi e di alcune forme tumorali.^{70,81}

Relativamente alla terapia del dolore, gli agonisti sintetici CB₂ selettivi maggiormente studiati a livello preclinico risultano essere i composti **HU308** e **JWH-133**, mimetici di Δ^9 -THC, e gli indoli **AM1241** e **GW405833** (Figura 3).^{7,82-85} La valutazione dei composti indicati ha permesso in particolare di evidenziarne le proprietà antiinfiammatorie e antiiperalgesiche in modelli animali di dolore cronico/infiammatorio, oltre che le potenzialità terapeutiche in modelli animali di dolore neuropatico. E' inoltre da rilevare come nelle dosi terapeutiche utilizzate, nessuno dei composti abbia evidenziato effetti indesiderati correlati all'attivazione di recettori dei cannabinoidi espressi a livello del sistema nervoso centrale quali ad esempio catalessia, ipotermia, ipomotilità.

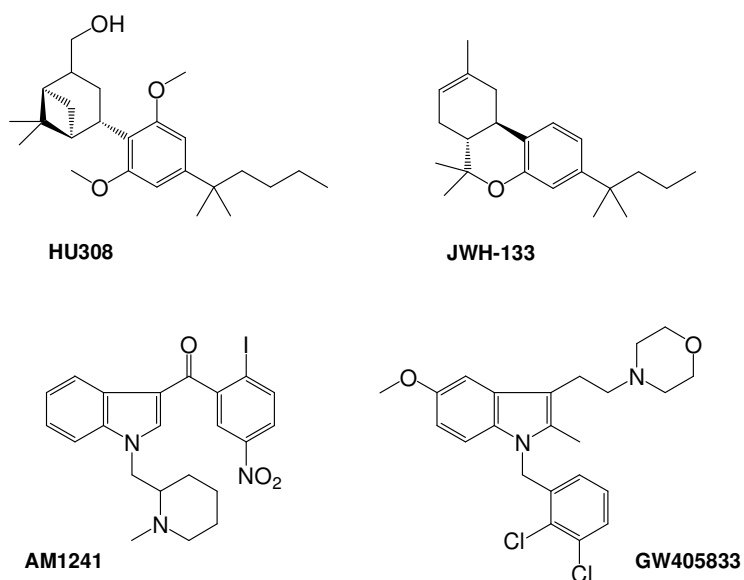


Figura 3. Formula di struttura degli agonisti CB₂ **HU308**, **JWH-133**, **AM1241**, e **GW405833**.

Gli studi condotti hanno inoltre permesso di individuare più recentemente un nuovo agonista selettivo CB₂, il composto **GW-842166X** (Figura 4).⁸⁶ Detto composto è stato positivamente valutato nella fase clinica II in pazienti affetti da osteoartrite oltre che nel trattamento del dolore a seguito dell'estrazione del terzo molare.

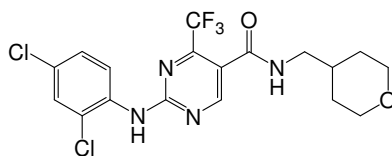


Figura 4. Formula di struttura dell'agonista CB₂ **GW-842166X**.

E' tuttavia da rilevare come attualmente solo prodotti contenenti cannabinoidi naturali o corrispondenti composti sintetici abbiano trovato riscontro nella pratica clinica. Farmaci basati su questa classe di composti sono stati registrati come Cesamet[®] (nabilone), Marinol[®] (dronabinolo, Δ^9 -THC), e Sativex[®], una miscela di Δ^9 -THC e cannabidiolo (CBD).⁷⁵ Cesamet[®] è prescritto negli USA come farmaco anti-emetico nel trattamento di nausea e vomito indotti dalla chemioterapia. Il farmaco è commercialmente disponibile per la somministrazione orale in forma di capsule di gelatina. Marinol[®] è commercializzato nella stessa forma farmaceutica e registrato per la stessa applicazione di Cesamet[®], inoltre è utilizzato per indurre appetito in pazienti affetti da AIDS.

Nell'ambito della terapia del dolore, recentemente è stato introdotto in Canada, negli USA e, più recentemente in alcuni paesi europei, il prodotto commerciale Sativex[®]. Il farmaco, nella forma di spray per somministrazione sub-linguale, è prescritto per il trattamento di dolore cronico in pazienti con sclerosi multipla ed è impiegato anche come coadiuvante nella terapia del dolore in malati terminali di cancro.⁸⁷ Studi clinici hanno dimostrato che Sativex[®] non è solo in grado di contrastare il dolore ma presenta ulteriori benefici relativamente alla qualità del sonno e ai livelli di infiammazione. E' inoltre da rilevare come il farmaco sia risultato efficace anche in pazienti resistenti alle terapie convenzionali.

1.2 Nuovi agonisti dei recettori dei cannabinoidi CB₂

A partire dal derivato diarilpirazolico CB₂ antagonista SR144528 (Figura 5),⁸⁸ sviluppato da Sanofi Synthelabo, ora Sanofi Aventis, quale derivato del composto CB₁ antagonista/agonista inverso rimonabant, sono stati sintetizzati in passato analoghi con scaffold tricyclico planare (Serie I) determinato dalla ciclizzazione tra la posizione 4 dell'anello pirazolico e la posizione 2 del fenile presente quale sostituente alla posizione 5 del pirazolo (Figura 5).⁸⁹⁻⁹⁰ I composti della Serie I avevano mostrato elevata affinità e selettività per i recettori CB₂ e, a differenza del composto di riferimento SR144528, avevano mostrato un profilo farmacologico compatibile

con quello di CB₂ agonisti.⁹⁰ Un *lead* della Serie I, il composto 1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-N-cicloesilamin-1,4-diidroindeno[1,2-c]pirazol-3-carbossiamide, denominato NESS400, è stato utilizzato con successo in un modello murino di dolore neuropatico basato sulla legatura del nervo sciatico.⁹¹

Allo scopo di ampliare lo spettro di composti triciclici condensati con affinità e selettività per i recettori CB₂ e con potenziale applicazione nel trattamento del dolore neuropatico, oltre che del dolore cronico/infiammatorio, di stati infiammatori e di altre patologie e disturbi correlati ai suddetti sottotipi recettoriali, recentemente è stato valutato il bioisosterismo dei composti della **Serie I** con analoghi derivati recanti un anello tiofenico in sostituzione di quello fenilico nella struttura triciclica planare (**Serie II**) (Figura 5).⁹²

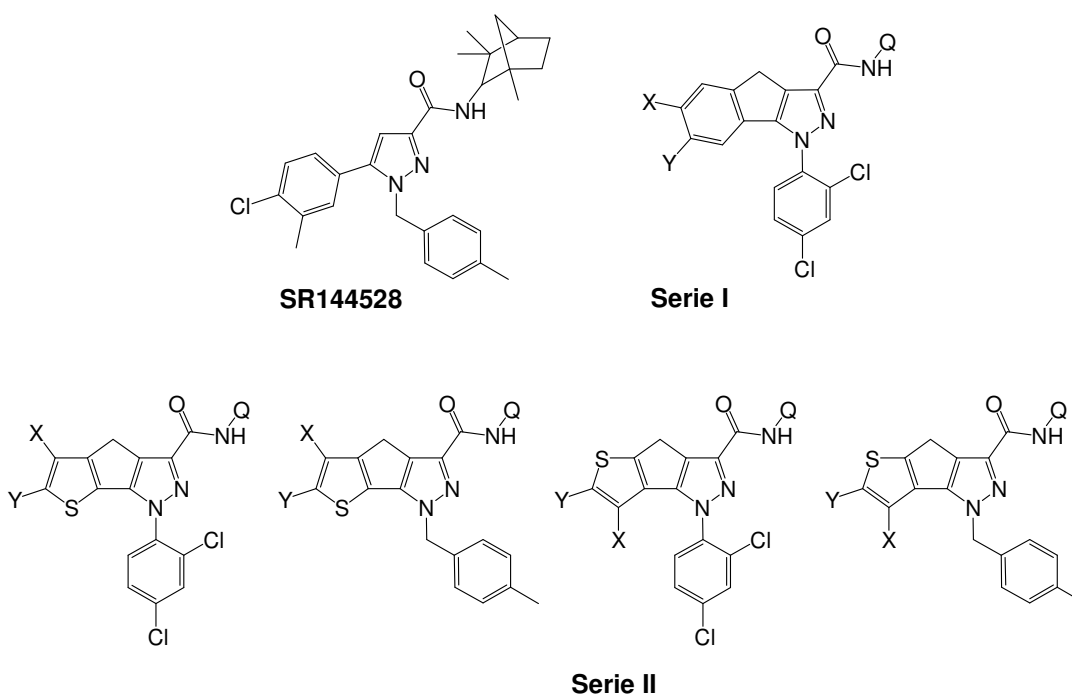


Figura 5. Formule di struttura di composti pirazolici con affinità e selettività per i recettori CB₂.

In analogia con i derivati della **Serie I**, composti della **Serie II** hanno mostrato elevata affinità per i recettori CB₂ e, in funzione del sostituente carbossiammidico alla posizione 3 del pirazolo, hanno anche evidenziato una significativa selettività per i suddetti recettori. Inoltre, anche i composti della **Serie II** hanno mostrato attività CB₂ agonista. I composti **NESS070C5** e **NESS197C5** (Figura 6), caratterizzati da affinità per i recettori CB₂ e CB₁, espressa in termini

di K_i , pari rispettivamente a 15,6 nM e 1166,0 nM nel caso di **NESS070C5**, e a 2,9 nM e 12,5 nM nel caso di **NESS197C5**, sono stati individuati quali potenziali *leads* della **Serie II**.

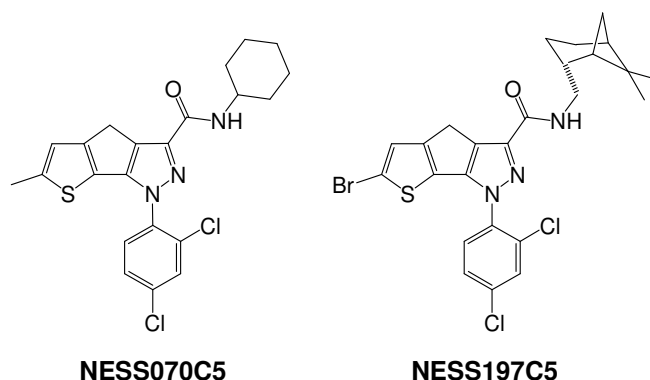


Figura 6. Formule di struttura di composti pirazolici triciclici condensati NESS070C5 e NESS197C5 con affinità per i recettori CB₂.

Allo scopo di ampliare lo studio struttura/attività di composti cannabinoidegici a struttura base triciclica condensata con anello centrale a cinque atomi di carbonio (**Serie II**), nell'ambito di questa ricerca si è provveduto alla sintesi di nuovi derivati (Figura 7) attraverso:

- l'introduzione di una catena alchilica in sostituzione dell'anello 2,4-diclorofenilico o *p*-metil-benzilico nella posizione del pirazolo nei composti della **Serie II**, con l'ottenimento del composto ***N*-Mirtanil-6-bromo-1-pentil-1,4-diidro-tieno [3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide**, denominato **NESS207C5**;
- la sostituzione dell'alogeno sull'anello tiofenico con un gruppo maggiormente ingombrante ed elettrone ricco come quello fenilico (***N*-Mirtanil-6-fenil-1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5] ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide**, **NESS209C5**);
- la modifica del gruppo carbossamidico in posizione 3 dell'anello pirazolico con un gruppo chetonico che è stato successivamente ridotto ad alcol, con l'ottenimento rispettivamente dei nuovi derivati **1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-3-(1-osso-2-cicloesilet-1-il)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5] ciclopenta[1,2-*c*]pirazolo** (**CB139S**) e **1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-3-(1-idrossi-2-cicloesilet-1-il)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5] ciclopenta[1,2-*c*]pirazolo** (**CB140S**).

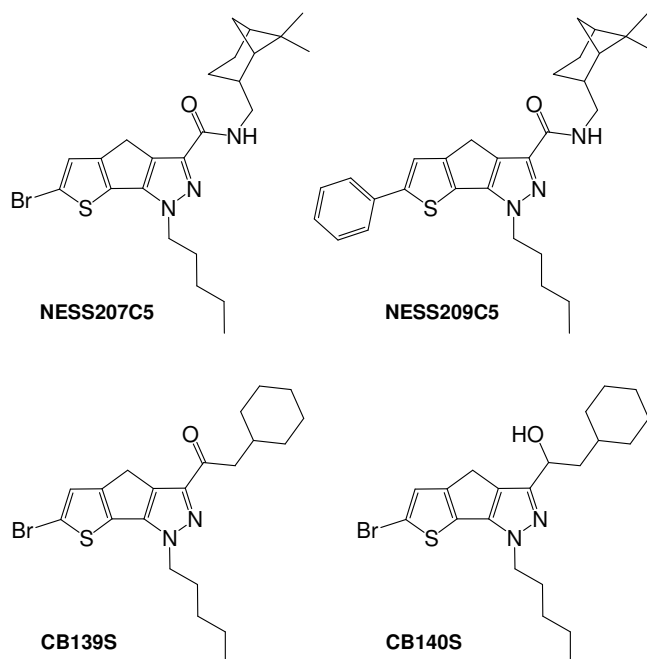


Figura 7. Formule di struttura dei nuovi composti triciclici condensati.

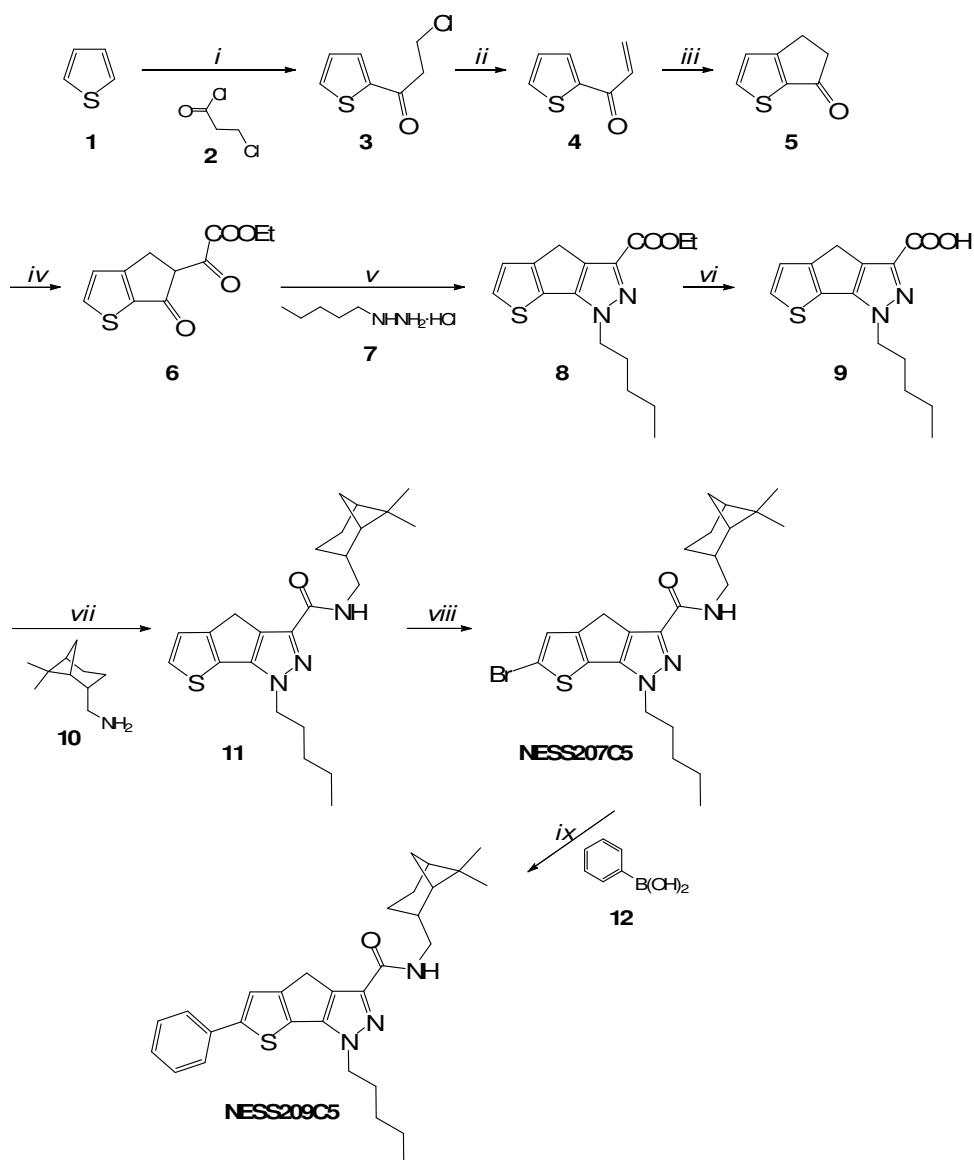
1.2.1 Sintesi

La sequenza sintetica utilizzata per la preparazione dei derivati triciclici **NESS207C5** e **NESS209C5** è mostrata nello Schema 1.

Il tiofene (**1**) è stato inizialmente acilato a cloropropioniltiofene **3** che, per trattamento con Et_3N e successiva ciclizzazione dell'enone **4**, ha fornito il chetone biciclico **5**. La reazione di condensazione di **5** con dietilossalato ed il riscaldamento del dichetoestere **6** così ottenuto con la pentilidrazina cloridrato **7** in acido acetico a refluxo ha consentito l'ottenimento del composto pirazolico triciclico **8**.

L'idrolisi basica di **8**, seguita dalla reazione dell'acido attivato **9** con (-)-*cis*-mirtanilammina (**10**), ha portato alla carbossammide **11**.

Il composto **NESS207C5** è stato ottenuto da **11**, utilizzando *N*-bromosuccinimide in acetonitrile a temperatura ambiente. Infine, la condensazione del composto **NESS207C5** con l'acido fenilboronico (**12**) nelle condizioni di Suzuki-Miyaura ha permesso di preparare il composto **NESS209C5**.

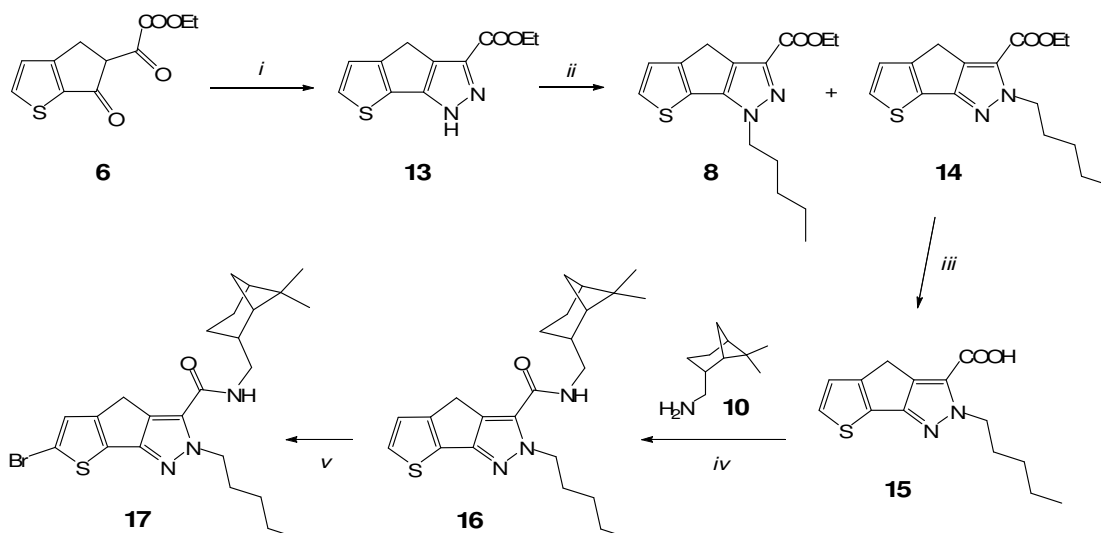


Schema 1. Reagenti e condizioni: *i)* AlCl_3 , CH_2Cl_2 , T.amb., 4 h; *ii)* Et_3N , Et_2O , T.amb., 48 h; *iii)* H_2SO_4 , DCE, 80°C , 75 min; *iv)* Na, EtOCOCOOEt , EtOH , T.amb., 20 h; *v)* AcOH , 115°C , 14 h; *vi)* KOH , MeOH , 65°C , 2 h; *vii)* EDC, HOBT, CH_2Cl_2 , T.amb., 14 h; *viii)* NBS, CH_3CN , T.amb., 14 h; *ix)* $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{DME}/\text{H}_2\text{O}$, 90°C , 18 h.

L'estere triciclico **8** è stato anche preparato seguendo una via sintetica alternativa a quella descritta nello Schema 1. Questa seconda via ha consentito di isolare nel passaggio chiave l'estere **8** ed il suo isomero **14** con la catena pentilica in posizione 2 dell'anello pirazolico della struttura triciclica (si veda Schema 2).

La reazione di **6** con idrazina idrata in etanolo a refluxo ha portato al composto pirazolico triciclico **13**. L'alchilazione di quest'ultimo con 1-bromopentano in dimetilformammide a

temperatura ambiente ha permesso di ottenere dalla miscela di reazione i due isomeri **8** e **14**. L'idrolisi di **14** e la reazione dell'acido ottenuto **15** con (-)-*cis*-mirtanilammina (**10**) ha condotto all'ammide **16**. Infine, il bromo derivato **17** è stato preparato per bromurazione di **16** con NBS in acetonitrile a temperatura ambiente.

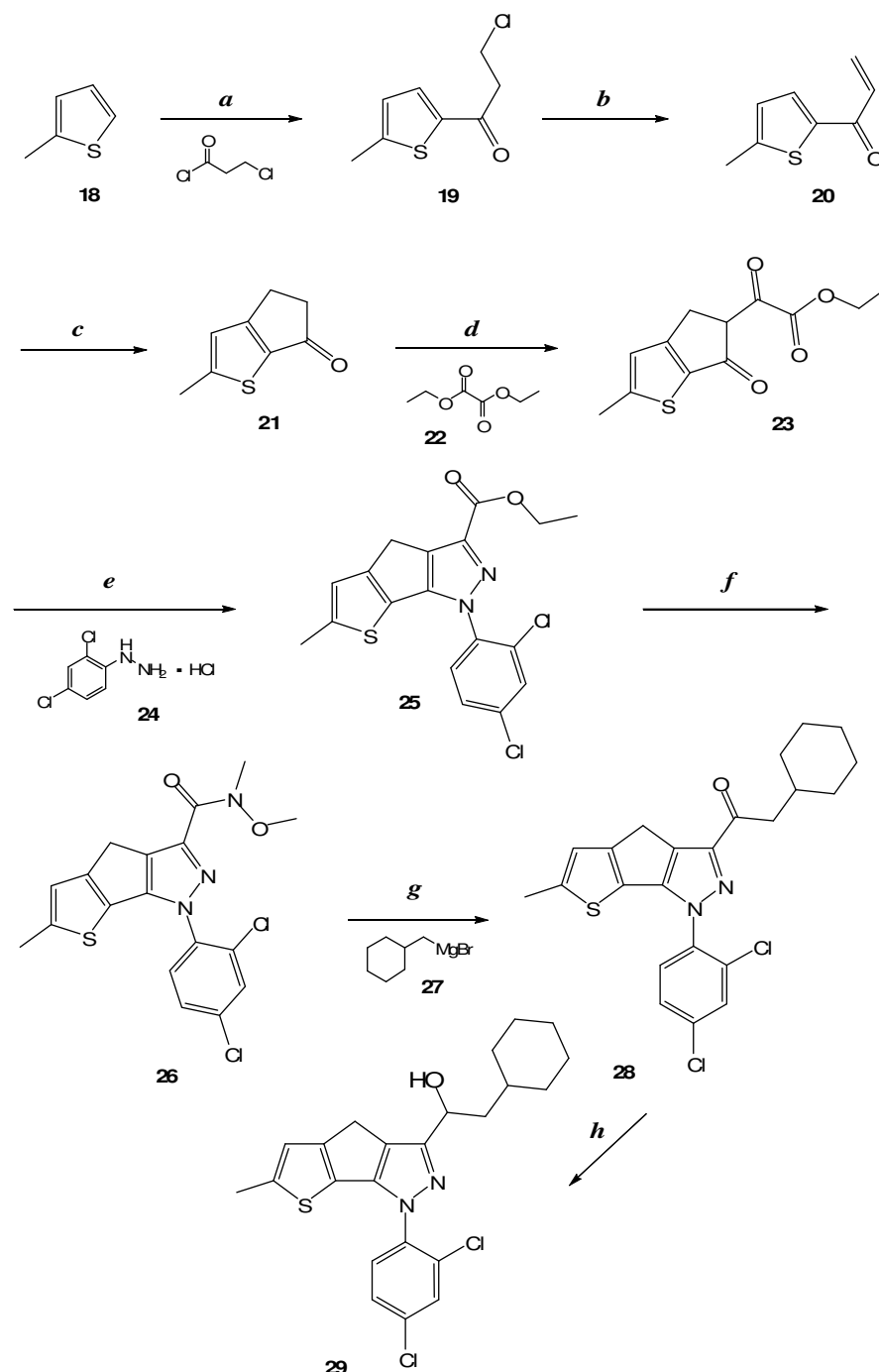


Schema 2. Reagenti e condizioni: *i*) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 80°C , 5 h; *ii*) 1-bromopentano, K_2CO_3 , DMF, T.amb., 14 h; *iii*) KOH, MeOH, 65°C , 14 h; *iv*) EDC, HOBt, CH_2Cl_2 , T.amb., 14 h; *v*) NBS, CH_3CN , T.amb., 14 h.

Allo scopo di modificare con un gruppo chetonico e ossidrilico il gruppo carbossiammidico in posizione 3 dell'anello pirazolico caratterizzante i nuovi composti sopra riportati, così come gran parte dei cannabinoidi tricyclici condensati riportati nella letteratura di riferimento, si è proceduto secondo lo Schema 3.

La via sintetica seguita per l'ottenimento dei composti **28** e **29**, denominati rispettivamente **139CBS** e **140CBS**, ha previsto 2-metiltiofene (**18**) quale materiale di partenza. In analogia con quanto riportato nello Schema 1, il composto è stato acilato con 3-cloropropionilcloruro, secondo Friedel-Crafts, con ottenimento di **19**. Il cloro chetone **19** è stato quindi deidroalogenato per azione della trietilammina in etere etilico per fornire l'enone **20**. Il chetone biciclico **21** è stato ottenuto trattando il chetone insaturo con acido solforico a refluxo in 1,2-dicloroetano. Il composto **21**, trattato con sodio metallico in EtOH assoluto e dietilossalato (**22**), ha fornito il prodotto di condensazione di Claisen, il dichetoestere **23** che, per reazione con 2,4-diclorofenilidrazina cloridrato (**24**) ha permesso di recuperare il derivato tricyclico **25**. Dalla

reazione di **25** con trimetilalluminio e dimetilidrossilammina cloridrata è stata ottenuta l'ammide di Weinreb **26** che, reagendo a sua volta con cicloesilmethylmagnesiobromuro (**27**) in THF a temperatura ambiente, ha portato all'ottenimento del chetone **28**. Infine l'alcol **29** è stato sintetizzato per riduzione del chetone **28** con NaBH₄ in metanolo a temperatura ambiente.



Schema 3. Reagenti e condizioni: a) AlCl₃, CH₂Cl₂, 25°C, 14 h; b) Et₃N, Et₂O, 25°C, 40 h; c) H₂SO₄, DCE, 80°C, 1 h; d) Na, EtOH, 25°C, 14 h; e) CH₃COOH, 70°C, 16 h; f) Me₃Al, CH₃ONHCH₃, CH₂Cl₂, T. amb., 4h; g) THF, T. amb., 24h; h) NaBH₄, MeOH, T. amb., 2 h.

1.2.2 Affinità e selettività dei nuovi composti verso i recettori CB₂

L'affinità dei composti sintetizzati **NESS207C5**, **NESS209C5**, **139CBS** e **140CBS** verso i recettori dei cannabinoidi CB₁ e CB₂ è stata determinata tramite *radioreceptor binding assays*. I saggi sono stati condotti utilizzando ³H-CP55,940 quale ligando radiomarcato, solubilizzando i composti in DMSO. Le membrane proteiche per i saggi relativi a CB₁ e CB₂ sono state ottenute a partire rispettivamente dal cervello e dalla milza di topo. I valori sperimentali di IC₅₀, ottenuti tramite il programma Graph Pad Prism analizzando con una regressione non lineare le curve sigmoidi generate dai dati sperimentali, sono stati trasformati in K_i utilizzando l'equazione di Cheng-Prusoff.⁹³

Gli esperimenti di *binding* recettoriale sono stati in particolare condotti secondo la procedura riportata nella letteratura di riferimento, partendo dagli organi prelevati da topi maschi CD1.⁹⁰ I tessuti sono stati omogenati a 4°C in 20 vol. (peso/volume) di soluzione tampone TME (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3,0 mM MgCl₂; pH 7,4). Gli omogenati sono stati centrifugati a 1.086 x g per 10 minuti a 4 °C ed i surnatanti sono stati ulteriormente centrifugati a 45.000 x g per 30 minuti. Dopo aver determinato il contenuto proteico dei pellets tramite test di Bradford, si è proceduto con l'effettuazione dei saggi di *binding*. Le membrane (30-80 µg di proteine) sono state incubate con 0,5-1,0 nM di [³H]-CP-55,940 per un'ora a 30°C in un volume finale di 0,5 ml di soluzione tampone TME contenente 5 mg/mL di siero di bovino privo di acidi grassi. Il *binding* non specifico è stato valutato in presenza di CP-55,940 1,0 µM. La reazione è stata bloccata attraverso rapida filtrazione attraverso filtri Whatman (filtri GF/C pretrattati con 0,5% polietilenimina PEI), utilizzando un sistema automatizzato di filtrazione Brandell per 36 campioni. I filtri sono stati lavati cinque volte a 4°C con 4 mL del tampone Tris HCl (pH 7,4) contenente 1,0 mg/mL di BSA. La radioattività legata ai filtri è stata misurata tramite un opportuno *counter* (Trisarb 2900, Packard, Meridien, USA) con 4 mL di fluido di scintillazione (Ultima Gold MV, Packard).

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati ottenuti sono stati confermati attraverso l'effettuazione di cinque prove sperimentali indipendenti.

I risultati di affinità, espressi come valore medio di K_i ±SEM, sono riportati in Tabella 1. Nella stessa tabella è stata riportata anche la selettività CB₂ verso CB₁ dei composti, calcolata dal rapporto tra K_i CB₂ e K_i CB₁. I composti sintetizzati sono stati confrontati con il composto cannabinoidergico CB₂/CB₁ di riferimento WIN55,212-2. Anche se di particolare interesse la valutazione dell'effetto dello spostamento della catena alchilica dalla posizione 1 del pirazolo

di **NESS207C5** alla posizione 2 dell'isomero **17**, al momento non è stato possibile determinare l'affinità di **17**. L'affinità e la selettività di detto composto per i recettori dei cannabinoidi saranno comunque determinati a valle della presente ricerca.

Tabella 1: Affinità e selettività dei composti verso i recettori dei cannabinoidi CB₂ e CB₁.

Composto	Affinità K _i (nM)		Selettività CB ₂ / CB ₁
	CB ₂	CB ₁	
NESS207C5	3,4±0,84	5,2±1,0	1:1,53
NESS209C5	91,5±18,4	73,3±13,6	1:0,80
139CBS	5,4±1,4	720±139	1:133
140CBS	206,7±35	> 5000	n.d.
WIN55,212-2	1,8±0,60	2,2±0,8	1:1,22

La sostituzione del gruppo 2,4-diclorofenilico del composto di riferimento **NESS197C5** con una catena pentilica nella posizione 1 dell'anello pirazolico ha garantito elevata affinità sia per i recettori CB₂ che per i recettori CB₁. A differenza di quanto riscontrato in composti omologhi di rimonabant e di corrispondenti bioisosteri tiofenici in cui l'introduzione di un anello aromatico in sostituzione dell'alogeno rispettivamente sul fenile e sul tiofene in posizione 5 del pirazolo, aveva comportato un significativo incremento dell'affinità verso i recettori CB₁, la sostituzione dell'atomo di bromo nel composto **NESS207C5** con un fenile a dare il composto **NESS209C5**, ha indotto una riduzione di affinità per i recettori CB₁, con un incremento di un ordine di grandezza del valore di K_i. La modifica adottata ha inoltre comportato una riduzione di analoga entità anche per l'affinità verso i recettori CB₂.

I valori di K_i e della selettività CB₂/CB₁ determinati per il composto chetonico **139CBS** sono risultati paragonabili a quelli di analoghi composti carbossiammidici. Rispetto all'omologo carbossiammidico **NESS070C5** (K_i CB₂ = 15,6 nM), **139CBS** ha evidenziato comunque un'affinità per i recettori CB₂ tre volte superiore. La riduzione del gruppo chetonico ad alcol (composto **140CBS**) ha invece indotto una significativa diminuzione dell'affinità sia per i recettori CB₂ che CB₁.

Il profilo recettoriale di **NESS207C5** è risultato comparabile a quello di **WIN55,212-2**. Rispetto al composto cannabinoidergico di riferimento, **139CBS** ha invece evidenziato affinità analoga per i recettori CB₂, ma maggiore selettività per questa tipologia recettoriale dei cannabinoidi.

1.2.3 Attività intrinseca dei nuovi composti CB₂

La valutazione dell'attività intrinseca dei composti sintetizzati e caratterizzati dalla migliore affinità per i recettori CB₂ è stata condotta attraverso un test in vitro basato sull'uso di cellule HL-60 (human promyelocytic leukemia). Questo test, ampiamente validato ed utilizzato nei lavori della letteratura di riferimento, è fondato sulla determinazione dell'espressione della proteina P-ERK1/2 a seguito del trattamento delle cellule con i composti da testare.⁹⁰ In particolare è stato infatti riportato che le cellule HL-60, in cui sono espressi i recettori dei cannabinoidi CB₂, ma non quelli CB₁, sovra esprimono l'espressione di P-ERK1/2 quando trattate con agonisti dei recettori CB₂.^{28,52,94} Antagonisti della stessa classe recettoriale dei cannabinoidi non inducono invece alcun effetto sull'espressione della suddetta proteina e sono in grado di contrastare l'up-regulation di P-ERK1/2 determinata dal trattamento con agonisti CB₂.

I saggi sono stati condotti secondo la procedura precedentemente riportata.⁹⁰ La crescita delle cellule è avvenuta a 37°C in un incubatore al 5% in CO₂ impiegando un medium RPMI (Gibco-BRL, Gaithersburg, MA) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS), 1 µg/ml Penicillina-Streptomicina, 2 mM L-Glutamina, 2,5 µg/mL Amfotericina B, e 50 µg/mL Gentamicina. Le cellule (European Collection of Cell Cultures ECACC), i terreni di coltura e tutti gli additivi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Le cellule HL-60 sono state trattate con i composti da testare oltre che con il composto cannabinoidergico di riferimento WIN55,212-2; quale composto antagonista selettivo dei recettori CB₂ è stato utilizzato AM630. I composti sono stati solubilizzati nel terreno per aggiunta di DMSO (1%). L'espressione di P-ERK1/2 è stata determinata attraverso analisi Western blot. Dopo un appropriato tempo di esposizione (15 minuti), le dispersioni con le cellule sono state centrifugate a 1.000 x g ed i pellets ottenuti sono stati lavati con PBS a 4°C, ulteriormente centrifugati a 1.000 x g, quindi lisati a 4 °C in una soluzione tampone HEPES contenente altri componenti.⁹⁰ Gli estratti sono stati centrifugati a 10.000 x g per 15 minuti a 4 °C ed i supernatanti sono stati conservati come estratti delle cellule totali. Una porzione degli estratti è stata utilizzata per la quantificazione delle proteine totali (Quant-iT™ Protein Assay Kit; Invitrogen™). Ciascun saggio di western blot è stato condotto con un quantitativo fisso di proteine totali pari a 40 µg, utilizzando membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad), 10% Bis-Tris Gel NuPAGE® Novex (Invitrogen) e ChemiBLOCKER™ (Millipore) in TBST (0.1% Tween 20 in TBS, Bio-Rad). La proteina di interesse è stata individuata con Anti-phospho-ERK 1/2 recombinant clone AW39R (Millipore) diluito 1:1000 in BSA (Bovine Serum Albumin) 1% in TBST (10 min). A seguito di tre cicli di lavaggio in TBST, le membrane

sono state analizzate con l'anticorpo secondario Goat anti-Rabbit IgC – HRP (Invitrogen) diluito 1:2000 in ChemiBLOCKER™-TBST 1:4. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio (tre cicli in TBST), i sistemi sono stati trattati per 5 minuti con Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) e le bande immunoreattive sono state visualizzate mediante un analizzatore Fujifilm Las-1000 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH). La densità ottica delle bande immunoreattive è stata determinata con un software AIDA 2.11 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH). I dati sperimentali (cinque esperimenti indipendenti) sono stati espressi come percentuale media rispetto al veicolo (100 %) ±SEM. L'analisi statistica dei risultati sperimentali è stata condotta mediante il software Graph Pad Prism 5, adottando l'ANOVA a una via seguita dalla comparazione multipla di Dunnet.

In una prima fase della sperimentazione, l'espressione di P-ERK1/2 è stata determinata a seguito del trattamento di 15 minuti delle cellule con i composti da analizzare. Successivamente, al fine di poter correlare l'effetto rilevato con l'effettiva attività CB₂ agonista dei composti, gli esperimenti sono stati condotti prevedendo un pretrattamento delle cellule con l'antagonista selettivo CB₂ di riferimento AM630 (75 nM).

In accordo con il profilo determinato con il composto agonista di riferimento WIN55,212-2, un incremento significativo dell'espressione di P-ERK1/2 è stato rilevato a seguito del trattamento di cellule HL-60 con tutti i composti analizzati (Tabella XX; valori di P-ERK1/2 in assenza di AM630). L'attività CB₂ agonista dei nuovi derivati è stata confermata attraverso l'inibizione degli effetti indotti dai nuovi composti sull'espressione di P-ERK1/2 da parte del composto antagonista CB₂ di riferimento AM630 (Tabella 2; valori di P-ERK1/2 in presenza di AM630).

Tabella 2: Effetto di differenti dosi dei ligandi CB₂ sull'espressione di P-ERK1/2 in cellule HL-60 dopo 15 minuti di trattamento. I dati sono espressi come valore medio rispetto al veicolo (100%) ±SEM e sono il risultato di cinque esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs veicolo; #P<0.05 vs il ligando CB₂ alla stessa concentrazione in assenza del pre-trattamento con AM630.

Composto	Conc. AM630 (nM)	P-ERK 1/2 (% vs veicolo)			
		Conc. Composto (nM)			
		10	50	75	125
WIN 55,212-2	0	----	----	190±15*	----
	75	----	----	125±12#	----
NESS207C5	0	125±20	140±15	205±19*	212±18*
	75	----	----	110±21#	----
NESS209C5	0	121±10	130±12	180±19*	200±20*
	75	----	----	118±10#	----
139CBS	0	119±12	147±13	207±13*	210±19*
	75	----	----	109±15#	----

1.3 NESS10SM: un nuovo agonista dei recettori dei cannabinoidi CB₁

Nell'ambito della collaborazione fra Neuroscienze PharmaNess Scarl e il gruppo del Professor G.A.Pinna è stata sintetizzata precedentemente una nuova classe di composti 4,5-Diidrobenzo-ossa-cicloeptapirazolici (**Serie III** in Figura 8), quali bioisosteri del composto di riferimento N-piperidinil-8-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-1,4,5,6-tetraidrobenzo[6,7] cicloepita[1,2-*c*]pirazol-3-carbossiammide, denominato **NESS0327** (Figura 8). Detto composto aveva mostrato affinità verso i recettori CB₁, espressa in termini di K_i, inferiore al nM.⁹⁵ E' da rilevare come i dati di affinità relativi a **NESS0327** non siano stati tuttavia confermati da altri gruppi di ricerca, che hanno infatti riportato per il medesimo composto valori di affinità (K_i) per i recettori CB₁ tra 10 e 100 nM.⁹⁶⁻⁹⁷

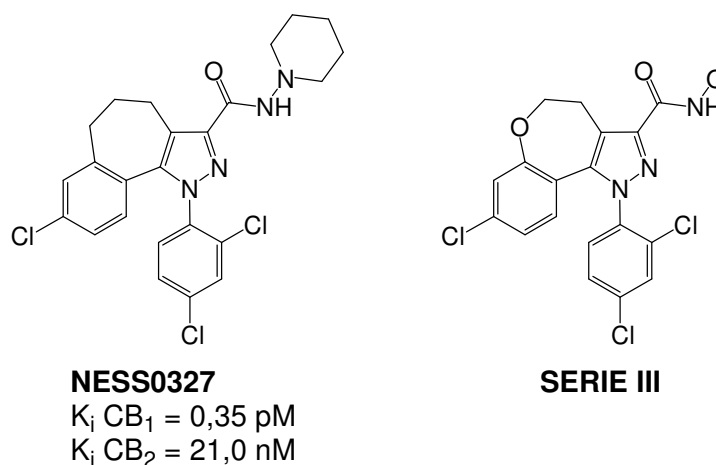


Figura 8. Struttura chimica di **NESS0327** e della formula generale dei composti 4,5-Diidrobenzo-ossa-cicloeptapirazolici (**Serie III**). Relativamente a **NESS0327** sono stati riportati i dati di *binding* riportati in letteratura.⁹⁵

Così come il composto di riferimento, tutti i derivati precedentemente caratterizzati afferenti alla classe **Serie III**, recanti ad esempio sostituenti pirrolidinici, piperidinici, omopiperidinici alla posizione 3 del pirazolo, avevano mostrato attività CB₁ antagonista. La strategia adottata al fine dell'individuazione di nuovi composti CB₁ agonisti è stata basata sull'inserimento di un gruppo ingombrante come quello mirtanilico quale sostituente "Q" della corbossiammide in posizione 3 del pirazolo (Figura 9), con l'ottenimento del composto **8-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-N-(6,6-dimetil-biciclo[3.1.1]ept-2-il-metil)-4,5-diidrobenzo-1H-6-osso-cicloepita[1,2-*c*]pirazol-3-carbossiammide (NESS10SM).**

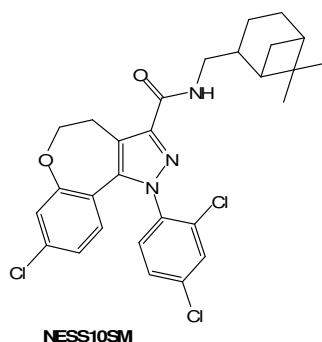
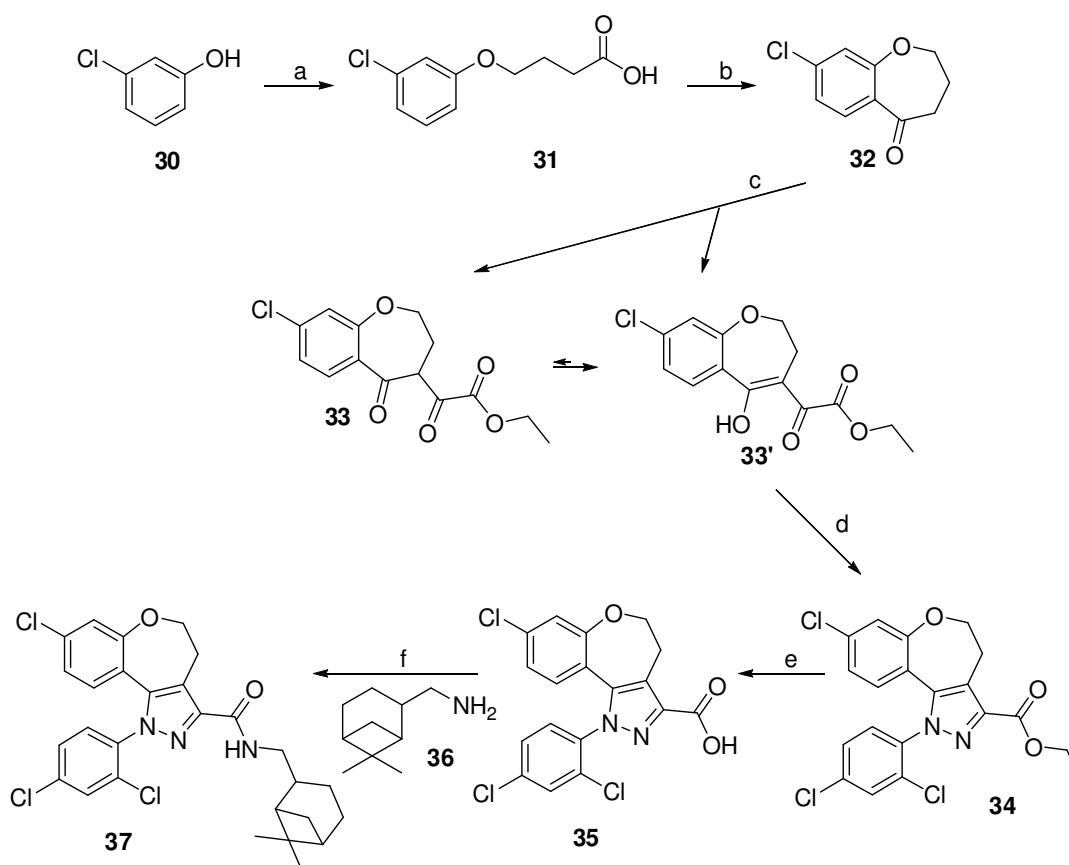


Figura 9. Formula di struttura di **NESS10SM**.

Precedenti studi relativi alla serie omologa in cui l'atomo di ossigeno era sostituito da un gruppo -CH₂- avevano infatti mostrato come la presenza di un gruppo ingombrante come quello mirtanilico in posizione 3 del pirazolo potesse determinare un cambiamento sostanziale nell'attività intrinseca dei composti, inducendo in particolare agonismo parziale CB₁, in contrapposizione all'antagonismo CB₁ mostrato invece da tutti gli omologhi recanti sulla funzione carbossiammidica un anello monociclico azotato non sostituito.

1.3.1 Sintesi

Il composto **NESS10SM** è stato sintetizzato attraverso i differenti stadi riportati nello Schema 4. La reazione tra *m*-cloro-fenolo **30** ed il γ -butirrolattone ha consentito l'ottenimento dell'acido **31** che, mediante ciclizzazione in presenza di acido polifosforico, ha successivamente fornito il chetone **32**. La reazione di Claisen del composto **32** con dietilossalato in presenza di etilato di sodio ha generato il dichetoestere **33**. Quest'ultimo è stato sottoposto a reazione di ciclizzazione con il cloridrato della 2,4-dicloro-fenilidrazina in etanolo a refluxo per dare l'estere tricyclico pirazolico **34**. L'idrolisi dell'estere ha consentito l'ottenimento dell'acido **35** che, a seguito dell'attivazione con EDC e butanolo, ha reagito con la (-)-*cis*-mirtanilammina **36** per dare il composto desiderato **37**.



Schema 4. Reagenti e condizioni: (a) NaOH, γ -butirrolattone, 170 °C, 5h; (b) PPA, 90 °C, 1,5 h; (c) Na, EtOH, (COOEt)₂, T amb., 1,5 h; (d) 2,4-Cl₂-C₆H₃NHNH₂·HCl, EtOH, riflusso, 1,5 h; (e) KOH, MeOH/H₂O, riflusso, 12 h; (f) EDC, BtOH, DCM, T amb., 0,5 h, quindi (-)-*cis*-mirtanilammina, TEA, DCM, T amb., 2 h.

1.3.2 Valutazione dell'affinità e della selettività del composto per i recettori dei cannabinoidi CB₁

L'affinità e la selettività del composto per i recettori dei cannabinoidi è stata determinata secondo quanto riportato al paragrafo 1.2.2.

I valori di K_i determinati con **NESS10SM** sono risultati pari a 21,7±3,0 e 325±38 nM, rispettivamente per i recettori CB₁ e CB₂.

L'introduzione di un gruppo ingombrante come quello mirtanilico quale sostituente del gruppo carbossiammidico in posizione 3 dell'anello pirazolico ha quindi consentito di mantenere una buona affinità e selettività per i recettori CB₁. E' da rilevare come i valori di affinità determinati per il composto testato siano in accordo con quelli di altre carbossiamidi precedentemente

caratterizzate e aventi lo stesso scaffold di **NESS10SM** contenente un atomo di ossigeno nell'anello centrale della struttura tricyclica condensata.

1.3.3 Attività intrinseca del composto **NESS10SM**

Al fine di verificare l'attività CB₁ agonista del composto **NESS10SM**, il derivato è stato sottoposto ad un test in vitro, basato sulla valutazione dell'espressione della proteina P-ERK1/2 di cellule N1E-115 (Neuroblastoma di topo) esprimenti i recettori CB₁ ma non CB₂, oltre che ad un saggio in ex vivo (organi isolati).

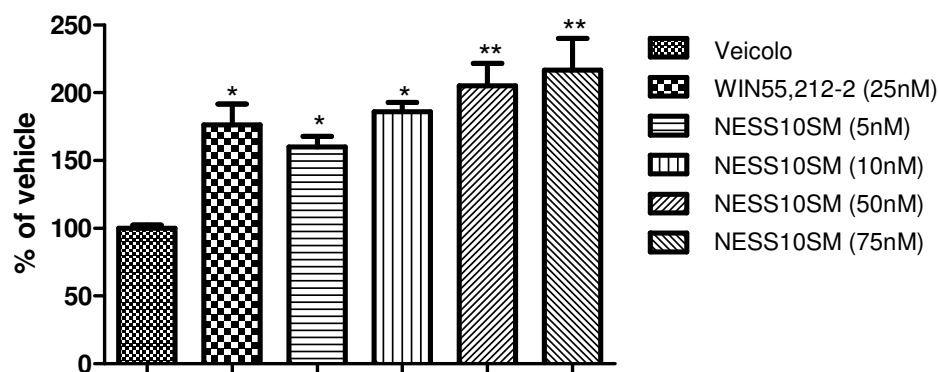
E' stato infatti riportato che l'esposizione di cellule N1E-115 a composti CB₁ agonisti induce una *up-regulation* dell'espressione di P-ERK1/2. Tale sovra-espressione di P-ERK1/2 non è stata invece rilevata nel caso del trattamento delle cellule con CB₁ antagonisti. L'effetto indotto dai composti CB₁ agonisti è risultato inibito da derivati in grado di bloccare detto sottotipo recettoriale.⁹⁸

La sperimentazione è stata condotta in analogia con quanto riportato al paragrafo 1.2.3, utilizzando le cellule N1E-115 al posto di HL-60 ed utilizzando la seguente soluzione nella fase di lisi delle ai fini dell'ottenimento dell'estratto di proteine per l'analisi western blot: soluzione tampone contenente HEPES 20 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerolo 12%, Nonidet P-40 0,1%, Aprotinina 1 µg/mL, Pepstatina 0,7 µg/mL, Leupeptina 0,5 µg/mL, e fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0,5 mM.

Anche in questo caso **WIN55,212-2** è stato utilizzato quale agonista cannabinoide di riferimento. Ai fini della verifica della mediazione dei recettori CB₁ sull'eventuale effetto rilevato, è stato impiegato rimonabant quale composto CB₁ antagonista di riferimento.

I risultati ottenuti con il composto **NESS10SM** sono stati riportati in Figura 10. In analogia con quanto riportato in letteratura per composti CB₁ agonisti, il nuovo composto ha indotto un incremento dell'espressione di P-ERK1/2. L'*up-regulation* della proteina è stata contrastata dall'attività del composto CB₁ antagonista di riferimento rimonabant. Il profilo individuato attraverso il saggio in vitro ha quindi evidenziato un'attività CB₁ agonista di **NESS10SM**.

a)



b)

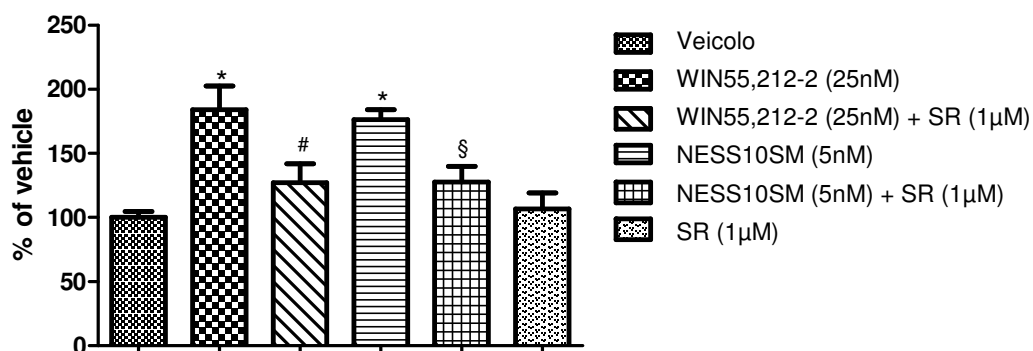


Figura10. a) espressione di P-ERK1/2 indotta in cellule N1E-115 a seguito di trattamento con **NESS10SM** o con il composto cannabinoide di riferimento **WIN55,212-2**. b) antagonismo di rimonabant (SR) sull'azione di *up-regulation* di P-ERK1/2 indotta dai composti cannabinoidegerici testati in a).

L'attività intrinseca di **NESS10SM** è stata ulteriormente verificata attraverso l'uso della tecnica degli organi isolati. E' stato infatti riportato che composti CB₁ agonisti determinano un'inibizione delle contrazioni indotte nel vaso deferente di topo a seguito di uno stimolo elettrico.⁹⁹ Derivati CB₁ antagonisti non mostrano alcun effetto se somministrati tal quale, ma sono comunque in grado di contrastare l'attività indotta da composti CB₁ agonisti.

La sperimentazione è stata condotta in accordo con una procedura riportata nella letteratura di riferimento, impiegando il vaso deferente prelevato da topi maschi CD1.⁹⁵ I tessuti sono stati montati in un bagno per organi isolati con celle da 10 mL ad una tensione iniziale pari a 0,5 g. Il bagno è stato riempito con una soluzione Krebs-Henseleit (NaCl 118,2 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, glucosio 11,0 mM, CaCl₂ 2,54 mM) mantenuta a 37°C sotto flusso di una miscela 95:5 O₂/CO₂. Le contrazioni isometriche sono state indotte da stimolazione elettrica con treni da 0,5 secondi di tre pulsii di voltaggio massimo del 110% (frequenza del treno 0,1 Hz; durata del pulso 0,5 millisecondi) attraverso un elettrodo di platino attaccato alla parte superiore del bagno e un secondo elettrodo in acciaio inossidabile attaccato alla parte inferiore del bagno. Gli stimoli sono stati indotti da uno stimolatore Grass S88K, successivamente amplificati, quindi suddivisi tra quattro bagni distinti. Le contrazioni sono state monitorate attraverso un opportuno software connesso ad un trasduttore mediante un amplificatore. Prima dei test, ciascun tessuto è stato equilibrato sottoponendolo a cicli di stimolazione alternati a cicli di riposo. Una volta verificata la riproducibilità della risposta dell'organo alla stimolazione elettrica, i tessuti sono stati impiegati per testare **NESS10SM**. I risultati ottenuti sono stati riportati come media \pm SEM di cinque differenti esperimenti. **WIN-55,212-2** è stato impiegato quale composto cannabinoide di riferimento. I composti sono stati solubilizzati in DMSO (concentrazione di DMSO nei bagni: inferiore allo 0,1%).

Come evidenziato dal profilo riportato in Figura 11, **NESS10SM** ha determinato un'inibizione delle contrazioni indotte nel vaso deferente di topo a seguito di uno stimolo elettrico. A differenza di quanto rilevato con composti CB₁ agonisti, l'attività di **NESS10SM** non ha raggiunto il 100% dell'inibizione e si è assestata su un valore massimo pari a circa il 50%. Sulla base del profilo individuato con la tecnica degli organi isolati, l'attività di **NESS10SM** è apparsa compatibile con quella di un composto CB₁ agonista parziale.

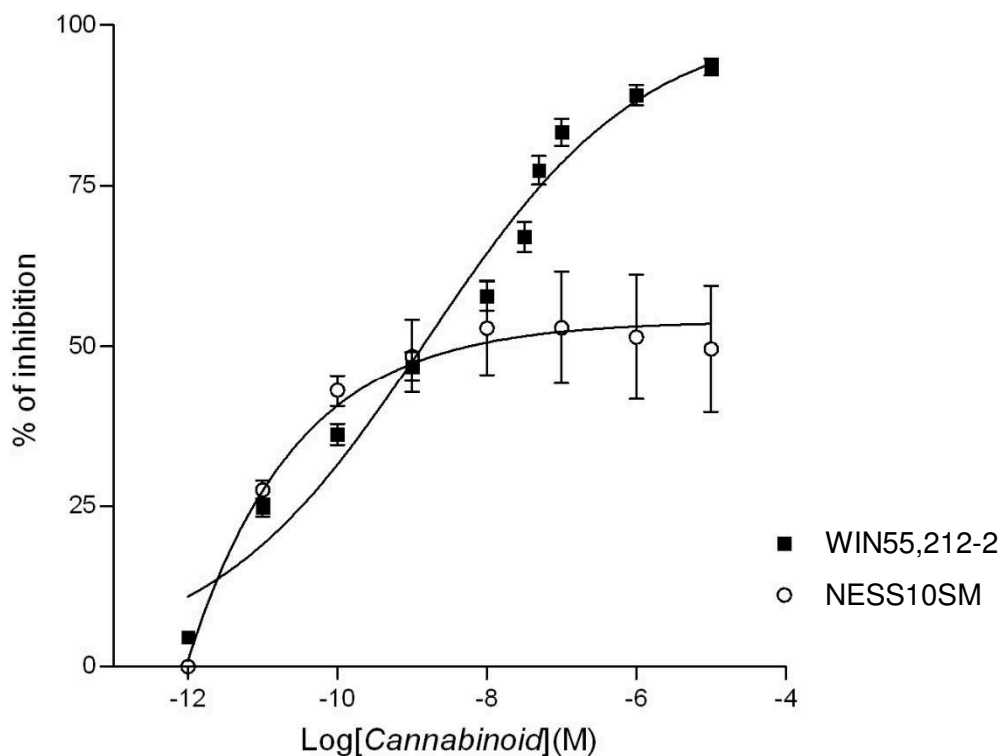


Figura 11. Attività inibitoria di **NESS10SM** e del composto cannabinoidergico di riferimento **WIN55,212-2** sulle contrazioni indotte da un impulso elettrico sul vaso deferente di topi.

1.4 Conclusioni

Sono stati sintetizzati cinque nuovi composti con affinità per i recettori dei cannabinoidi.

La sostituzione dell'anello 2,4-diclorofenilico o *p*-metil-benzilico nella posizione 1 del pirazolo dei composti della **Serie II** con una catena alchilica, ha garantito una elevata affinità per i recettori CB₂ (**NESS207C5**). Il sostituito mirtanilico sul gruppo carbossamidico in posizione 3 del pirazolo di **NESS207C5** ha inoltre assicurato una significativa affinità anche per i recettori CB₁. L'introduzione di un fenile in sostituzione dell'alogeno sull'anello tiofenico di **NESS207C5** a dare il composto **NESS209C5** ha significativamente ridotto l'affinità per i recettori dei cannabinoidi.

La modifica del gruppo carbossamidico in posizione 3 dell'anello pirazolico dei composti della **Serie II** con un gruppo chetonico, come nel caso del composto **CB139S**, ha assicurato elevata affinità e selettività per i recettori CB₂. La riduzione ad alcol del gruppo chetonico ha invece negativamente influenzato l'affinità per il suddetto sottotipo recettoriale dei cannabinoidi.

Inoltre, la presenza di un gruppo ingombrante come quello mirtanilico sulla carbossiamide in posizione 3 di 4,5-Diidrobenzo-ossa-cicloeptapirazolici (**Serie III**), come nel caso del composto **NESS10SM**, ha assicurato una buona affinità per i recettori CB₁.

I saggi condotti hanno permesso di rilevare per i nuovi composti sintetizzati profili compatibili con quelli di agonisti dei recettori dei cannabinoidi.

L'attività condotta ha permesso in particolare di individuare **NESS207C5**, **CB139S** e **NESS10SM** quali nuovi potenziali candidati per la terapia del dolore, con particolare riferimento al trattamento del dolore cronico e/o neuropatico. E' inoltre da rilevare come in base all'elevata affinità per entrambi i sottotipi recettoriali dei cannabinoidi, **NESS207C5** possa rappresentare una nuova entità chimica di interesse per lo sviluppo di strategie innovative basate sulla duplice azione CB₁/CB₂.

1.5 Rerefereenze

1. Eriksen J., Jensen M.K., Sjogren P., Ekholm O., Rasmussen N.K. Epidemiology of chronic non-malignant pain in Denmark. *Pain*. **2003**, *106*, 221-228.
2. Rustoen T., Wahl A.K., Hanestad B.R., Lerdal A., Paul S., Miaskowski C. Prevalence and characteristics of chronic pain in the general Norwegian population. *Eur J Pain*. **2004**, *8*, 555-565.
3. Neville A., Peleg R., Singer Y., Shert M., Shvartzman P. Chronic pain: a population-based study. *Isr.Med.Assoc.J*. **2008**, *10*, 676-680.
4. Pergolizzi J., Böger R.H., Budd K., Dahan A., Erdine S., Hans G., Kress H.G., Langford R., Likar R., Raffa R.B., Sacerdote P. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). *Pain Pract*. **2008**, *8*, 287-313.
5. Breivik H., Collett B., Ventafridda V., Cohen R., Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. **2006**, *10*, 287-333.
6. Inversen L.; Chapman V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief. *Current opinion in Pharmacology*. **2002**, *2*, 50-55.

7. Malan T.P., Ibrahim M.M., Deng H., Liu Q., Mata H.P., Vanderah T., Porrecca F., Makriyannis. CB₂ cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*. **2001**, *93*, 239-245.
8. Clayton N., Marshall F.H., Bpountra C., O'Shaughnessy C.T. CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*. **2002**, *96*, 253-260.
9. Ibrahim M.M., Deng H, Zvonok A, Cockayne D.A., Kwan J., Mata H.P., Vanderah T.W., Lai J., Porrecca F., Makiyannis A., Malan T.P. Activation of CB₂ cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *PNAS*. **2003**, *100*, 10529-10533.
10. Jaggar S.I., Hasnie F.S., Sellatuary S., Rice A.S.C. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anadamide and the putative CB₂ receptor palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*. **1998**, *76*, 189-199.
11. Bolognini D., Costa B., Maione S., Comelli F., Marini P., Di Marzo V., Parolaro D., Ross R.A., Gauson L.A., Cascio M.G., Pertwee R.G. The plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *British Journal of Pharmacology*. **2010**, *160*, 677-687.
12. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. **1990**, *346*, 561-564.
13. Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. **1993**, *365*, 61-65.
14. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **1992**, *258*, 1946-1949.
15. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1995**, *215*, 89-97.
16. Wilson R., Nicoll R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. **2002**, *296*, 678-682.
17. McAllister S.D., Tao Q., Barnett-Norris J., Buehner K., Hurst D. P., Guarnieri F., Reggio P.H., Nowell Harmon K.W., Cabral G., Abood M.E. A critical role for tyrosine residue in the cannabinoid receptors for ligand recognition. *Biochem. Pharmacol*. **2002**, *63*, 2121-2136.

18. Reggio P.H. Pharmacophores for ligand recognition and activation/inactivation of the cannabinoid receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1607-1633.
19. Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B., Rice K.C. Cannabinoid receptor location in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1932-1936.
20. Howlet A.C. The CB₁ cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol. Dis.* **1998**, *5*, 405-416.
21. Lange J.H.M., Kruse C.G. Medicinal chemistry strategies to CB₁ cannabinoid receptor antagonists. *Drug DiscoVery Today.* **2005**, *10*, 693-702.
22. Glass M. The role of cannabinoids in neurodegenerative disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **2001**, *25*, 743-765.
23. Pertwee R.G. Cannabinoids and gastrointestinal tract. *Gut.* **2001**, *48*, 859-867.
24. Casu M.A., Porcella A., Ruiu S., Saba P., Marchese G., Carai M.A.M., Reali R., Gessa G.L., Pani L. Differential distribution of functional cannabinoid CB₁ receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *459*, 97-105.
25. Porcella A., Maxia C., Gessa G.L., Pani, L. The human eye expresses high levels of CB₁ cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 1-5.
26. Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129-180.
27. Porcella A., Marchese G., Casu M.A., Rocchitta A., Lai M.L., Gessa G.L., Pani L. Evidence for functional CB₁ cannabinoid receptor expressed in the rat thyroid. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, *147*, 255-261.
28. 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., International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161-202.
29. Antel J., Gregory P.C., Nordheim U. CB₁ cannabinoid receptor antagonists for treatment of obesity and prevention of comorbid metabolic disorders. *J.Med.Chem.* **2006**, *49*, 4008-4016.
30. Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Glass M., Mackie K.P., Fahey K.J., Cullinan G.J., Hunden D.C., Johnson D.W., Chaney M.O. LY320135, a novel cannabinoid CB₁ receptor antagonist, unmasks coupling of the CB₁ receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 291-297.

31. Kang S.Y., Lee S.H., Seo H.J., Jung M.E., Ahn K., Kim J., Lee J. Tetrazolebiarylpyrazole derivatives as cannabinoid CB₁ receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **2008**, *18*, 2385-2389.
32. Lange J.H.M., Coolen H.K.A.C., Van Stuivenberg H.H., Dijksman J.A.R., Herremans A.H.J., Ronken E., Keizer H.G., Tipker K., McCreary A.C., Veerman, Synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel 3,4-diarylpyrazolines as potent and selective CB₁ cannabinoid receptor antagonists. *J.Med.Chem.* **2004**, *47*, 627-643.
33. Lange J.H.M., Van Stuivenberg H.H., Veerman W., Wals H.C., Stork B., Coolen H.K.A.C., McCreary A.C., Adolfs T.J.P., Kruse C.G. Novel 3,4-diarylpyrazolines as potent cannabinoid CB₁ receptor antagonists with lower lipophilicity. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **2005**, *15*, 4794-4798.
34. Rinaldi-Carmona M., Barth F., Héaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martinez S., Maruani J., Néliat G., Caput D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240-244.
35. Seltzman H.H. Recent CB₁ cannabinoid receptor antagonists and inverse agonists. *Drug Dev.Res.* **2009**, *70*, 601-615.
36. Després J.P., Golay A., Sjöström L., Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N.Engl.J.Med.* **2005**, *353*, 2121-2134.
37. Gary-Bobo M., Elachouri G., Gallas J.F., Janiak P., Marini P., Ravinet-Trillou C., Chabbert M., Cruccioli N., Pfersdorff C., Roque C., Arnone M., Croci T., Soubrie' P., Oury-Donat F., Maffrand J.P., Scatton B., Lacheretz F., Le Fur G., Herbert J.M., Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology.* **2007**, *46*, 122-129.
38. Teixeira-Clerc F., Julien B., Grenard P., Van Nhieu J.T., Deveaux V., Li L., Serriere-Lanneau V., Ledent C., Mallat A., Lotersztajn S. CB₁ cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat.Med.* **2006**, *12*, 671-676.
39. Pertwee R.G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* **2001**, *63*, 569-611.
40. Porcella A., Maxia C., Gessa G.L., Pani L. The synthetic cannabinoid WIN55212-2 decreases the intraocular pressure in human glaucoma resistant to conventional therapies. *European Journal of Neuroscience.* **2001**, *13*, 409-412.
41. Klein T.W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat.Rev.Immunol.* **2005**, *5*, 400-411.

42. Blanchard J.C., Menard F. Use of central cannabinoid receptor antagonist for preparing medicines designed to facilitate smoking cessation. US Patent 6,930,122; Sanofi-Aventis, Paris (FR), **2005**.
43. Carai M.A.M., Colombo G., Gessa G.L. Rimonabant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life Sci.* **2005**, *77*, 2339-2350.
44. Le Foll B., Goldberg S.R. Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **2005**, *312*, 875-883.
45. Jordan K., Kasper C., Schmoll H.J. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: current and new standards in the antiemetic prophylaxis and treatment. *Eur.J.Cancer.* **2005**, *41*, 199-205.
46. Van Sickle M.D., Oland L.D., Ho W., Hillard C.J., Mackie K., Davison J.S., Sharkey K.A. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology.* **2001**, *121*, 767-774.
47. Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br.J.Pharmacol.* **2009**, *156*, 1029-1040.
48. Kelsey J.E., Harris O., Cassin J. The CB1 antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease, *Behav.Brain Res.* **2009**, *203*, 304-307.
49. Blazquez C., Carracedo A., Barrado L., Real P.J., Fernandez-Luna J.L., Velasco G., Malumbres M., Guzman M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J.*, **2006**, *20*, E2199-E2208.
50. Succu S., Mascia M.S., Sanna F., Melis T., Argiolas A., Melis M.R. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A induces penile erection by increasing extra-cellular glutamic acid in the paraventricular nucleus of male rats. *Behav.Brain Res.* **2006**, *169*, 274-281.
51. Lim S.Y., Davidson S.M., Yellon D.M., Smith C.C.T. The cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, protects against acute myocardial infarction. *Basic.Res.Cardiol.* **2009**, *104*, 781-792.
52. Bouaboula M., Dussossoy D., Casellas P. Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J. Biol.Chem.* **1999**, *274*, 20397-20405.

53. Jbilo O., Derocq J.M., Segui M., Le Fur G., Casellas P. Stimulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 induces MCP-1 and IL-8 gene expression in human promyelocytic cell line HL60. *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 273-277.
54. Pertwee R.G. Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. *Br.J. Pharmacol.* **2006**, *147* (Suppl 1), S163-S171.
55. Pertwee R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: An overview. *Int.J.Obes.* **2006**, *30* (Suppl 1), S13-S18.
56. Kishimoto S., Kobayashi Y., Oka S., Gokoh M., Waku K., Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J.Biochem.* **2004**, *135*, 517-524.
57. Sugiura T., Oka S., Gokoh M., Kishimoto S., Waku K. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-Arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *J.Pharmacol.Sci.* **2004**, *96*, 367-375.
58. Do Y., McKallip R.J., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NFkappaB-dependent apoptosis: Novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J.Immunol.* **2004**, *173*, 2373-2382.
59. McKallip R. J., Lombard C., Fisher M., Martin B.R., Ryu S., Grant S., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* **2002**, *100*, 627-634.
60. Carrier E. J., Kearns C.S., Barkmeier A.J., Breese N.M., Yang W., Nithipatikom K., Pfister S.L., Campbell W.B., Hillard C.J. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptordependent mechanism. *Mol.Pharmacol.* **2004**, *65*, 999-1007.
61. Lu Q., Straiker A., Lu Q., Maguire G. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Visual Neurosci.* **2000**, *17*, 91-95.
62. Nunez E., Benito C., Pazos M.R., Barbachano A., Fajardo O., Gonzalez S., Tolon R.M., Romero J. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: An immunohistochemical study. *Synapse* **2004**, *53*, 208-213
63. Benito C., Nunez E., Tolon R.M., Carrier E.J., Rabano A., Hillard C.J., Romero J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque associated glia in Alzheimer disease brains. *J.Neurosci.* **2003**, *23*, 11136-11141.

64. Gong J.P., Onaivi E.S., Ishiguro H., Liu Q.R., Tagliaferro P.A., Brusco A., Uhl G.R. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10-23.
65. Beltramo M., Bernardini N., Bertorelli R., Campanella M., Nicolussi E., Fredduzzi S., Reggiani A. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: Possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur.J.Neurosci.* **2006**, *23*, 1530-1538.
66. Richardson D., Pearson R.G., Kurian N., Latif M.L., Garle M.J., Barrett D.A., Kendall D.A., Scammell B.E., Reeve A.J., Chapman V. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissues and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2008, *10*, R43.
67. Xu H., Cheng C.L., Chen M., Manivannan A., Cabay L., Pertwee R.G., Coutts A., Forrester J.V. Anti-inflammatory property of the cannabinoid receptor-2 selective agonist JWH-133 in a rodent model of autoimmune uveoretinitis. *J.Leucok.Biol.* 2007, *82*, 532-541.
68. Palazuelos J., Aguedo T., Pazos M.R., Julien B., Carrasco C., Resel E., Sagredo O., Benito C., Romero J., Azcoitia I., Fernandez-Rui J., Guzman M., Galve-Roperh I. Microglial CB₂ cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain.* **2009**, *132*, 3152-3164.
69. Rossi F., Siniscalco D., Luongo L., De Petrocellis L., Bellini G., Petrosino S., Torella M., Santoro C., Nobili B., Perrotta S., Di Marzo V., Maione S. The endovanilloid/endocannabinoid system in human osteoclast: Possible involvement in bone formation and resorption. *Bone.* **2009**, *44*, 476-484.
70. Marte-Pelletier J., Widi L.M., Pelletier J.P. Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone.* **2012**, *51*, 297-311.
71. Guindon J., Hohmann A.G. Cannabinoid CB₂ receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br.J.Pharmacol.* **2008**, *153*, 319-334.
72. Jhaveri M.D., Elmes S.J.R., Kendall D.A., Chapman V. Cannabinoid CB₂ receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol.Neurobiol.* **2007**, *36*, 26-35.
73. Raman C., Mc Allister S.D., Rizvi G., Patel S.G., Moore D.H., Abood M.E. Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with cannabinoid. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degradation.* **2004**, *5*, 33-39.

74. Jones D. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? *Nat.Rev.Drug Discovery*. **2008**, 7, 961-962.
75. Pertwee R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br.J.Pharmacol*. **2009**, 156, 397-411.
76. Akbas F., Gasteyger C., Sjödin A., Astrup A., Larsen T.M. A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. *Obes.Rev*. **2009**, 10, 58-67.
77. Horvath T.L. The unfolding cannabinoid story on energy homeostasis: central or peripheral site of action? *Int.J.Obes*. **2006**, 30, S30-S32.
78. LoVerme J., Duranti A., Tontini A., Spadoni G., Mor M., Rivara S., Stella N., Xu C., Tarzia G., Piomelli D. Synthesis and characterization of a peripherally restricted CB1 cannabinoid antagonist, URB447, that reduces feeding and body-weight gain in mice. *Bioorg.Med.Chem.Lett*. **2009**, 19, 639-643.
79. Receveur J.M., Murray A., Linget J.M., Nørregaard P.K., Cooper M., Bjurling E., Nielsen P.A., Högberg T. Conversion of 4-cyanomethyl-pyrazole-3-carboxamides into CB1 antagonists with lowered propensity to pass the blood-brain-barrier. *Bioorg.Med.Chem.Lett*. **2010**, 20, 453-457.
80. Sink K.S., McLaughlin P.J., Wood J.A.T., Brown C., Fan P., Vemuri V.K., Pang Y., Olzewska T., Thakur G.A., Makriyannis A. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology*. **2008**, 33, 946-955.
81. Sanchez C., de Ceballos M.L., Gomez del Pulgar T., Rueda D., Corbacho C., Velasco G., Galve-Roperh I., Huffman J.W., Cajal S.R., Guzman M. Inhibition of glioma growth by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptors. *Cancer Res*. **2001**, 61, 5784-5789.
82. Hanus L., Breuer A., Tchilibon S., Shiloah S., Goldenberg D., Horowitz M., Pertwee R.G., Ross R.A., Mechoulam R., Fride E. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. **1999**, 96, 14228-14233.
83. Valenzano K.J., Tafesse L., Lee G., Harrison J.E., Boulet J.M., Gottshall S.L., Mark L., Pearson M.S., Miller W., Shan S., Rabadi L., Rotshteyn Y., Chaffer S.M., Turchin P.I., Elsemore D.A., Toth M., Koetzner L., Whiteside G.T. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology*. **2005**, 48, 658-672.

84. Huffman J.W. Cannabimimetic indoles, pyrroles and indenes. *Curr.Med.Chem.* **1999**, *6*, 705-720.
85. Elmes S.J., Winyard L.A., Medhurst S.J., Clayton N.M., Wilson A.W., Kendall D.A., Chapman V. Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain.* **2005**, *118*, 327-335.
86. Thakur G.A., Tichkule R., Bajaj S., Makrijannis A. Latest advances in cannabinoid receptor agonists. *Exp.Op.Ther.Patents.* **2009**, *19*, 1647-1673.
87. Rog D.J., Nurmikko T.J., Young C.A. Oromucosal Δ^9 -tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: An uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clin.Ther.* **2009**, *29*, 2068-2079.
88. Portier M., Rinaldi-Carmona M., Pecceu F., Combes T., Poinot-Chazel C., Calandra B., Barth F., Le Fur G., Casellas P. SR144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1999**, *288*, 582-589.
89. Mussinu J.M., Ruiu S., Mulé A.c., Carai M.A.M., Loriga G., Murineddu G., Pinna G.A. Tricyclic pyrazoles. Part 1. Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-based ligands for CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors. *Bioorg.Med.Chem.* **2003**, *11*, 251-263.
90. 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. Tricyclic pyrazoles. Part 4. Synthesis and biological evaluation of analogues of the robust and selective CB₂ cannabinoid ligand 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-piperidin-1-yl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazole-3-carboxamide. *J.Med.Chem.* **2006**, *49*, 7502-7512.
91. Luogo L., Palazzo E., Tambaro S., Giordano C., Gatta L., Scafuro M.A., Rossi F.sca, Lazzari P., Pani L., de Novellis V., Malcangio M., Maione S. 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylaamine-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB₂ agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. *Neurobiology of Disease.* **2010**, *37*, 177-185.
92. Lazzari P., Ruiu S., Pinna G.A., Murineddu G. Tricyclic pyrazole derivative as cannabinoid receptor antagonists. EP1602658, **2005**.
93. Cheng Y., Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem.Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.

94. Derocq, J.M., Jbilo O., Bouaboula M., Segui M., Clere C., Casellas P. Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *J.Biol.Chem.* **2000**, 275, 15621-15628.
95. Ruiu S., Pinna G.A., Marchese G., Mussinu J.M., Saba P., Tambaro S., Casti P., Vargiu R., Pani L. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB₁ cannabinoid receptor. *J. Pharmacol.Exp.Ther.* **2003**, 306, 363-370.
96. Stoit A.R., Lange J.H.M., den Hartog A.P., Ronken E., Tipker K., van Stuijvenberg H.H., Dijkman J.A.R., Wals H.C., Kruse C.G. Design, Synthesis and Biological Activity of Rigid Cannabinoid CB₁ Receptor Antagonists. *Chem.Pharm.Bull.* **2002**, 50, 1109-1113.
97. Zhang Y., Burgess J.P., Brackeen M., Gilliam A., Mascarella S.W., Page K., Seltzman H.H., Thomas B.F. Conformationally Constrained Analogues of *N*-(Piperidinyl)-5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-4-Methyl-1*H*-Pyrazole-3-Carboxamide (SR141716): Design, Synthesis, Computational Analysis, And Biological Evaluations. *J.Med.Chem.* **2008**, 51, 3526-3539S.
98. Davis M.I., Ronesi J., Lovinger D.M. A Predominant Role for Inhibition of the Adenylate Cyclase/Protein Kinase A Pathway in ERK Activation by Cannabinoid Receptor 1 in N1E-115 Neuroblastoma Cells. *JBC* **2003**, 278, 48973-48980.
99. Pertwee R.G., Stevenson L.A., Elrick D.B., Mechoulam R., Corbett A.D. Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br.J.Pharmacol.* **1992**, 105, 980-984.

CAPITOLO 2

NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPIOIDI DELTA

2.1 Introduzione

2.1.1 I recettori degli oppioidi

I recettori degli oppioidi appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs) di membrana caratterizzati da una catena polipeptidica formata da sette alfa eliche che attraversa sette volte la membrana plasmatica.¹⁻⁷ La sequenza amminoacidica rivela un'omologia non superiore al 30% con gli altri recettori GPCRs. Un'omologia compresa tra il 65 e il 70% è stata invece rilevata fra i tre principali sottotipi recettoriali degli oppioidi *mu*, *delta* e *kappa*.¹⁻⁷ In particolare, i più alti livelli di omologia sono stati individuati in corrispondenza dei domini di transmembrana, nelle anse intracellulari e in una piccola porzione della catena C-terminale in prossimità della settima regione di transmembrana. Le aree di maggiore divergenza tra i tre differenti sottotipi recettoriali degli oppioidi sono state invece riscontrate in corrispondenza della seconda e terza ansa extracellulare, così come nelle catene N- e C-terminali, rispettivamente extra- e intra-cellulari.

L'esistenza di altri sottotipi recettoriali degli oppioidi (*ORL1*, *sigma*, *epsilon*, *mu*₁, *mu*₂, *delta*₁, *delta*₂, *kappa*₁, *kappa*₂, *kappa*₃),¹⁻⁷ in aggiunta ai tre principali sopra riportati, è stata postulata sulla base di numerosi studi farmacologici, tuttavia ulteriori approfondimenti risultano essere necessari al fine di supportare l'esistenza di tutti i sottotipi recettoriali ipotizzati, con particolare riferimento ai sottotipi recettoriali 1 e 2 degli oppioidi *mu* e *delta* e 1, 2 e 3 dei recettori *kappa*. I tre principali sottotipi recettoriali degli oppioidi sono correlati a peptidi endogeni oppioidergici, con particolare riferimento a:

- Enkefaline, che sono selettive per i recettori *delta* e sono derivate dalla proteina pro-enkefalina;
- Dinorfine, aventi pro-dinorfina quale proteina precursore e caratterizzate da affinità per i recettori *kappa*;
- Endorfine, aventi affinità sia per i recettori *mu* che *delta* ed essendo derivate dalla proteina pro-opiomelanocortina (POMC);
- Endomorfine, caratterizzate da selettività verso i recettori degli oppioidi *mu*.

I siti principali di *binding* degli oppioidi sono stati principalmente individuati nel cervello dei mammiferi, con una differente distribuzione tra le differenti aree cerebrali. In particolare i recettori degli oppioidi risultano espressi nella corteccia cerebrale, nella sostanza grigia periacqueduttale (PAG), nel nucleo dorsale, nel sistema limbico, nei centri bulbari, nell'area postrema e nel nucleo di Edinger-Westphall, essendo ciascuna di queste aree correlate a differenti funzioni cerebrali. In particolare, l'analgesia profonda è mediata da PAG e dal nucleo dorsale, la componente emozionale e gratificante è correlata al sistema limbico, mentre la reazione affettiva al dolore è gestita dalla corteccia frontale. La stimolazione dei centri bulbari, dell'area postrema e del nucleo di Edinger-Westphall può invece determinare rispettivamente depressione respiratoria, nausea ed emesi, effetto miotico.¹⁻⁷

I recettori degli oppioidi sono espressi anche in diversi organi e tessuti periferici quali l'intestino, il colon, il tratto uro-genitale, l'occhio, il tratto respiratorio, con particolare riferimento ai polmoni. E' stata inoltre evidenziata la presenza di siti di *binding* di oppioidi anche nelle cellule del sistema immunitario, oltre che in alcune cellule tumorali.

Sulla base dell'ampia distribuzione dei recettori degli oppioidi, numerose classi di composti in grado di modulare detti recettori sono state sviluppate ed il loro uso è stato proposto per un ampio spettro di applicazioni farmacologiche.⁷⁻²² Tra queste, quelle che hanno mostrato una maggiore valenza sulla base degli studi preclinici sono risultate essere: dolore (cronico, acuto, post-operatorio, neuropatico), disordini gastrointestinali, tosse, abuso di droghe, alcolismo e tabagismo, disordini del sistema immunitario, artriti, psoriasi, obesità, disfunzioni sessuali, glaucoma, malattie di Parkinson e di Alzheimer, ansia e depressione, disordini del tratto uro-genitale. Tra le diverse aree terapeutiche investigate, il dolore nelle sue varie forme, i disordini gastrointestinali, l'abuso di droghe e la tosse rappresentano il target terapeutico principale di ligandi dei recettori degli oppioidi, con applicazioni consolidate da tempo quali l'uso della morfina e di analoghi semisintetici per il trattamento del dolore, della loperamide come antipropulsivo nel trattamento di diarrea, del naloxone quale oppioide antagonista impiegato nella pratica clinica nei casi di abuso di droghe, della codeina quale antitussivo.

2.1.2 Analgesici oppioidi

L'uso degli oppioidi nella terapia del dolore sia acuto che cronico risale a più di 3000 anni a.C. e rappresenta tuttora la strategia farmacologica più ampiamente adottata per il trattamento di diverse forme di questa patologia.

La morfina, il principale alcaloide presente nell'oppio, è considerato il farmaco oppioidergico di riferimento per il trattamento del dolore, specialmente per quanto concerne il dolore acuto, quello post-operatorio o nel caso di cure palliative in pazienti oncologici. L'impiego degli oppioidi per il trattamento del dolore cronico è invece ancora argomento di discussione in quanto l'efficacia di questi composti in clinica risulta ancora argomento ampiamente dibattuto, in attesa di ulteriori evidenze sperimentali che ne possano definitivamente dimostrare l'efficacia in trattamenti prolungati.²³

Nonostante gli oppioidi rappresentino i farmaci più prescritti per il trattamento del dolore, numerosi effetti collaterali sono stati evidenziati e correlati al loro uso. Tra questi, i più rilevanti sono risultati essere: depressione respiratoria, sedazione, nausea e costipazione. Altri effetti collaterali sono stati evidenziati a seguito di trattamenti prolungati con oppioidi, con particolare riferimento a dipendenza fisica e tolleranza all'effetto analgesico, con conseguenti ulteriori effetti indesiderati quali sindrome di astinenza, *addiction* e abuso.²⁴⁻²⁸

La tolleranza è la riduzione dell'effetto di un farmaco conseguente all'uso prolungato dello stesso e, nel caso degli oppioidi, si manifesta attraverso l'esigenza di incrementare la dose somministrata al fine di ottenere lo stesso effetto analgesico.

La dipendenza fisica è la manifestazione di meccanismi adattivi compensatori in aree cerebrali che controllano le funzioni somatiche e si traduce con l'instaurarsi di crisi di astinenza a seguito di repentina interruzione della somministrazione del farmaco.

Con *addiction* si definisce un disturbo cronico a rischio di ricaduta caratterizzato dalla compulsione nella ricerca e nell'assunzione del farmaco, perdita di controllo ed insorgenza di stati emotivi negativi (disforia, ansia, irritabilità) a fronte dell'impedimento alla terapia. Nel caso degli oppioidi, l'*addiction* può essere riconducibile anche all'effetto gratificante rilevato a seguito della somministrazione degli oppioidi e correlato ad un incremento di dopamina nel sistema mesolimbico, con particolare riferimento alla shell del nucleus accumbens.

I meccanismi di instaurazione degli effetti collaterali indotti dall'uso degli oppioidi non sono ancora tuttora chiari. Alcune ipotesi al riguardo sono comunque state formulate; tra queste quelle maggiormente considerate riguardano la desensitizzazione dei recettori, la loro internalizzazione e la loro *down-regulation*.

Anche nel caso specifico della tolleranza all'uso degli oppioidi, i meccanismi molecolari alla base dell'instaurarsi dell'effetto indesiderato, seppur ampiamente studiati, non sono ancora del tutto stati definiti e validati. Da un lato si è ipotizzato che la tolleranza sia dovuta ad una riduzione dell'espressione dei recettori degli oppioidi indotta dalla somministrazione di

composti oppiacei e alla desensitizzazione di tali recettori a seguito della continua stimolazione degli stessi. Questa desensitizzazione sembrerebbe poter essere correlata alla fosforilazione e quindi all'attivazione di CREB (AMP ciclico-responsive element-binding protein) attraverso la via delle MAP-chinasi (mitogen-activated protein), con una successiva e conseguente internalizzazione dei recettori.²⁹ Dall'altro si è dimostrato che l'uso degli oppioidi determina l'instaurarsi di tolleranza, ma senza che il legame degli oppioidi con i recettori ne determinino l'internalizzazione. Tra le diverse ipotesi formulate è stato anche proposto quale meccanismo alla base della tolleranza l'attivazione di un effetto pro-nocicettivo con una conseguente induzione di iperalgesia, particolarmente evidente nei casi di interruzione repentina del trattamento farmacologico e correlabile ai sintomi di astinenza.²⁶ L'iperalgesia rappresenta infatti uno dei principali sintomi indotti dall'astinenza da oppioidi. Ad essa sono in questo caso associati anche insonnia, irritabilità, agitazione psicomotoria e diarrea, la comparsa dei quali sembra essere correlabile ad effetti sui meccanismi omeostatici adattativi indotti attraverso l'uso prolungato degli oppioidi.

2.1.3 Oppioidi delta selettivi

La caratterizzazione del sistema endogeno degli oppioidi ha permesso di individuare sostanziali differenze tra i tre principali recettori degli oppioidi *mu*, *delta* e *kappa*, evidenziando peculiarità per ciascuno dei tre sistemi recettoriali, oltre che possibili correlazioni tra gli stessi.¹⁻⁷

In particolare è stata evidenziata una stretta interconnessione tra i recettori *mu* e *delta*, sulla base della quale è stata anche ipotizzata la possibile formazione di eterodimeri *mu-delta*.

In relazione a quanto sopra riportato, è stato possibile correlare la comparsa degli effetti indesiderati indotti dalla somministrazione degli oppioidi allo specifico profilo recettoriale dei farmaci utilizzati. In particolare è stato evidenziato come l'insorgenza di dipendenza, tolleranza, depressione respiratoria, ed effetto gratificante siano fondamentalmente legati all'attivazione del recettore *mu*, come nel caso della somministrazione della morfina. Al contrario, agonisti selettivi del recettore *delta*, seppur manifestando azione analgesica di entità inferiore rispetto a quella indotta dalla somministrazione di ligandi oppioidergici *mu*,³⁰⁻³⁵ hanno mostrato una ridotta o nulla incidenza di effetti collaterali. Inoltre, in relazione alla stretta interconnessione tra i recettori *delta* e *mu*, è stata evidenziata la possibilità di ridurre gli effetti indesiderati indotti dagli oppioidi convenzionali *mu* selettivi attraverso un loro utilizzo in associazione ad agonisti dei recettori *delta*. Infatti, è stato dimostrato che composti oppioidergici *delta* selettivi sono in grado di potenziare l'azione analgesica della morfina, consentendo quindi di ridurre il dosaggio

dell'analgescico *mu* di riferimento. Inoltre gli agonisti *delta* sono stati in grado di contrastare gli effetti di depressione respiratoria correlati all'uso della morfina.

Molti lavori nella letteratura di riferimento dimostrano come la formazione dell'eterodimero *mu-delta* giochi un ruolo funzionalmente importante nel potenziale analgesico degli oppioidi, ma soprattutto nello sviluppo degli effetti collaterali, con particolare riferimento alla tolleranza.³⁶⁻³⁹

Al di là dei limiti evidenziati relativamente all'uso dei soli agonisti degli oppioidi *delta* nella pratica clinica del trattamento del dolore,³⁰⁻³⁵ è comunque da rilevare come alcuni studi preclinici abbiano mostrato interessanti proprietà analgesiche da parte di composti oppioidergici *delta* selettivi in diversi modelli di dolore (dolore neuropatico, infiammatorio), evidenziando al contempo l'assenza degli effetti collaterali della morfina.⁴⁰⁻⁴³

Il minor potere analgesico degli agonisti *delta* rispetto agli agonisti *mu* sembrerebbe poter essere legato alla differente distribuzione dei recettori sulla membrana cellulare.⁴⁴ Infatti, mentre i recettori *mu* sono espressi sulla superficie della membrana, i recettori *delta* sono localizzati nei compartimenti intracellulari.⁴⁵⁻⁴⁶ È stato però dimostrato che particolari condizioni come stress, presenza di infiammazione cronica, dolore neuropatico o trattamento prolungato con morfina inducano “*membrane trafficking*” dei recettori *delta* aumentando l'effetto analgesico.⁴⁶⁻⁴⁷ Il trattamento cronico, ma non acuto, con morfina o con agonisti *mu*, induce un cambiamento nella distribuzione subcellulare dei recettori *delta* accompagnato da un aumento nell'attività analgesica degli agonisti *delta* in modelli di dolore acuto (tail flick e hot plate) e cronico/infiammatorio (test della formalina).^{35,44} Tuttavia sembrerebbe che la stimolazione dei recettori *mu* induca una traslocazione dei recettori *delta* dal compartimento intracellulare alla membrana plasmatica neuronale piuttosto che un cambiamento nella biosintesi proteica.⁴⁴ Il ruolo cruciale dell'attivazione dei recettori oppioidergici *mu* nella regolazione del “*trafficking*” e “*membrane targeting*” dei recettori oppioidergici *delta* è confermato dagli studi effettuati utilizzando topi *knockout* privi dei recettori *mu*. Infatti, la delezione del recettore *mu* non induce l'esternalizzazione del recettore *delta* sulla membrana plasmatica neuronale, con riduzione dell'effetto analgesico indotto dal trattamento con agonisti *delta*.⁴⁴ Questi studi effettuati con topi geneticamente modificati suggeriscono inoltre che solo dopo la traslocazione del recettore *delta* sulla membrana plasmatica il potenziale analgesico risulti effettivamente mediato da questi recettori.

Le peculiarità evidenziate a seguito dell'attivazione dei recettori *delta* e, soprattutto, le potenzialità espresse dagli agonisti selettivi dei recettori *delta* nel potenziare l'effetto analgesico

degli agonisti *mu* limitando gli effetti collaterali a questi associati, ha portato all'individuazione di nuove classi di composti di sintesi con affinità e selettività per questo sottotipo recettoriale degli oppioidi. In relazione alla distribuzione dei recettori degli oppioidi delta e sulla base di un loro coinvolgimento nella modulazione di altre patologie e disturbi, gli stessi composti sono stati anche proposti quali potenziali nuove entità chimiche per altre applicazioni terapeutiche, con particolare riferimento ad ansia, depressione, tosse, disfunzioni sessuali, eiaculazione precoce, problemi cardiovascolari, neurodegenerazione, patologie autoimmuni, abuso di sostanze e dipendenza.¹²⁻¹⁴

In particolare sono stati sviluppati a livello preclinico composti afferenti ad una classe di derivati morfiniti, rivendicati dalla domanda di brevetto US2004/067959,⁴⁸ caratterizzati dalla formula generale riportata in Figura 1, in cui R₁, R₂, R₃ e R₄ hanno vari significati come riportato nella domanda di brevetto.

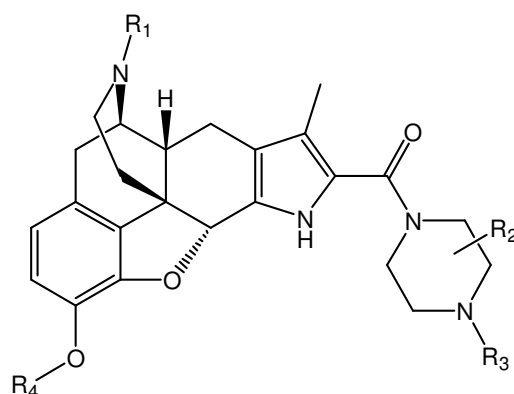


Figura 1. Struttura generale di composti delta selettivi derivati dalla morfina.

Altre classi di composti agonisti selettivi dei recettori oppioidi delta sono descritte in diverse domande di brevetto e brevetti.⁴⁹⁻⁵² A titolo di esempio, le strutture generali di alcune delle classi rivendicate sono state riportate in Figura 2, in cui i diversi sostituenti hanno i significati riportati nelle corrispondenti domande di brevetto.

Un'ulteriore classe di ligandi selettivi dei recettori delta è rappresentata dai derivati peptidici a terminazione 2',6' dimetil-L-tirosina (Dmt)/acido 1,2,3,4-tetraidroisochinolino-3-carbossilico (Tic) sviluppati dal gruppo di ricerca del Professor Salvadori dell'Università di Ferrara.⁵³⁻⁵⁷

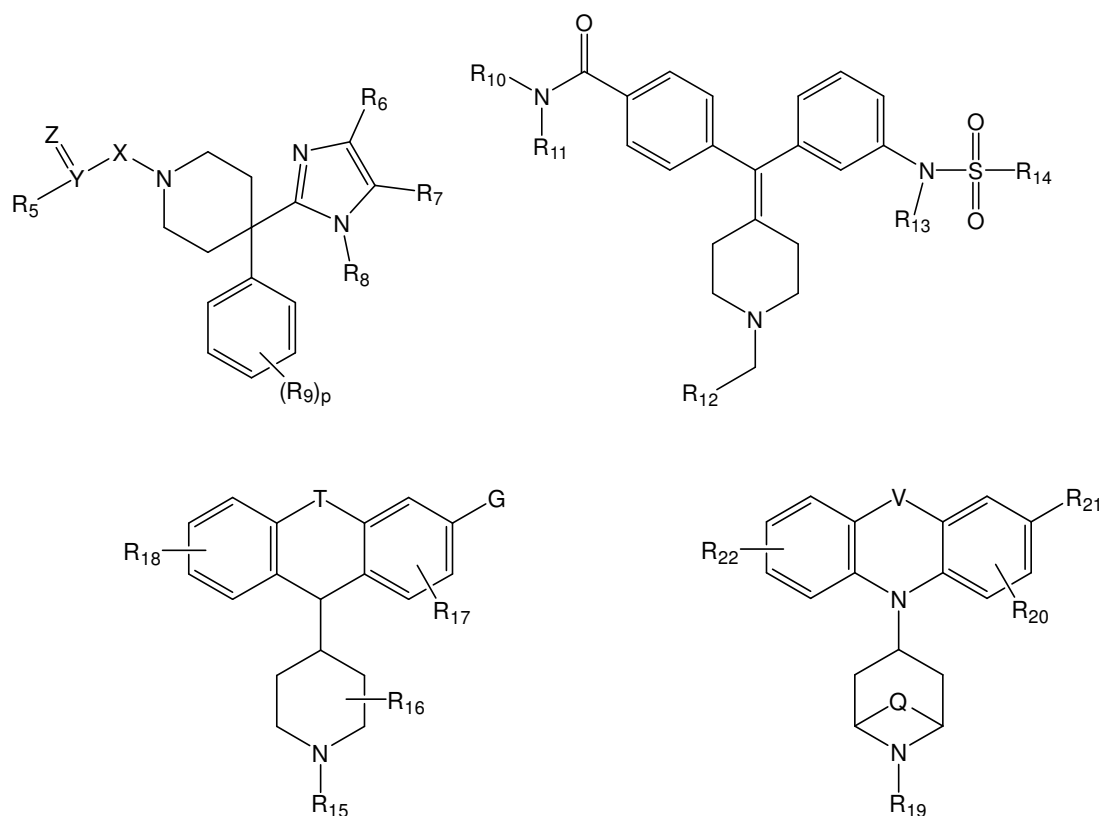


Figura 2. Struttura generale di composti delta selettivi rivendicati da alcune domande di brevetto.

Tra i diversi ligandi selettivi dei recettori *delta*, di particolare interesse sono risultati i composti **TAN-67** e **ADL5859**,⁵⁸⁻⁵⁹ e, soprattutto, i derivati (+)-4-[(α -R)- α -((2S,5R)-4-allil-2,5-dimetil-1-piperazinil)-3-idrossibenzil]-N,N-dietilbenzamide e (+)-4-[(α -R)- α -((2S,5R)-4-allil-2,5-dimetil-1-piperazinil)-3-metossibenzil]-N,N-dietilbenzamide, rispettivamente denominati **(+)BW373U86** e **SNC80**,⁶⁰⁻⁶¹ le strutture dei quali sono riportate in Figura 3. La valutazione farmacologica di questi composti non è stata limitata solo alle potenzialità analgesiche, ma anche a quelle ansiolitiche e antidepressive. In particolare, **SNC80** è stato valutato con successo in differenti modelli animali, sia di dolore che di ansia e depressione, fino a comprendere saggi basati sull'uso di primati. Tuttavia il conseguente sviluppo clinico è stato limitato, principalmente in relazione all'attività convulsiva mostrata dal composto in modelli animali di roditori.

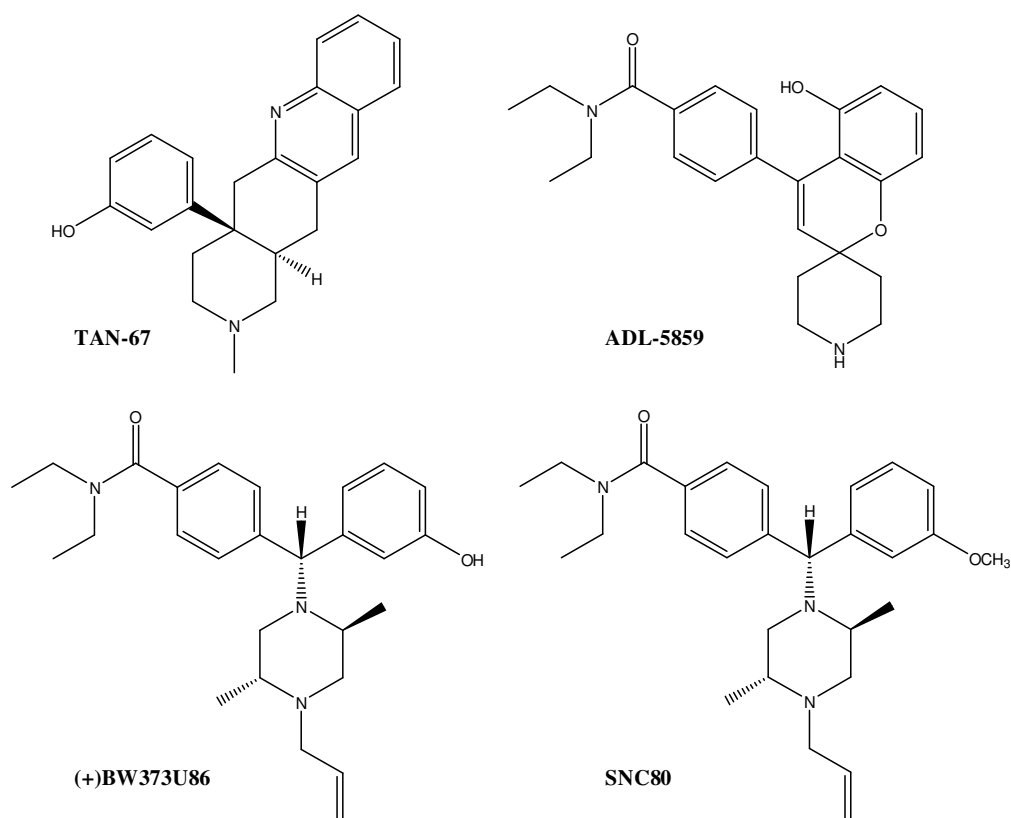


Figura 3. Struttura chimica di alcuni agonisti selettivi dei recettori *delta*.

In relazione all'interessante profilo farmacologico mostrato da **SNC80**, nell'ambito della collaborazione tra il gruppo di ricerca del Professor G.A.Pinna e PharmaNess Scarl, erano state precedentemente individuate e sviluppate due nuove classi di diazatricicloalcani (Serie **IA** e Serie **IB**) aventi affinità e selettività per i recettori degli oppioidi *delta*. Detti composti erano caratterizzati da sostituenti analoghi a quelli dell'agonista *delta* di riferimento **SNC80** in corrispondenza dei due atomi di azoto (Figura 4).⁶²

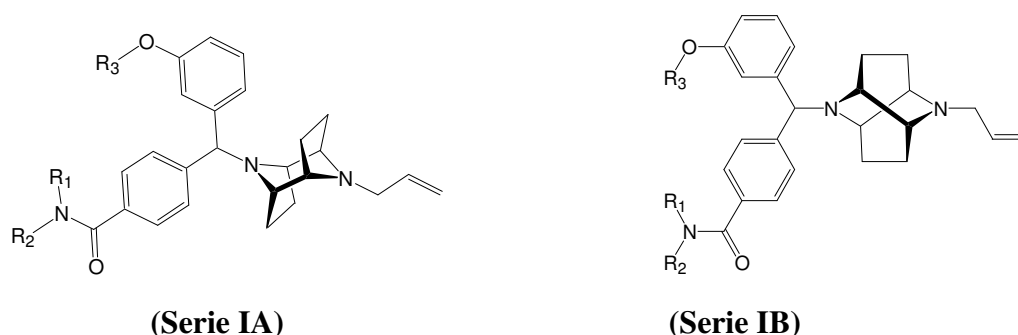


Figura 4: Formule di struttura delle due serie di diazatricicloalcani precedentemente sintetizzati e caratterizzati da elevata affinità e selettività per i recettori degli oppioidi *delta*.⁶²

Nel corso della presente ricerca si è voluto estendere lo studio precedentemente condotto, sostituendo i nuclei dei composti delle serie **IA** e **IB** con strutture diazabiccicloalcaniche, ottenibili con procedure preparative esemplificate rispetto a quelle inerenti la sintesi dei composti riportati in Figura 4. In particolare l'attenzione è stata rivolta verso l'ottenimento di nuovi potenziali agonisti dei recettori degli oppioidi *delta* afferenti a nuove classi caratterizzate dalle strutture base diazabiccicloalcaniche riportate in Figura 5.

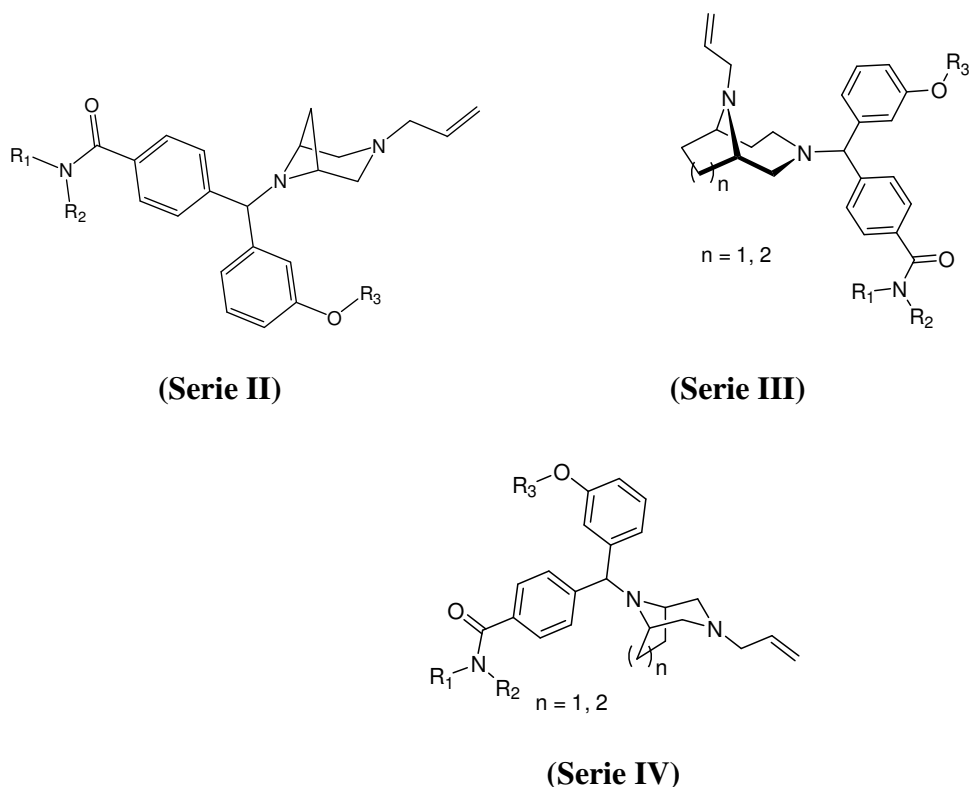


Figura 5. Formule di struttura delle nuove serie di diazabiccicloalcani con potenziale affinità e selettività per i recettori degli oppioidi *delta*.

Per ciascuna delle nuove classi sopra riportate sono stati sintetizzati i capostipiti recanti in corrispondenza dei due atomi di azoto gli stessi sostituenti presenti nel composto *delta* agonista di riferimento **SNC80**. Allo scopo di validare le strategie di *medicinal chemistry* adottate, ai fini dell'individuazione di nuovi potenziali agonisti dei recettori degli oppioidi *delta*, i composti sintetizzati sono stati caratterizzati sia in termini di affinità e selettività per i recettori degli oppioidi che rispetto alla loro attività intrinseca.

2.2 Sintesi

Quale capostipite della nuova **Serie II**, nel corso della ricerca è stato in particolare sintetizzato il composto **4-[(3-allil-3,6-diaza biciclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietil benzamide (1)**, denominato **101DBE** (Figura 6).

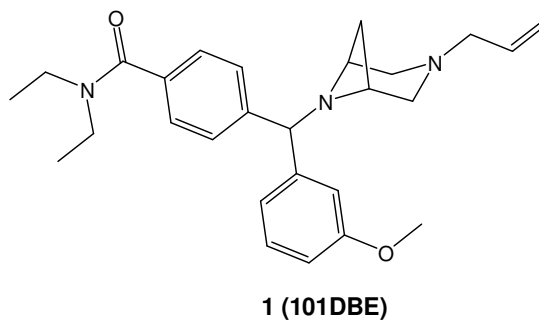
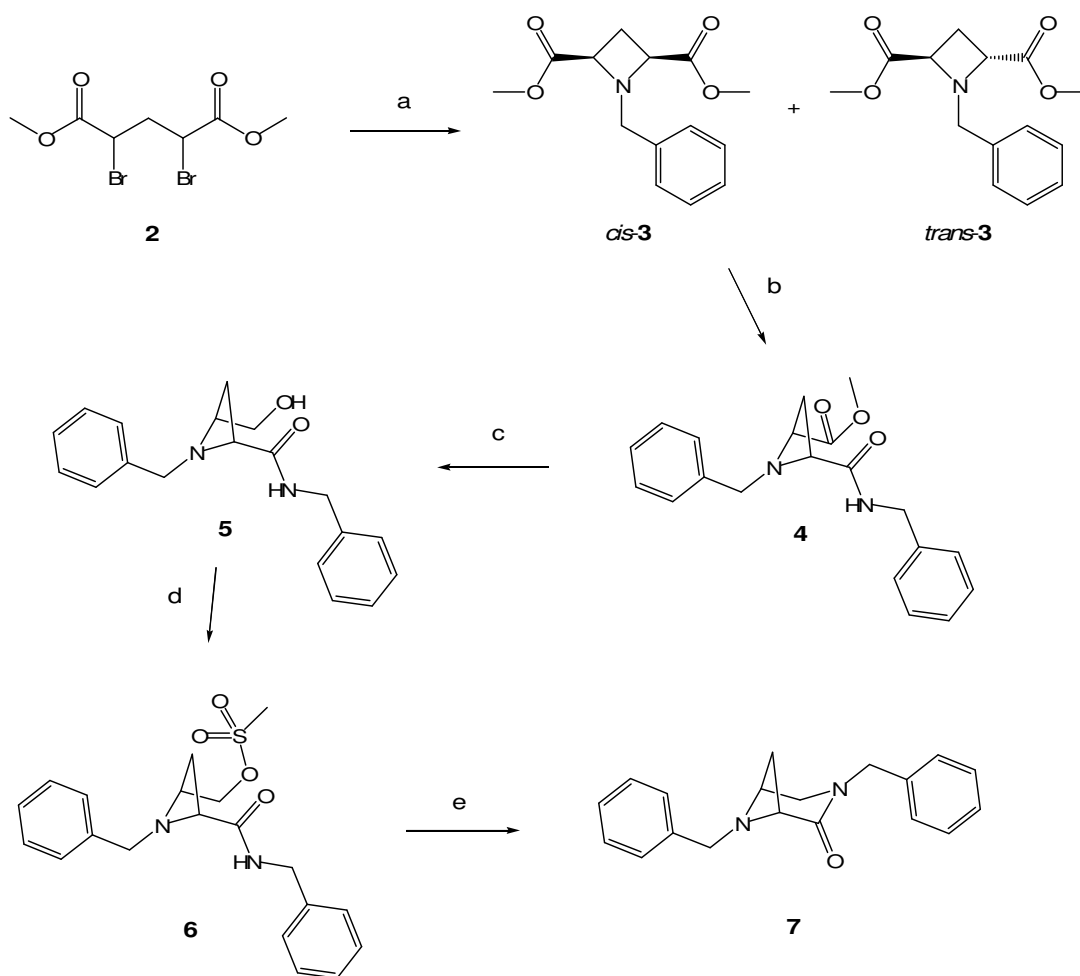


Figura 6. Formula di struttura del composto **4-[(3-allil-3,6-diaza biciclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietil benzamide (101DBE)**.

La sintesi del composto è stata condotta utilizzando in parte alcuni stadi di un processo riportato in letteratura, precedentemente sviluppato per la preparazione di composti diazabicycloeptani con affinità per i recettori degli oppioidi *mu*.⁶³ In particolare il composto **1** è stato sintetizzato secondo il processo riportato negli Schemi 1 e 2.

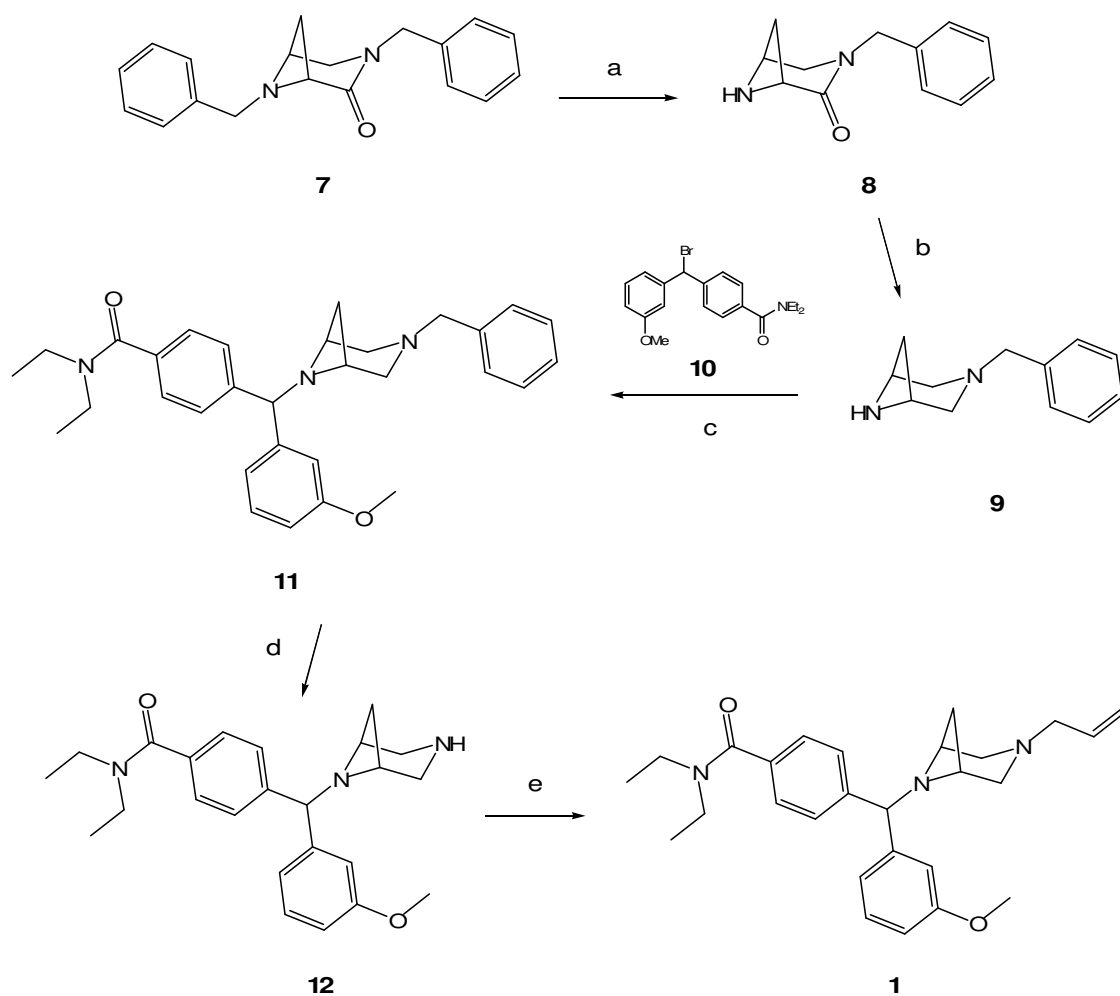
La reazione del dibromoderivato **2** con benzilammina in *N,N*-dimetilformammide a 80 °C ha permesso di ottenere una miscela delle azetidine isomere *cis*-**3** e *trans*-**3**, facilmente separabili per cromatografia flash (Schema 1).⁶³ Il trattamento di *cis*-**3** con un equivalente di benzilammina in toluene a riflusso ha portato in buona resa alla monoammide **4**. Il mesilato **6** è stato preparato attraverso la riduzione selettiva del gruppo estereo di **4** con sodioboroidruro in metanolo e successiva protezione del gruppo alcolico così ottenuto con cloruro di mesile. La reazione di ciclizzazione di **6** a diazabicycloeptanone **7** in condizioni di trasferimento di fase è stata realizzata utilizzando idrossido di sodio finemente polverizzato e tetrabuttilammonioiodrogeno solfato (TBAHS) in toluene a riflusso.⁶³



Scheme 1. Reagenti e condizioni: a) BnNH₂, DMF, 80°C; b) BnNH₂, toluene, 110°C; c) NaBH₄, MeOH, T.amb.; d) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C; e) NaOH, K₂CO₃, TBAHS, toluene, 110°C.

Come mostrato nello Schema 2, in accordo con quanto riportato in letteratura,⁶³ la debenzilazione catalitica selettiva dell'atomo di azoto amminico in posizione 6 del sistema diazabiccicloalcanico di **7** e la riduzione del lattame **8** con litio alluminio idruro in tetraidrofurano a temperatura ambiente, hanno consentito di preparare l'intermedio chiave diazaeptanico monoprotetto **9**.

L'alchilazione di **9** con il bromuro benzidrilico **10**, seguita dalla deprotezione di **11** per idrogenazione catalitica con Pd/C in etanolo ed infine la reazione di *N*-allilazione di **12** in acetonitrile a temperatura ambiente hanno condotto al 3,6-diazabiccicloeptano **1**.



Schema 2. Reagenti e condizioni: a) H_2 , Pd/C, EtOH, $60^\circ C$; b) $LiAlH_4$, THF, T.amb.; c) K_2CO_3 , CH_3CN , $80^\circ C$; d) H_2 , Pd/C, EtOH, T.amb.; e) bromuro di allile, K_2CO_3 , CH_3CN , T.amb.

Allo scopo di ampliare ulteriormente lo studio, l'attività di ricerca è stata mirata verso la sostituzione dell'anello 3,6-diazabiccioeptanico di **101DBE** con altri anelli diazabiccicoalcanici (Figura 7).

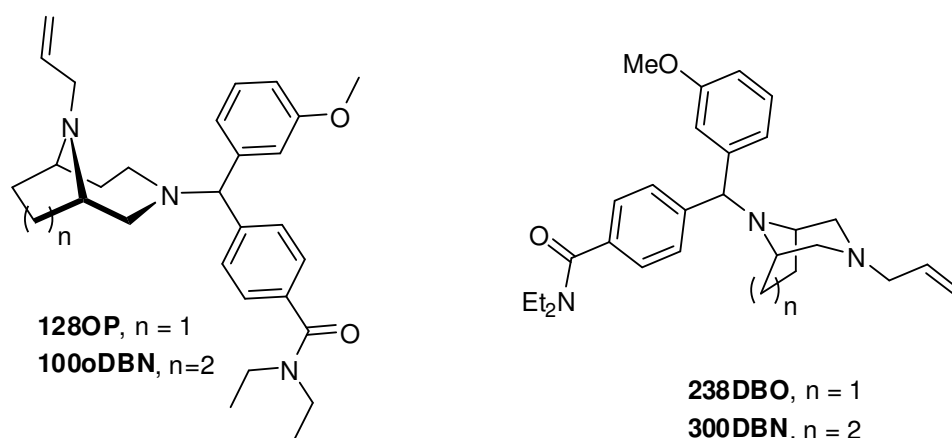
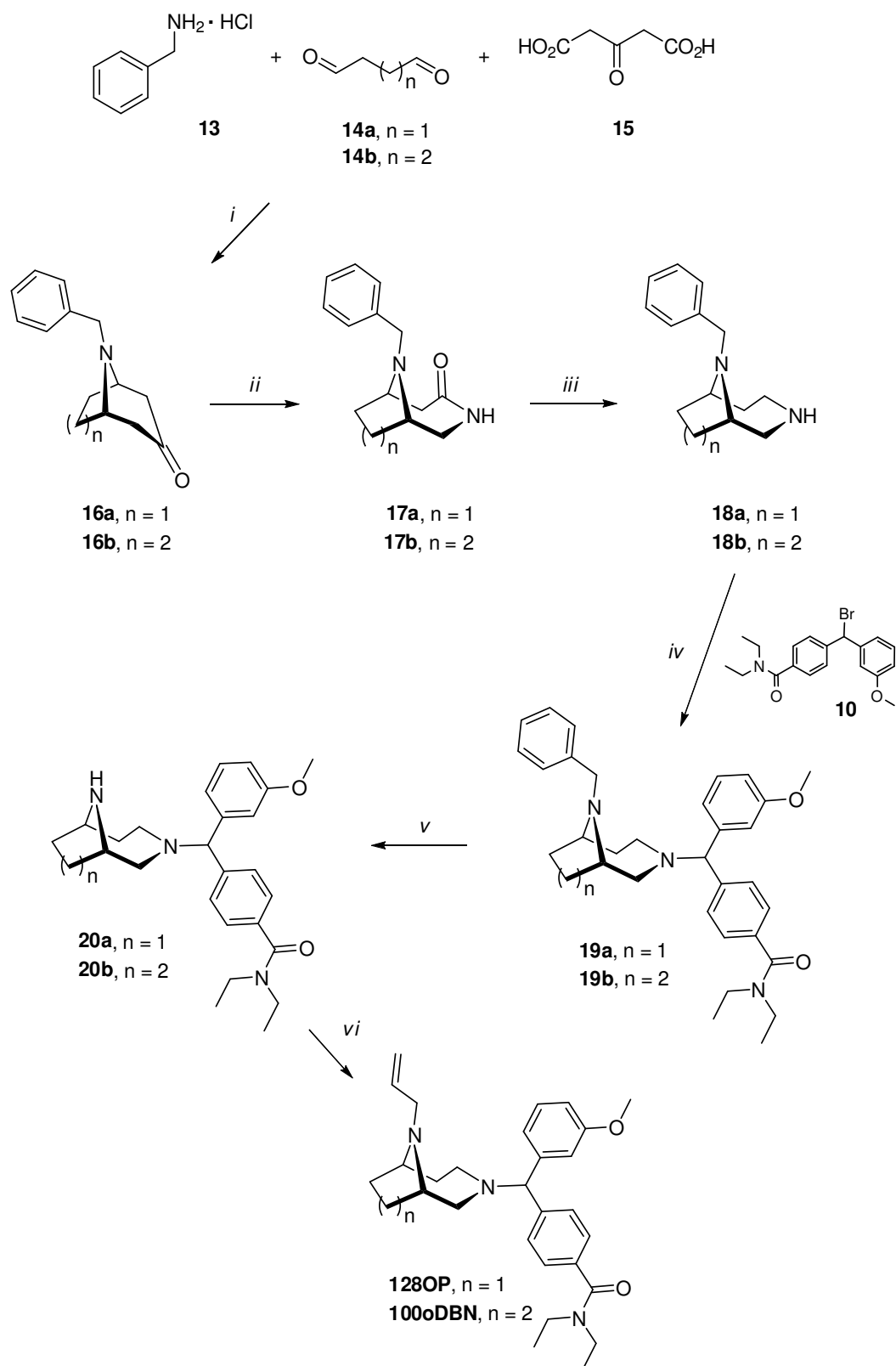


Figura 7. Formula di struttura dei composti **128OP**, **100oDBN**, **238DBO** e **300DBN**.

I composti **4-[(9-allil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide** e **4-[(10-allil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide**, denominati rispettivamente **128OP** ($n=1$) e **100oDBN** ($n=2$), sono stati sintetizzati secondo quanto descritto nello Schema 3.

I chetoni **16** sono stati preparati mediante la classica reazione di Robinson-Schöpf che prevedeva la contemporanea condensazione tra la benzilammina cloridrata (**13**), l'opportuna dialdeide **14** e l'acido 1,3-acetondicarbossilico (**15**).

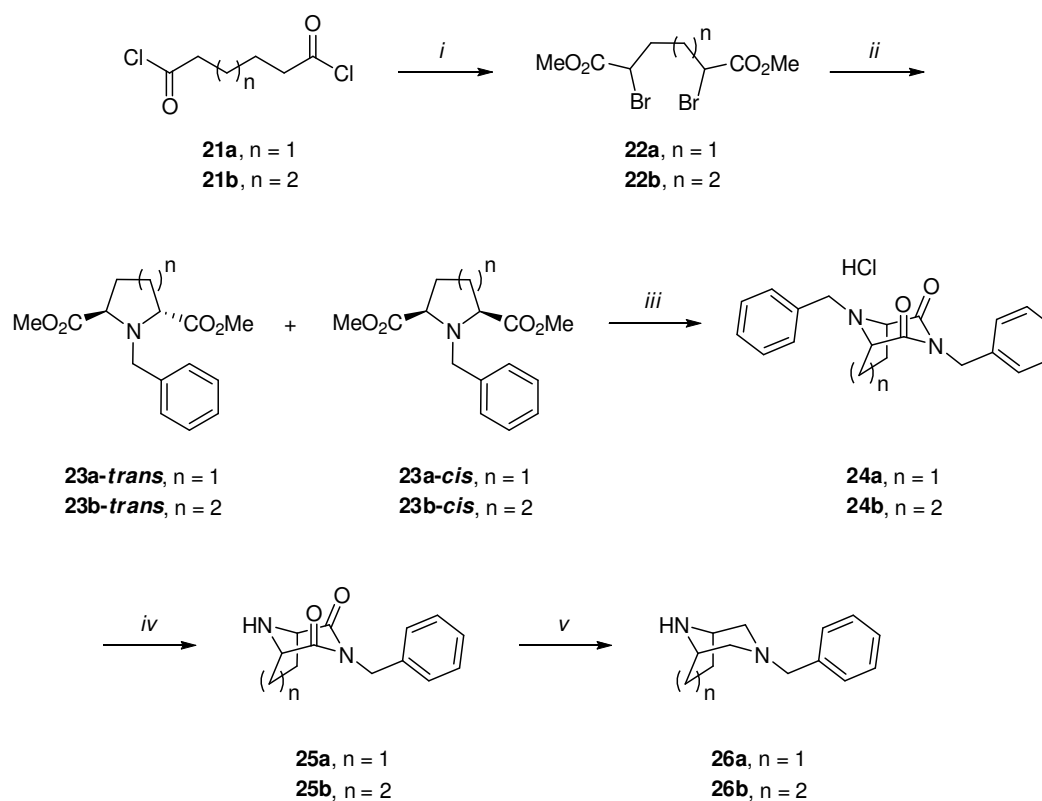


Schema 3. Reagenti e condizioni: (i) HCl 37%, AcONa 10%, H₂O, 50°C; (ii) H₂SO₄, NaN₃, CHCl₃, 60°C; (iii) LiAlH₄, THF; (iv) K₂CO₃, CH₃CN, 80°C; (v) H₂, Pd/C, EtOH, 3 atm, 60°C; (vi) bromuro di allile, K₂CO₃, acetone, 60°C.

I chetoni **16** nelle condizioni di reazione di Schmidt con acido solforico concentrato e sodio azide, hanno fornito gli amminolattami **17** che sono stati di seguito ridotti a diammine **18** con litio alluminio idruro in tetraidrofurano anidro.

L'alchilazione delle ammine **18** con il bromuro benzidrilico **10**, seguita dalla deprotezione dei diazaalcani **19** per idrogenazione catalitica con Pd/C in etanolo e, infine, la reazione di *N*-alililazione delle ammine **20** in acetone a refluxo hanno condotto ai diazabiccicloalcani **128OP** ($n=1$) e **100oDBN** ($n=2$).

I composti **4-[(3-allil-3,8-diazabicciclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil) metil]-*N,N*-diethylbenzamide** e **4-[(3-Allil-3,9-diazabicciclo [3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethylbenzamide**, denominati rispettivamente **238DBO** ($n=1$) e **300DBN** ($n=2$), sono stati invece preparati attraverso la sequenza sintetica mostrata negli Schemi 4 e 5.

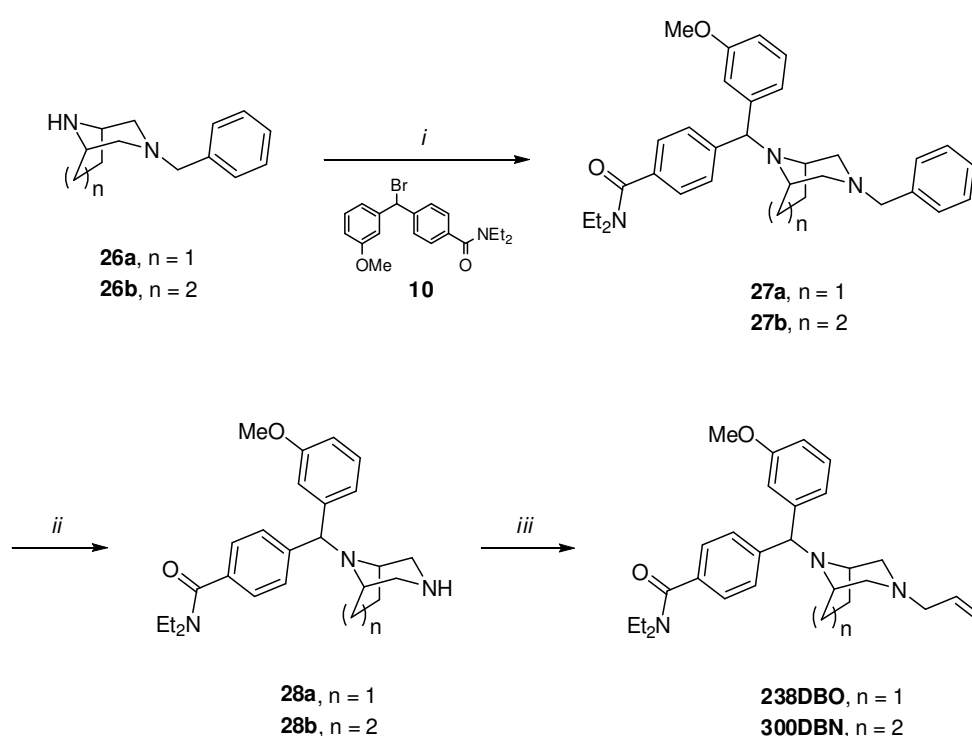


Schema 4. Reagenti e condizioni: (i) Br₂, MeOH, 90°C; (ii) benzilammina, toluene, 80°C; (iii) a) benzilammina, toluene, 110°C, b) 170-200°C, c) Et₂O/HCl; (iv) a) H₂, Pd/C, EtOH, 3 atm, b) 10% Na₂CO₃; (v) LiAlH₄, THF.

I cloruri acilici **21** sono stati convertiti nei corrispondenti dibromoderivati **22** utilizzando Br₂ e metanolo ed irraggiando la miscela di reazione con una lampada da 300 W (Schema 4). La

reazione dei dibromoderivati **22** con benzilammina a caldo ha consentito l'ottenimento di una miscela delle pirrolidine (**23a**) o delle piperidine (**23b**) isomere *cis/trans*. Le miscele, trattate con un equivalente di benzilammina e riscaldate a secco a circa 200°C, hanno condotto rispettivamente ai sistemi diazabicycloalcanici **24a** e **24b**. La deprotezione dell'atomo di azoto basico di **14** per idrogenazione catalitica e la successiva riduzione delle immidi bicicliche **25** ha portato all'ottenimento delle diammine monoprotette **26**.⁶⁴⁻⁶⁵

Infine, in analogia con quanto sopra descritto relativamente all'ottenimento di **128OP** e **100oDBN** a partire dai composti **18a** e **18b** (Schema 3), l'alchilazione di **26** con il bromuro benzidrilico **10**, seguita dall'idrogenazione catalitica di **27** e dall'allilazione di **28** ha condotto ai derivati **238DBO** e **300DBN** (Schema 5).



Schema 5. Reagenti e condizioni: (i) K_2CO_3 , CH_3CN , 80°C; (ii) H_2 , Pd/C, EtOH, 3 atm, 60°C; (iii) bromuro di allile, K_2CO_3 , acetone, 60°C.

2.3 Affinità e selettività dei nuovi composti verso i recettori degli oppioidi *delta*

L'affinità dei nuovi composti sintetizzati **101DBE**, **128OP**, **100oDBN**, **238DBO** e **300DBN** per i recettori degli oppioidi *mu* (μ), *delta* (δ) e *kappa* (κ) è stata determinata tramite *radioreceptor binding assays*, usando quali ligandi radiomarcati rispettivamente 3H -DAMGO,

³H-DPDPE e ³H-U6953. Gli esperimenti di *binding* sono stati condotti secondo il metodo descritto in letteratura.⁶²

Sono stati utilizzati topi maschi CD1 del peso di 20-25gr. Gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale ed il cervello in toto (escluso il cervelletto) è stato rapidamente dissezionato e mantenuto in ghiaccio. Il tessuto è stato omogeneizzato in 40 volumi (p/v) di tampone Tris-HCl (50mM, pH 7,4) e centrifugato per 20 minuti a 48.000xg in una centrifuga refrigerata a 4°C. Il pellet risultante è stato risospeso nello stesso tampone e incubato a 37°C per 45. Al termine dell'incubazione, la sospensione è stata centrifugata 48.000xg per 30 minuti ed il pellet così ottenuto è stato risospeso in tampone Tris-HCl. La risultante sospensione di membrane cerebrali, è stata usata per i saggi di *binding*. I saggi di *binding* sono stati condotti in un volume di 2 mL (recettore μ e δ) e di 1 mL (recettore k) alla temperatura di 25°C, con 50-100 μ g (recettore μ e δ) e 800-1000 μ g di proteine (recettore k) in ciascun campione. L'incubazione è stata condotta per 60 minuti in presenza di 1 nM di [³H]-[D-Ala²,MePhe⁴,Gly-ol⁵] encefalina (56,8 Ci/mmol) o 1 nM di (2-D-Penicillamina,5-D Penicillamina) [Tyrosyl-3,5-³H (N)] encefalina (25,2 Ci/mmol) o 1 nM di [³H]-³H-U-69,593 (41,7 Ci/mmol), rispettivamente per lo studio dei recettori μ , δ , k. Il binding non specifico è stato determinato per i recettori μ e δ in presenza di naloxone (10 μ M), mentre per il recettore k con U-69,593 (10 μ M). Per la costruzione delle curve di competizione sono state utilizzate nove concentrazioni dei composti di riferimento. L'incubazione è stata interrotta mediante rapida filtrazione per mezzo di un apparecchio da filtrazione (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) utilizzando filtri GF/B (Whatman). I filtri sono stati lavati per tre volte a 4°C con cinque mL di tampone Tris HCl (50 mM), pH 7,4. La radioattività è stata determinata per mezzo di uno scintillatore in fase liquida (Tricarb 2100, Packard, Meridien, IL, USA), utilizzando 4 mL di fluido scintillante (Ultima Gold MV, Packard, Meridien, IL, USA). La determinazione delle proteine è stata eseguita con il metodo di Bradford utilizzando il protocollo e i reagenti forniti dalla Bio-Rad (Milano, Italia).⁶⁶ Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed i risultati confermati in cinque esperimenti indipendenti.

L'elaborazione dei risultati e l'estrapolazione dei valori delle IC₅₀ (concentrazione che inibisce il 50 % del binding specifico) è stata effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism. I valori sperimentali di IC₅₀ sono stati trasformati in K_i utilizzando l'equazione di Cheng-Prusoff.⁶⁷

I risultati ottenuti dai saggi di *binding*, espressi come valore medio di $K_i \pm SEM$, sono indicati in Tabella 1. I nuovi composti sintetizzati sono stati confrontati con l'agonista *delta* di riferimento **SNC80** e con la morfina.

Tabella 1: Affinità e selettività dei composti per i recettori degli oppioidi.

Composto	Affinità K_i (nM)			Selettività δ/μ
	μ	δ	k	
128OP	183±4,4	1,84±0,03	2450±50	1:99,46
100oDBN	950±150	9,1±0,77	4250±750	1:104,4
238DBO	3833±220	0,34±0,02	300±50	1:11273
300DBN	2267±176	1,88±0,07	2200±400	1:1206
101DBE	1150±76	1,76±0,09	4000±800	1:653
SNC80	2383±142	0,71±0,06	2750±250	1:3356
Morfina	1,69±0,2	111±7	263±14	1:0,015

Tutti i nuovi composti sintetizzati hanno mostrato elevata affinità e selettività per i recettori degli oppioidi *delta*, con profili recettoriali analoghi a quello del composto di riferimento **SNC80**. L'attività condotta ha consentito di selezionare tra i nuovi composti **300DBN** e **238DBO** quali *leads* con migliorato profilo recettoriale. I due composti hanno infatti mostrato affinità per i recettori *delta* comparabile, o addirittura superiore, rispetto a **101DBE**, **128OP** e **100oDBN**, e una selettività significativamente più marcata. Tra i nuovi composti sintetizzati, **238DBO** è risultato addirittura più affine e selettivo verso i recettori *delta* rispetto al composto di riferimento **SNC80**.

2.4 Attività intrinseca dei nuovi composti

In analogia con quanto riportato per la caratterizzazione dei composti cannabinoidergici nel Capitolo 1 (Rif. paragrafi 1.2.3 e 1.3.3), la valutazione dell'attività intrinseca dei composti sintetizzati è stata effettuata mediante un saggio in vitro basato sulla determinazione dell'espressione della proteina p-ERK1/2. Come nel caso dei recettori dei cannabinoidi, infatti, il recettore degli oppioidi *delta* è un recettore accoppiato a proteine G (GPCRs) di membrana, la cui stimolazione determina l'attivazione di numerosi segnali intracellulari. Tra questi è riportata l'attivazione tramite fosforilazione di alcune chinasi, come ad esempio le Erk (Extracellular signal-regulated kinase), con particolare riferimento a p44 e p42 MAPK

(rispettivamente Erk1 e Erk2). Queste chinasi agiscono in una cascata di fosforilazione proteica coinvolta nella regolazione della differenziazione e crescita della cellula.⁶⁸

E' stato in particolare riportato che cellule di neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15 esprimono selettivamente i recettori degli oppioidi *delta* e che l'attivazione di detti recettori determina una *up-regulation* di P-ERK1/2.⁶⁹ Pertanto, è stato riscontrato che composti delta agonisti sono in grado di incrementare l'espressione della proteina ed il loro effetto è inibito dall'azione di composti antagonisti dei suddetti sottotipi recettoriali degli oppioidi.⁶⁹

La valutazione dell'attività intrinseca dei nuovi composti sintetizzati è stata condotta impiegando la linea cellulare di neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15 fornita dall'European Collection of Cell Cultures (ECACC) e acquistata per il tramite di Sigma-Aldrich. La procedura sperimentale adottata è stata analoga a quella riportata nel Capitolo 1, paragrafi 1.2.3 e 1.3.3. Il tempo di esposizione delle cellule ai composti da testare è stato di 20 minuti, sulla base di saggi preliminari tempo/risposta effettuati con il composto di riferimento **SNC80**. I nuovi composti sintetizzati sono stati testati fino alla dose in grado di evidenziare un'eventuale *up-regulation* significativa di P-ERK1/2 rispetto al veicolo. Al fine di assicurarsi che le risposte rilevate fossero effettivamente correlate alla modulazione dei recettori degli oppioidi delta, sono stati condotti anche saggi in cui è stato previsto un pretrattamento delle cellule con l'antagonista selettivo *delta* di riferimento Naloxone alla concentrazione di 500 nM. In accordo con il profilo determinato con il composto *delta* agonista di riferimento **SNC80**, un incremento significativo dell'espressione di P-ERK1/2 è stato rilevato tramite analisi Western-blot a seguito del trattamento di cellule NG108-15 con tutti i composti analizzati (Tabella 2; valori di P-ERK1/2 in assenza di Naloxone). L'attività delta agonista dei nuovi derivati è stata confermata attraverso l'inibizione degli effetti indotti dai nuovi composti sull'espressione di P-ERK1/2 da parte del composto antagonista di riferimento (Tabella 2; valori di P-ERK1/2 in presenza di Naloxone).

Tabella 2: Effetto di differenti dosi dei nuovi composti delta selettivi sull'espressione di P-ERK1/2 in cellule NG108-15 dopo 20 minuti di trattamento. I dati sono espressi come valore medio rispetto al veicolo (100%) \pm SEM e sono il risultato di cinque esperimenti indipendenti. *P<0.05 e **P<0.01 vs veicolo; #P<0.05 vs il ligando *delta* alla stessa concentrazione in assenza del pretrattamento con Naloxone.

Composto	Conc. Naloxone (nM)	P-ERK 1/2 (% vs veicolo)			
		Conc. Composto (nM)			
		25	50	100	200
SNC80	0	180 \pm 12**	----	----	----
	500	118 \pm 16#	----	----	----
128OP	0	115 \pm 9	170 \pm 20*	185 \pm 18**	----
	500	----	----	117 \pm 12#	----
100oDBN	0	112 \pm 14	128 \pm 17	150 \pm 8*	175 \pm 15**
	500	----	----	----	105 \pm 7#
238DBO	0	130 \pm 12	201 \pm 20**	----	----
	500	----	103 \pm 17#	----	----
300DBN	0	123 \pm 16	193 \pm 15**	----	----
	500	----	109 \pm 10#	----	----
101DBE	0	105 \pm 11	178 \pm 12*	----	----
	500	----	113 \pm 8#	----	----

2.5 Conclusioni

L'attività condotta ha consentito di individuare nuove classi di composti non-peptidici con affinità e selettività per i recettori degli oppioidi *delta*. I nuovi composti, caratterizzati da strutture base diazabiccicloalcaniche, sono ottenibili attraverso procedure sintetiche semplificate rispetto a quelle di analoghi composti diazatricicloalcanici che avevano ugualmente mostrato affinità e selettività per i recettori *delta*.⁶²

Composti di riferimento sintetizzati per ciascuna delle nuove classi individuate hanno mostrato profili recettoriali analoghi a quello del composto di riferimento **SNC80**. Tra i nuovi composti sintetizzati, **4-[(3-allil-3,8-diazabicciclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide** e **4-[(3-Allil-3,9-diazabicciclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide**, denominati rispettivamente **238DBO** e **300DBN**, hanno mostrato i migliori profili recettoriali in termini di affinità e selettività per i recettori *delta*. In particolare, **238DBO** è risultato addirittura più affine e selettivo per i recettori *delta* rispetto al composto di riferimento **SNC80**.

I saggi in vitro, basati sulla determinazione dell'espressione della proteina p-ERK1/2 a seguito dell'esposizione di cellule NG108-15 a **101DBE**, **128OP**, **100oDBN**, **238DBO** e **300DBN**,

hanno evidenziato per tutti i composti sintetizzati un profilo correlabile a quello di agonisti dei recettori degli oppioidi *delta*.

I risultati raggiunti hanno quindi permesso di individuare nuovi agonisti *delta*, ottenibili attraverso procedure sintetiche facilmente scalabili, che potrebbero essere sviluppati (i) come potenziali nuovi analgesici, eventualmente in combinazione con oppioidi *mu*, *e/o* (ii) come nuove entità chimiche per il trattamento di altre patologie, con particolare riferimento all'ansia e alla depressione.

2.6 Referenze

1. Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. **2008**, *11*, S133-S153.
2. Chang K.I., Blanchard S.G., Cautrecasas P. Benzomorphan sites are ligand recognition sites of putative epsilon receptors. *Molecular Pharmacology*. **1984**, *26*, 484-488.
3. Minami M., Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci.Res.* **1995**, *23*, 121-145.
4. Kane B.E., Svensson B., Ferguson D.M. Molecular Recognition of Opioid Receptor Ligands. *The AAPS Journal*. **2006**, *8*, E126-E137.
5. Jordan B.A., Cvjic S., Devi L.A. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology*. **2000**, *23*, S5-S18.
6. Pacheco D.F., Reis G.M.L., Francischi J.N., Castro M.S.A., Perez A.C., Duarte I.D.G. δ -opioid receptor agonist elicits peripheral antinociception via δ_1 e δ_2 receptors and activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sciences*. **2005**, *78*, 54-60.
7. Peters D., Olsen G.M., Nielsen E.O. Diazabicyclononane and decane derivatives and their use as opioid receptor ligands. US7,358,243. **2008**.
8. Jan S.T., Chang K.J., Biciunas K.P., Ma X. Compositions of novel opioid compounds and method of use thereof. US7,683,168. **2010**.
9. Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Castanas E. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **1996**, *296*, 199-207.
10. Stephan D.D., Vestre W.A., Stiles J., Krohne S. Changes in intraocular pressure and pupil size following intramuscular administration of hydromorphone hydrochloride and acepromazine in clinically normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*. **2003**, *6*, 73-76.

11. Glass M.J., Billington C.J., Levine A.S. Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides*. **1999**, 33, 360-368.
12. Dondio G., Ronzoni S., Petrillo P. Non-peptide δ opioid agonists and antagonists. *Expert Opin.Ther.Pat.* **1997**, 7, 1075-1098.
13. G. Dondio, S. Ronzoni, P. Petrillo. Non-peptide δ opioid agonists and antagonists (Part II). *Expert Opin.Ther.Pat.* **1999**, 9, 353-374.
14. Kotzer C.J., Hay D.W.P., Dongio G., Giardina G., Petrillo P., Underwood D.C. The antitussive activity of δ -opioid receptor stimulation in guinea pigs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **2000**, 292, 803-809.
15. Pradhan A.A., Befort K., Nozaki C., Gavériaux-Ruff C., Kieffer B.L. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol.Sci.* **2011**, 32, 581-590.
16. Sauriyal D.S., Jaggi A.S., Singh N. Extending pharmacological spectrum of opioids beyond analgesia: Multifunctional aspects in different pathophysiological states. *Neuropeptides*. **2011**, 45, 175-188.
17. Hudzik T.J., Howell A., Payza K., Cross A.J. Antiparkinson potential of δ -opioid receptor agonists. *Eur.J.Pharmacol.* **2000**, 396, 101-107.
18. Mathieu-Kia A.M., Fan L.Q., Kreek M.J., Simon E.J., Hiller J. M. μ -, δ - and κ -opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* **2001**, 893, 121-134.
19. Tegeder I., Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanism and revealing new indications. *Pharmacol.Rev.* **2004**, 56, 351-369.
20. Watson M.J., Holt J.D.S., O'Neill S.J., Wei K., Pendergast W., Gross G.J., Gengo P.J., Chang K.J. ARD-353 [4-((2R,5S)-4-(R)-(4-diethylcarbamoylphenyl)(3-hydroxyphenyl)methyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-ylmethyl]benzoic acid], a novel nonpeptide δ receptor agonist, reduces myocardial infarct size without central effects. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **2006**, 316, 423-430.
21. Barry U., Zuo Z. Opioids: old drugs for potential new applications. *Curr.Pharm.Des.* **2005**, 11, 1343-1350.
22. Pol O., Palacio J.R., Puig M.M. The expression of δ - and κ -opioid receptors is enhanced during intestinal inflammation in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **2003**, 306, 455-462.

23. Manchikanti L., Fellows B., Ailinani H., Pampati V. Therapeutic use, abuse, and nonmedical use of opioids: a ten-year perspective. *Pain Physician*. **2010**, *13*, 401-435.
24. Bekhit M.H. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance. *Am.J.Ther.* **2010**, *17*, 498-510.
25. Ballantyne J.C., Shin N.S. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin.J.Pain.* **2008**, *24*, 469-478.
26. Benyamin R., Trescot A.M., Datta S., Buenaventura R., Adlaka R., Sehgal N., Glaser S.E., Vallejo R. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*. **2008**, *11*, S105-S120.
27. Grecksch G., Bartzsch K., Widera A., Becker A., Hollt V., Koch T. Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **2006**, *186*, 177-184.
28. Liu J.G., Anand K.J. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **2001**, *38*, 1-19.
29. Chen B.T., Hopf F.W., Bonci A. Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* **2010**, *1187*, 129-139.
30. Porreca F., Mosberg H.I., Hurst R., Hruby V.J., Burks T.F. Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1984**, *230*, 341-348.
31. Wild K.D., McCormick J., Bilsky E.J., Vanderah T., McNutt R.W., Chang K.J., Porreca F. (1993). Antinociceptive actions of BW373U86 in the mouse. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993, *267*, 858-865.
32. Negus S.S., Butelman E.R., Chang K.J., DeCosta B., Winger G., Woods J.H. Behavioral effects of the systemically active delta opioid agonist BW373U86 in rhesus monkeys. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1994**, *270*, 1025-1034.
33. Lazarus L.H., Bryant S.D., Cooper P.S., Salvadori S. What peptides these deltorphins be. *Prog.Neurobiol.* **1999**, *57*, 377-420.
34. Gallantine E.L., Meert T.F. A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* **2005**, *97*, 39-51.
35. Ma J., Zhang Y., Kalyuzhny A.E., Pan Z.Z. Emergence of functional δ -opioid receptors induced by long-term treatment with morphine. *Mol.Pharmacol.*; **2006**, *69*, 1137-1145.
36. Abdelhamid E.E., Sultana M., Portoghese P.S., Takemori A.E. Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1991**, *258*, 299-303.

37. Zhu Y., King M.A., Schuller A.G., Nitsche J.F., Reidl M., Elde R.P., Unterwald E., Pasternak G.W., Pintar J.E. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*. **1999**, *24*, 243-252.
38. Schiller P.W., Weltrowska G., Berezowska I., Nguyen T.M., Wilkes B.C., Lemieux C., Chung N.N. The TIPP opioid peptide family: development of delta antagonists, delta agonists, and mixed mu agonist/delta antagonists. *Biopolymers*. **1999**, *51*, 411-425.
39. Gomes I., Gupta A., Filipovska J., Szeto H.H., Pintar J.E., Devi L.A. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. **2004**, *101*, 5135-5139.
40. Bilsky E.J., Calderon S.N., Wang T., Bernstein R.N., Davis P., Hruby V.J., McNutt R.W., Rothman R.B., Rice K.C., Porreca F. SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. **1995**, *273*, 359-366.
41. Stewart P.E., Hammond D.L. (1994). Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. **1994**, *268*, 701-708.
42. Cahill C.M., Morinville A., Hoffert C., O'Donnell D., Beaudet A. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain*. **2003**, *10*, 199-208.
43. Mika J., Przewłocki R., Przewłocka B. The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur.J.Pharmacol*. **2001**, *415*, 31-37.
44. Cahill C.M., Morinville A., Lee M.C., Vincent J.P., Collier B., Beaudet A. Prolonged morphine treatment targets δ opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances δ -mediated antinociception. *J.Neurosci*. **2001**, *21*, 7598-7607.
45. Patwardhan A.M., Berg K.A., Akopain A.N., Jeske N.A., Gamper N., Clarke W.P., Hargreaves K.M. Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the δ -opioid receptor in trigeminal nociceptors. *J.Neurosci*. **2005**, *25*, 8825-8832.
46. Bie B., Pan Z.Z. Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain*. **2007**, *3*:37.
47. Gendron L., Pintar J.E., Chavkin C. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience*. **2007**, *150*, 807-817.
48. Dondio G., Gagliardi S., Graziani D., Luca F. Morphinoid derivatives as delta-opioid agonists and antagonists. US2004/067959. **2004**.

49. Janssen F., Leenarts J., Fernandez-Galdea F., Gomez-Sanchez A., Meert T.F. Novel substituted 4-phenyl-4[H-imidazol-2-yl]-piperidine derivatives and their use as selective non-peptide delta opioid agonists. US2008/0096925. **2008**.
50. Brown W., Griffin A., Walpole C. 4-{3'(sulfonylamino)phenyl-1-(cyclymethyl)piperidin-4-ylidene-methyl}benzamide derivative sas delta opioid receptor ligands for the treatment of pain, anxiety and functional gastrointestinal disorder. US2006/0148850. **2006**.
51. Carson J., Scott D., Decorte B., Liu L., McDonnel M., McNally J.J. Tricyclic delta-opioid modulators. US2006/135522. **2006**.
52. Coats S., Scott D., Decorte B., Liu L., McDonnel M., McNally J.J. Tricyclic delta-opioid modulators. US2006/0135763. **2006**.
53. Salvadori S., Balboni G., Guerrini R., Tomatis R., Bianchi C., Bryant S.D., Cooper P.S., Lazarus L.H. Evolution of the Dmt-Tic pharmacophore: N-terminal methylated derivatives with extraordinary delta opioid antagonist activity. *J.Med.Chem.* **1997**, *40*, 3100-3108.
54. Salvadori S., Trapella C., Fiorini S., Negri L., Lattanzi R., Bryant S.D., Jinsmaa Y., Lazarus L.H., Balboni G. A new opioid designed multiple ligand derived from the micro opioid agonist endomorphin-2 and the delta opioid antagonist pharmacophore Dmt-Tic. *Bioorg.Med.Chem.* **2007**, *15*, 6876-6881.
55. Salvadori S., Fiorini S., Trapella C., Porreca F., Davis P., Sasaki Y., Ambo A., Marczak E.D., Lazarus L.H., Balboni G. Role of benzimidazole (Bid) in the delta-opioid agonist pseudopeptide H-Dmt-Tic-NH-CH(2)-Bid (UFP-502). *Bioorg.Med.Chem.* **2008**, *16*, 3032-3038.
56. Balboni G., Salvadori S., Guerrini R., Negri L., Giannini E., Jinsmaa Y., Bryant S.D., Lazarus L.H. Potent delta-opioid receptor agonists containing the Dmt-Tic pharmacophore. *J Med Chem.* **2002**, *45*, 5556-5563.
57. Balboni G., Onnis V., Congiu C., Zotti M., Sasaki Y., Ambo A., Bryant S.D., Jinsmaa Y., Lazarus L.H., Trapella C., Salvadori S. Effect of lysine at C-terminus of the Dmt-Tic opioid pharmacophore. *J.Med.Chem.* **2006**, *49*, 5610-5617.
58. Nagase H., Kawai K., Hayakawa J., Wakita H., Mizusuna A., Matsuura H., Tajima C., Takezawa Y., Endoh T. Rational drug design and synthesis of a highly selective nonpeptide δ -opioid agonist, (4aS*,12aR*)-4a-(3-hydroxyphenyl)-2-methyl-1,2,3,4,4a,5,12,12a-octahydropyrido[3,4-b]acridine (TAN-67). *Chem.Pharm.Bull.* **1998**, *46*, 1695-1702.
59. Le Bourdonnec B., Windh R.T., Ajello C.W., Leister L.K., Gu M., Chu G.H., Tuthill P.A., Barker W.M., Koblish M., Wiant D.D., Graczyk T.M., Belanger S., Cassel J.A., Feschenko

- M.S., Brogdon B.L., Smith S.A., Christ D.D., Derelanko M.J., Kutz S., Little P.J., DeHaven R.N., DeHaven-Hudkins D.L., Dolle R.E. Potent, orally bioavailable delta opioid receptor agonists for the treatment of pain: discovery of *N,N*-diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5859). *J.Med.Chem.* **2008**, *51*, 5893-5896.
60. Nagase H., Kawai K., Hayakawa J., Wakita H., Mizusuna A., Matsuura H., Tajima C., Takezawa Y., Endoh T. Rational drug design and synthesis of a highly selective nonpeptide δ -opioid agonist, (4a*S**,12a*R**)-4a-(3-hydroxyphenyl)-2-methyl-1,2,3,4,4a,5,12,12a-octahydropyrido[3,4-*b*]acridine (TAN-67). *Chem.Pharm.Bull.* **1998**, *46*, 1695-1702.
61. Le Bourdonnec B., Windh R.T., Ajello C.W., Leister L.K., Gu M., Chu G.H., Tuthill P.A., Barker W.M., Koblish M., Wiant D.D., Graczyk T.M., Belanger S., Cassel J.A., Feschenko M.S., Brogdon B.L., Smith S.A., Christ D.D., Derelanko M.J., Kutz S., Little P.J., DeHaven R.N., DeHaven-Hudkins D.L., Dolle R.E. Potent, orally bioavailable delta opioid receptoragonists for the treatment of pain: discovery of *N,N*-diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5859). *J.Med.Chem.* **2008**, *51*, 5893-5896.
62. Chang K.J., Rigdon G.C., Howard J.L., McNutt R.W. A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1993**, *267*, 852-857.
63. Calderon S.N., Rothman R.B., Porreca F., Flippen-Anderson J.L., McNutt R.W., Xu H., Smith L.E., Bilsky E.J., Davis P., Rice K.C. Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(α R)- α -((2*S*,5*R*)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-*N,N*-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide δ opioid receptor agonist. *J.Med.Chem.* **1994**, *37*, 2125-2128.
64. Loriga G., Lazzari P., Ruiu S., Marchese G., Manca I., Casu G.L., Dessì C., Pinna G.A., Asproni B., Murineddu G. Synthesis and biological evaluation of novel delta (δ) opioid receptor ligands with diazatricyclodecane skeletons. *Eur.J.Med.Chem.* **2013**, *69*, 413-426.
65. Loriga G., Manca I., Murineddu G., Chelucci G., Villa S., Gessi S., Toma L., Cignarella G., Pinna G.A. Synthesis of 3,6-diazabicyclo[3.1.1]heptanes as novel ligands for the opioid receptors. *Bioorg.Med.Chem.* **2006**, *14*, 676-691.
66. Filosa R., Peduto A., de Caprariis P., Saturnino C., Festa M., Petrella A., Pau A., Pinna G.A., La Colla P., Busonera B., Loddo R. Synthesis and antiproliferative properties of N_{3/8}-

- disubstituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane analogues of 3,8-bis[2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridin-4-yl]methyl-piperazine, *Eur.J.Med.Chem.* **2007**, *42*, 293-306.
67. Pinna G.A., Murineddu G., Curzu M.M., Villa S., Vianello P., Borea P.A., Gessi S., Toma L., Colombo D., Cignarella G. Synthesis, modelling, and μ -opioid receptor affinity of *N*-3(9)-arylpropenyl-*N*-9(3)-propionyl-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonanes. *Il Farmaco.* **2000**, *55*, 553-562.
68. Cheng Y., Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem.Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
69. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
70. Marshall C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* **1995**, *80*, 179-185.
71. Bilechi W., Holtt V., Przewlocki R. Acute δ -opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG105-15 cells. *Eur.J.Pharmacol.* **2000**, *390*, 1-6.

CAPITOLO 3

NESS002ie: UN NUOVO TIPOLO FLUORURATO INIBITORE DELLE ENDOPEPTIDASI

3.1 Introduzione

Gli evidenti effetti collaterali indotti dalla somministrazione degli agonisti dei recettori μ degli oppioidi e della morfina in particolare hanno indotto un significativo interesse verso lo sviluppo di strategie farmacologiche alternative per il trattamento del dolore, con particolare riferimento al dolore cronico.^{1,2} Tra queste, è stata presa in considerazione la possibilità di intervenire nell'alleviare il dolore incrementando il rilascio e la permanenza in circolo di peptidi oppioidergici endogeni.^{3,4} In questo senso, numerosi studi hanno dimostrato come l'inibizione della degradazione enzimatica di peptidi morfino-simili come Met-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) e Leu-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) possa essere considerata una valida strategia alternativa per alleviare i sintomi del dolore.^{5,6}

Met- e Leu-enkefalina rappresentano i principali ligandi oppioidergici endogeni con attività analgesica e mostrano affinità comparabile a quella della morfina per i recettori degli oppioidi μ . Detti composti risultano invece circa dieci volte più affini della morfina verso i recettori degli oppioidi δ .⁸ Le enkefaline sono in particolare densamente localizzate nel cervello, specialmente nell'amigdala, nel nucleus accumbens, nelle regioni corticali e nel midollo spinale.^{9,10} È da rilevare come le enkefaline siano caratterizzate da un'emivita molto breve, determinata principalmente dalla loro disattivazione da parte di uno specifico enzima (zinco metallopeptidasi) legato alle membrane: la neutro endopeptidasi 24.11 (NEP; EC 3.4.24.11, neprilisina).¹¹ Una buona corrispondenza tra la distribuzione neuro-anatomica di NEP ed il rilascio di enkefaline è stata evidenziata in numerosi studi.^{12,13} Oltre a NEP, altre zinco metallopeptidasi sono risultate tuttavia coinvolte nel metabolismo delle enkefaline, come l'enzima convertitore dell'angiotensina ACE (Angiotensin Converting Enzyme; EC 3.4.15.1) e l'aminopeptidasi neutra APN (EC 3.4.11.2).^{14,15}

Il composto peptidomimetico tiorfano [(DL-3-mercapto-2benzilpropanoil)-glicina] (Figura 1), sintetizzato agli inizi degli anni ottanta dal gruppo di ricerca di Roques,¹⁶ è stato il primo inibitore selettivo NEP con attività inibitoria caratterizzata da IC_{50} nell'ordine del nanomolare. Studi preclinici hanno dimostrato come tiorfano fosse in grado di incrementare l'effetto

analgesico indotto dalle encefaline, sia a seguito di somministrazione intracerebroventricolare che sistemica.¹⁶⁻¹⁸ Allo scopo di incrementare l'attività mostrata da tiorfano, numerosi studi sono stati inoltre rivolti all'ottenimento di nuovi e selettivi inibitori NEP a seguito della modificazione strutturale del composto di riferimento.^{13,19} In funzione della similitudine fra la struttura del sito d'azione di NEP e APN, molti dei derivati di tiorfano sviluppati sono risultati inibitori duali NEP/APN, come nel caso dei composti RB101 e Kelatorfano (Figura 1).²⁰⁻²² L'attività inibitoria nei confronti di entrambe le endopeptidasi ha indotto una maggiore attività analgesica di questi composti, quando somministrati per via sistemica in modelli animali (ratti e topi) di dolore, rispetto a quella riscontrata a seguito di analoghi trattamenti con tiorfano.^{13,20} E' tuttavia da rilevare come il tiorfano e gli analoghi composti tiolici abbiano mostrato una bassa stabilità nei confronti delle peptidasi e una limitata permeabilità della barriera emato-encefalica.^{16,23-24} Come conseguenza, i suddetti composti non hanno avuto un seguito nella pratica clinica, nonostante siano state proposte anche altre applicazioni farmaceutiche.²⁵⁻²⁷

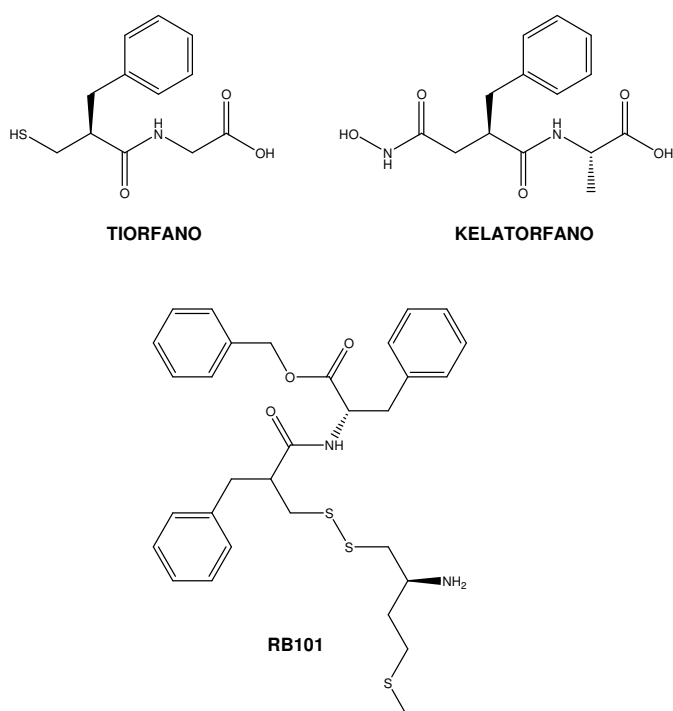


Figura 1. Formule di struttura degli inibitori delle metallopeptidasi tiorfano, ketorfano e RB101.

Tra le diverse serie di composti derivati di tiorfano, inibitori selettivi NEP con interessanti profili sono stati riportati negli anni novanta da Gomez-Monterrey et al.²⁸ Tra i composti

studiati, *N*-(3-mercapto-5-metil-1-ossoesil)-*L*-fenil-alanina, denominato composto **C20** (Figura 2), è risultato il più interessante in funzione del profilo farmacologico riscontrato attraverso saggi in vitro. Tuttavia nessun dato relativo all'attività analgesica in vivo di detto composto è stato individuato nell'ambito della letteratura scientifica e brevettuale di riferimento.

Nell'ambito di precedenti studi mirati alla validazione di strategie di *medicinal chemistry* basate sul potenziale bioisosterismo tra gruppi alchilici o peptidici con gruppi fluoroalchilici, è stata riscontrata la possibilità di mantenere o addirittura migliorare l'attività inibitoria di **C20** attraverso la sostituzione con gruppi fluoroalchilici del gruppo isobutilico in alfa al gruppo tiolico del composto di riferimento.²⁹ La strategia adottata è stata in particolare basata sull'evidenza che l'introduzione di gruppi fluoroalchilici, come ad esempio il gruppo trifluorometilico, potesse migliorare le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei composti, così come precedentemente riportato sia relativamente al *binding* con recettori,^{30,31} che rispetto alla cinetica di assorbimento o di passaggio attraverso la barriera emato-encefalica.³² Tra i nuovi derivati fluorurati sintetizzati, il composto *N*-(3-mercapto-3-trifluorometil-1-ossoesil)-*L*-tirosina, denominato **NESS002ie** (Figura 2), è risultato di particolare interesse in quanto, anche se attraverso saggi preliminari in vitro, ha mostrato significativa attività inibitoria sia nei confronti di NEP che di ACE.²⁹

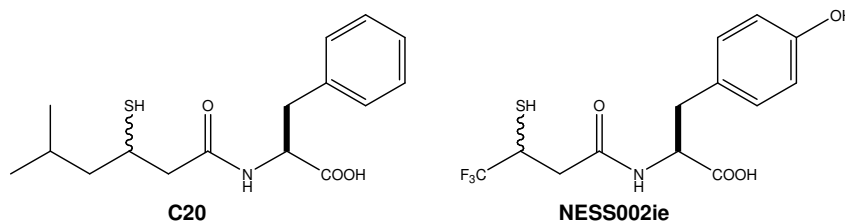


Figura 2. Formule di struttura dei composti **C20** e **NESS002ie**.

In relazione alle interessanti proprietà di **NESS002ie**, evidenziate nel corso degli studi preliminari precedentemente condotti,²⁹ nell'ambito della presente ricerca si è voluta approfondire la valutazione farmacologica del nuovo inibitore fluorurato delle endopeptidasi, fino a valutarne le potenziali proprietà analgesiche in un modello animale di dolore infiammatorio cronico. In particolare l'attività condotta è stata mirata a:

- sintetizzare quantitativi sufficienti del composto **NESS002ie** al fine di completare la prevista caratterizzazione farmacologica (prove in vitro e in vivo);

- sintetizzare il composto di riferimento *N*-(3-mercapto-5-metil-1-ossosil)-L-fenil-alanina, denominato **C20**,²⁸ allo scopo di condurre prove comparative con **NESS002ie**;
- confermare l'attività inibitoria di **NESS002ie** nei confronti di ACE e NEP, attraverso opportuni saggi in vitro;
- valutare la potenziale attività analgesica di **NESS002ie** e dei composti di riferimento tiorfano, **C20**, oltre che della morfina, quale controllo positivo, in un modello murino di dolore infiammatorio cronico (test della formalina);
- individuare eventuali peculiarità del profilo farmacologico di **NESS002ie** rispetto ai suddetti composti di riferimento.

In analogia con lo studio precedente,²⁹ l'attività inibitoria di **NESS002ie** è stata valutata anche nei confronti dell'enzima di conversione dell'endotelina ECE-1 (Endothelin-Converting Enzyme 1; EC 3.4.24.71). ECE-1 è un'ulteriore zinco metallopeptidasi, coinvolta nella regolazione del tono vascolare ed è correlata a NEP attraverso la sequenza amminoacidica.³³

Quale modello animale per la valutazione delle potenzialità analgesiche di **NESS002ie** è stato selezionato il test della formalina in quanto universalmente riconosciuto come modello sperimentale di riferimento per il dolore cronico/infiammatorio, con un riscontro positivo nella valutazione clinica.³⁴⁻³⁵ In particolare, è stato riportato come l'iniezione di formalina nella zampa posteriore di roditori produca una risposta nocicettiva bifasica (Figura 3), caratterizzata da una prima rapida fase, correlata al dolore acuto indotto dalla somministrazione di formalina, e da una seconda, prolungata nel tempo, determinata dall'infiammazione indotta e dalla successiva sensitizzazione a livello centrale.³⁶⁻³⁹

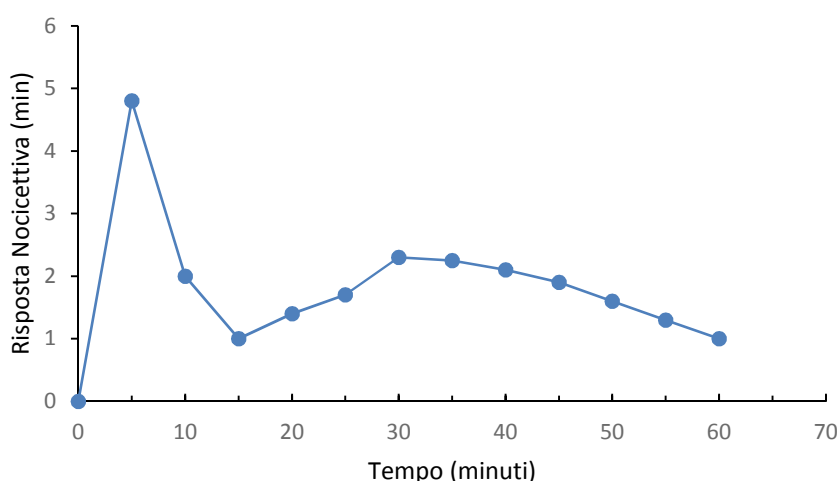
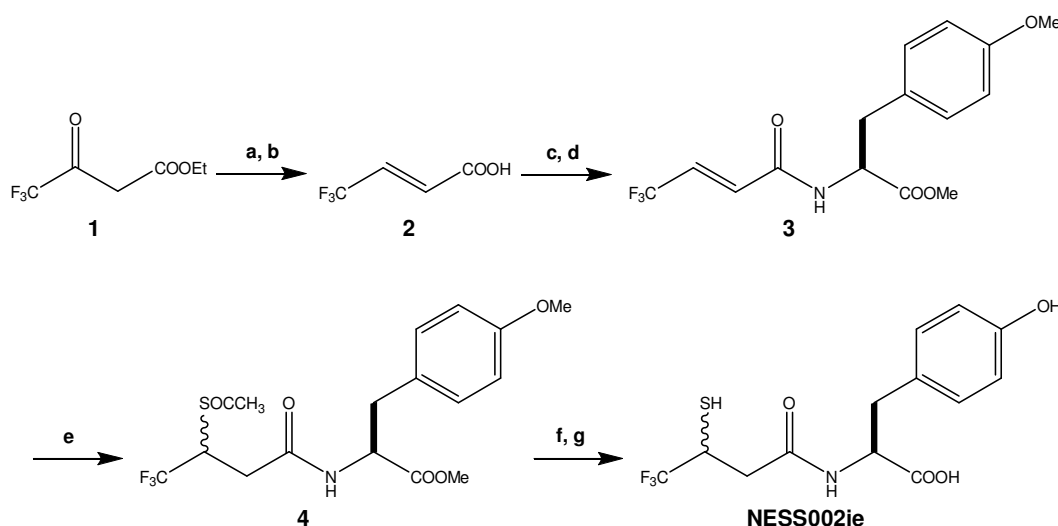


Figura 3. Attività nocicettiva indotta dalla somministrazione di 20 µL di soluzione salina contenente 5% di formalina nel dorso della zampa posteriore di topi CD1.

3.2 Metodi

3.2.1 Sintesi dei composti

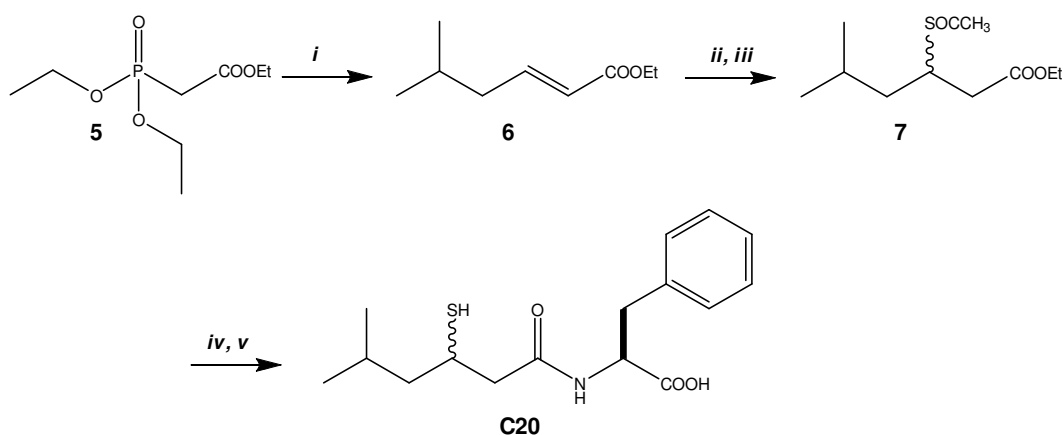
NESS002ie è stato sintetizzato come miscela racemica secondo la procedura precedentemente descritta da Olimpieri *et al.* e riportata nello Schema 1.²⁹ In particolare, il processo seguito ha previsto in una prima fase la condensazione del metil-estere dell' α -amminoacido *H-tert*-BuO-Tyr-OMe con il fluorocrotonoil cloruro dell'acido trifluorocrotonico **2**, preparato dall'estere **1**, con l'ottenimento dell'accettore di Michael **3**. Successivamente, l'addizione di Michael di acido tioacetico al composto **3** ha garantito l'ottenimento dello pseudopeptide **4** come miscela racemica equimolare dei due diastereoisomeri. Dopo deprotezione del gruppo idrossilico fenolico di **4** con acido trifluoroacetico, è stato possibile ottenere il composto **NESS002ie** attraverso idrolisi sia dell'estere che del tioestere. Lo stadio di idrolisi è stato condotto impiegando una soluzione metanolica di NaOH 2N degasata al fine di evitare processi di ossidazione in grado di generare composti disolfurici.



Schema 1. Reagenti e condizioni: (a) toluene, NaBH₄, T.amb.; (b) P₂O₅, NaOH; (c) ftaloil dicloruro, 180 °C; (d) H-AA-OMe, TEA, DCM, 0 °C; (e) AcSH, EtOH, T.amb. (r.d. = 1:1); (f) 20% TFA, DCM, T.amb., 1h; (g) 2N NaOH in MeOH (degasata), 0 °C, 1h.

Il composto di riferimento **C20** è stato ottenuto in accordo con la procedura descritta da Gomez-Monterrey *et al.* di seguito schematizzata (Schema 2).²⁸ Come nel caso del composto **NESS002ie**, il prodotto finale è stato ottenuto come miscela racemica equimolare dei due diastereoisomeri, senza ulteriore separazione degli stessi. **C20** è stato in particolare ottenuto per

reazione di coupling dell'acido 3-(acetiltio)-5-metil-esanoico **7** con l' α -aminoestere metil 2-amino-3-fenilpropanoato in presenza di DCC/HOBt, con successiva deprotezione alcalina sia del gruppo mercapto che carbossilico. Il composto **7** è stato ottenuto a partire da trietilfosfonoacetato **5** che, per reazione di Wittig-Horner con l'aldeide 3-metilbutanale, ha dato l'estere etilico α,β -insaturo **6**, come miscela 50:50 di isomeri E e Z. Dopo saponificazione di **6**, è stata effettuata addizione di Michael di acido tioacetico all'acido α,β -insaturo, con ottenimento di **7** come miscela di isomeri.



Schema 2. Reagenti e condizioni: (i) NaH, 1,2-dimetossietano, 3-metilbutanale a refluxo; (ii) NaOH 1M in etanolo, quindi HCl 1M; (iii) CH₃COSH a refluxo; (iv) metil 2-amino-3-fenilpropanoato, DCC, HOBt; (v) NaOH 1M in metanolo.

3.2.2 Valutazione in vitro dell'attività inibitoria verso differenti metallopeptidasi

Determinazione dei parametri cinetici

L'attività inibitoria di **NESS002ie** e dei composti di riferimento verso NEP, ACE, APN e ECE-1 è stata valutata attraverso saggi in vitro basati sulla quantificazione della fluorescenza indotta dall'idrolisi di opportuni substrati per azione delle metallopeptidasi sopra indicate. La fluorescenza è stata determinata mediante uno spettrofotometro/ spettrofluorimetro Victor 3 (Perkin Elmer). I parametri cinetici legati all'attività inibitoria nei confronti dei differenti enzimi sono stati determinati in accordo con i metodi precedentemente descritti da Florentin et al.⁴⁰ Allo scopo di determinare la velocità iniziale, le concentrazioni degli enzimi sono state scelte in modo da idrolizzare meno del 5% di substrato per unità di tempo. Inoltre sono state impiegate concentrazioni di substrato da 0,2 a 5,0 volte i valori di K_m riportati in letteratura.⁴⁰

I valori sperimentali di K_m sono stati determinati mediante regressione non lineare utilizzando GraphPad Prism (versione 5.00 per Windows). Per valutare l'attività inibitoria dei vari composti, sono stati condotti in una prima fase saggi in assenza degli enzimi (0% di idrolisi) o in assenza degli inibitori (100% di idrolisi). I dati sperimentali rilevati in presenza degli inibitori sono stati rapportati a quelli relativi al 100% di idrolisi al fine di poter determinare i corrispondenti valori di IC_{50} . Attraverso l'equazione di Cheng-Prusoff ($K_i = IC_{50} / (1 + S / K_m)$), i valori di IC_{50} sono stati convertiti in K_i .⁴¹ I valori sono stati calcolati come media di tre prove sperimentali indipendenti, ciascuna delle quali condotta in duplicato.

Test di attività della endopeptidasi neutra (NEP)

I test per la valutazione della capacità inibitoria dei composti verso NEP sono stati condotti impiegando: NEP purificata da rene di suino acquistata da Calbiochem, il substrato fluorescente specifico per NEP *N*-Dansyl-D-Ala-Gly-*p*-nitro-Phe-Gly (DAGNPG) e l'inibitore NEP di riferimento DL-3-mercapto-2-benzil propanoglicina (DL-tiorfano) forniti da Sigma Aldrich. Per i saggi sono state preparate soluzioni madri 10^{-2} M in etanolo di DAGNPG, DL-tiorfano, **C20** e **NESS002ie**. NEP è stata invece solubilizzata in una soluzione tampone a pH=7,4 costituita da Tris/HCl 50 mM e NaCl 150 mM. Le cinetiche di degradazione sono state studiate a 37 °C, utilizzando piastre a 96 pozzetti con fondo nero (PerkinElmer) in volumi finali pari a 100 μ L. L'idrolisi del substrato è stata monitorata determinando la fluorescenza a $\lambda_{ex} = 340$ nm e $\lambda_{em} = 530$ nm. La sperimentazione è stata condotta con concentrazioni di NEP pari a 500 ng/100 μ L, pre-incubando l'enzima per 30 minuti a 37 °C prima dell'aggiunta di DAGNPG e degli inibitori. DAGNPG è stato utilizzato alla concentrazione di 58 μ M, pari al valore di K_m . La cinetica è stata seguita fino a 60 minuti dall'aggiunta del substrato.

Test di attività dell'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE)

I test per la valutazione della capacità inibitoria dei composti verso ACE sono stati condotti impiegando: ACE umana ricombinata acquistata da Calbiochem, il substrato fluorescente specifico per ACE *o*-aminobenzoic acid-Phe-Arg-Lys(2,4-dinitrophenyl)-Pro-OH [Abz-FRK(Dnp)-P-OH] fornito da BIOMOL e l'inibitore ACE di riferimento Captopril (Sigma Aldrich). Per i saggi sono state preparate le seguenti soluzioni madri: (i) ACE è stata solubilizzata in una soluzione acquosa a pH = 7,5 costituita da NaCl 75 mM, Tris 12,5 mM, ZnCl₂ 500 nM e 40% di glicerolo; (ii) Abz-FRK(Dnp)-P-OH è stato solubilizzato in DMSO alla concentrazione di 10^{-2} M; (iii) Captopril, **NESS002ie** sono stati solubilizzati in acqua alla concentrazione di 10^{-2} M. I test sono stati condotti a 37 °C, utilizzando piastre a 96 pozzetti con

fondo nero (PerkinElmer) in volumi finali pari a 100 μ L. Le cinetiche sono state condotte in soluzione tampone a pH = 7,0 contenente Tris/HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M. L'idrolisi del substrato è stata monitorata determinando la fluorescenza a λ_{ex} = 320 nm e λ_{em} = 420 nm. La sperimentazione è stata condotta con concentrazioni di ACE pari a 500 ng/100 μ L, pre-incubando l'enzima per 30 minuti a 37 °C prima dell'aggiunta di Abz-FRK(Dnp)-P-OH e degli inibitori. Abz-FRK(Dnp)-P-OH è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μ M, pari al valore di K_m . La cinetica è stata seguita fino a 30 minuti dall'aggiunta del substrato.

Test di attività della aminopeptidasi N (APN)

L'attività di APN è stata valutata utilizzando: leucina aminopeptidasi APN purificata da rene di suino, il substrato specifico per APN cloridrato di L-Leucin 7-amido-4-metil cumarina (Leu-AMC), l'inibitore APN di riferimento Amastatina, forniti da Sigma Aldrich. E' stata preparata una soluzione madre di APN solubilizzando l'enzima in una soluzione acquosa a pH=7,7 contenente (NH₄)₂SO₄ 3,5 M e MgCl₂ 10 mM. Soluzioni madre di Leu-AMC, Amastatina e **NESS002ie** sono state preparate in metanolo alla concentrazione di 10⁻² M. I test sono stati condotti a 37 °C, utilizzando piastre a 96 pozzetti con fondo nero (PerkinElmer) in volumi finali pari a 100 μ L. Le cinetiche sono state condotte in soluzione tampone a pH = 8,0 contenente Tris/HCl 100 mM. L'idrolisi del substrato è stata monitorata determinando la fluorescenza a λ_{ex} = 355 nm e λ_{em} = 460 nm. La sperimentazione è stata condotta con concentrazioni di APN pari a 500 ng/100 μ L, pre-incubando l'enzima per 30 minuti a 37 °C prima dell'aggiunta di Leu-AMC e degli inibitori. Il substrato è stato utilizzato alla concentrazione di 35 μ M, pari al valore di K_m . La cinetica è stata seguita fino a 30 minuti dall'aggiunta di Leu-AMC.

Test di attività dell'enzima convertitore dell'endotelina (ECE-1)

I test per la valutazione della capacità inibitoria dei composti verso ECE-1 sono stati condotti impiegando: ECE-1 umana ricombinata ed il substrato fluorescente specifico per ECE-1 7-metossicumarin-4-acetil-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys(2,4-dinitrofenil)-OH [Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH] forniti da R&D Systems, l'inibitore ECE-1 di riferimento Phosphoramidon acquistato da Sigma Aldrich. E' stata preparata una soluzione madre di ECE-1 solubilizzando l'enzima in una soluzione acquosa a pH = 8,0 contenente NaCl 0,15 M e Tris/HCl 25 mM. Soluzioni madre di Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH, Phosphoramidon e **NESS002ie** sono state preparate in DMSO alla concentrazione di 10⁻² M. I test sono stati condotti a 37 °C, utilizzando piastre a 96 pozzetti con fondo nero (PerkinElmer) in volumi finali pari a 100 μ L. Le cinetiche sono state condotte in soluzione tampone a pH = 6,0 contenente

MES 0,1 M e NaCl 0,1 M. L'idrolisi del substrato è stata monitorata determinando la fluorescenza a $\lambda_{ex} = 340$ nm e $\lambda_{em} = 405$ nm. La sperimentazione è stata condotta con concentrazioni di ACE pari a 500 ng/100 μ L, pre-incubando l'enzima per 30 minuti a 37 °C prima dell'aggiunta di Abz-FRK(Dnp)-P-OH e degli inibitori. Abz-FRK(Dnp)-P-OH è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μ M, pari al valore di K_m . La cinetica è stata seguita fino a 60 minuti dall'aggiunta del substrato.

3.2.3 Saggi in vivo per la valutazione dell'attività analgesica dei nuovi inibitori delle metallopeptidasi

L'attività analgesica di **NESS002ie** e degli inibitori di riferimento **tiorfano** e **C20** è stata valutata utilizzando il test della formalina. Quale controllo positivo è stata usata anche la morfina. I saggi sono stati condotti con topi maschi CD1 (24-35 grammi) acquistati da Charles River Italia. Prima di essere sottoposti ai test di analgesia, gli animali sono stati acclimatati per una settimana presso lo stabulario, in gruppi di 2-4 per gabbia, con cicli di luce/buio di 12 ore, avendo sempre cibo ed acqua a disposizione. I saggi sono stati condotti in accordo con le linee guida comunitarie relative agli esperimenti sugli animali (CEE No. 86/609). Sono stati impiegati 8-12 animali per ciascun gruppo sperimentale.

Il giorno del test di analgesia, gli animali sono stati posizionati singolarmente in una camera cilindrica in vetro (16 cm di altezza; 16 cm di diametro) dove sono stati fatti acclimatare per un'ora. Successivamente sono stati iniettati nella parte dorsale della zampa 20 μ L di soluzione salina contenente 5% di formalina e gli animali sono stati osservati di continuo. In accordo con quanto riportato in letteratura,⁴² l'effetto dolorifico indotto dalla formalina è stato valutato registrando il tempo occupato dall'animale nel saltare o nel leccare, annusare o scuotere la zampa. L'osservazione è stata condotta per 45 minuti. I dati raccolti sono stati cumulati nell'ambito delle due fasi temporali in cui si è manifestato il dolore indotto dall'iniezione della formalina (Figura 3). In particolare sono stati sommati tra loro i dati dei primi 15 minuti e quelli tra i 15 e i 45 minuti dall'iniezione della formalina.

Allo scopo di evidenziare eventuali peculiarità e/o differente biodisponibilità dei nuovi inibitori rispetto agli analoghi di riferimento, il profilo analgesico degli inibitori è stato determinato a seguito della somministrazione degli stessi secondo tre differenti vie di somministrazione: intraplantare (i.pl.), intravenosa (i.v.) e intratecale (i.t.). La somministrazione i.pl. dei composti è stata condotta in associazione all'iniezione della formalina, alle dosi di 50 e 100 μ g per

animale. Nel caso della somministrazione i.v., gli inibitori e la morfina sono stati iniettati nella vena laterale della coda (5 ml/kg) 15 minuti prima del trattamento con formalina. Gli inibitori sono stati somministrati alle dosi di 10 e 50 mg/kg, mentre la morfina è stata testata alla dose di 1,0 mg/kg. La somministrazione i.t. è stata effettuata tra le vertebre L5 e L6 in accordo con quanto riportato in letteratura.⁴³ I composti da testare sono stati iniettati alle dosi di 50 e 100 µg per animale, 10 minuti prima dell'iniezione della formalina.

Al fine di raccogliere ulteriori informazioni inerenti il meccanismo di azione in vivo degli inibitori, sono stati condotti anche saggi in presenza degli antagonisti dei recettori degli oppioidi naloxone e naltrindolo. Questi sono stati somministrati per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 5 mg/Kg, 20 minuti prima l'iniezione della formalina.

Per i saggi in vivo, morfina, naloxone e naltrindolo sono stati solubilizzati in salina, mentre **NESS002ie**, **tiorfano** e **C20** sono stati solubilizzati in una soluzione costituita da DMSO (10%), Cremophor EL (10%) e salina (80%).

I risultati dei saggi in vivo sono stati espressi come media ± SEM e sono stati analizzati statisticamente usando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test Turkey's post hoc per la comparazione multipla. La variazione è stata considerata significativa per valori di $P < 0,05$.

3.3 Risultati

3.3.1 Test enzimatici

I saggi enzimatici sono stati in una prima fase validati attraverso la determinazione dell'attività inibitoria dei diversi composti di riferimento adottati per ciascun enzima (tiorfano, captopril, phosphoramidon e amastatina). I valori di K_i riportati in Tabella 1, calcolati dai valori di IC_{50} determinati dalle curve di inibizione mostrate in Figura 4, sono risultati pienamente in accordo con quelli precedentemente riportati in letteratura.^{16,44-46} In analogia con quanto descritto da Gomez-Monterrey *et al.*,²⁸ il composto **C20** sintetizzato nel corso della ricerca non ha mostrato alcuna attività inibitoria nei confronti di ACE, APN ed ECE-1, mentre ha inibito selettivamente NEP, con un valore di K_i pari a 20,5 nM (Tabella 1). A conferma dei risultati preliminari precedentemente ottenuti,²⁹ **NESS002ie** ha invece mostrato una duplice azione inibitoria, risultando attivo sia verso NEP che ACE. In particolare, i valori di K_i di **NESS002ie** verso i due enzimi sono risultati rispettivamente di 44,2 e 88,5 nM. L'attività inibitoria di **NESS002ie** nei confronti di ACE è risultata comparabile a quella di **tiorfano**, mentre il valore di K_i del composto determinato verso NEP è risultato 2 e 5 volte superiore a quelli di **C20** e tiorfano.

Tabella 1. Capacità inibitoria di **NESS002ie** e dei composti di riferimento sull'attività delle zinco metallopeptidasi NEP, ACE, ECE e APN.

Composto	K _i (nM)			
	NEP	ACE	ECE	APN
NESS002ie	44,2±1,6	88,5±4,8	>1000	>1000
Tiorfano	5,2±1,4	105,0±4,6	>1000	>1000
Captopril	>1000	0,06±0,04	>1000	>1000
Phosphoramidon	4,1±0,7	>1000	8,4±0,9	>1000
Amastatin	>1000	>1000	>1000	18,0±3,2
C20	20,5±2,2	>1000	>1000	>1000

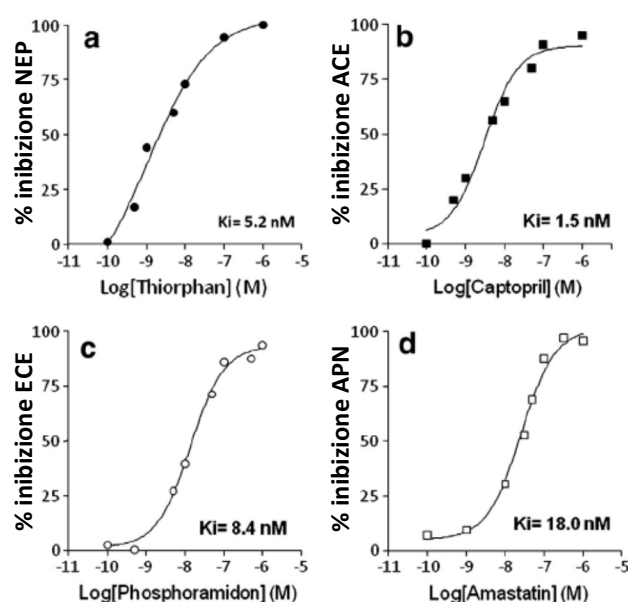


Figura 4. Curve di inibizione dell'attività enzimatica delle zinco metallopeptidasi NEP, ACE, ECE e APN da parte dei composti di riferimento.

3.3.2 Test della formalina

In accordo con i dati di letteratura, la somministrazione della formalina nella zampa dell'animale ha determinato una risposta dolorifica bifasica.⁴² Una prima risposta è stata registrata nell'arco dei primi 10 minuti, con un picco del dolore a circa 5 minuti dall'iniezione della formalina. Una seconda fase del dolore è stata rilevata a partire da circa 15 minuti dalla somministrazione della formalina e si è protratta per circa 30 minuti. Il picco massimo della

seconda fase del dolore è stato registrato a circa 30 minuti dall'iniezione della formalina nella zampa dell'animale da laboratorio.

Somministrazione intraplantare dei composti

A differenza del controllo positivo (morfina), la somministrazione i.pl. di tutti e tre gli inibitori testati non ha determinato alcun effetto analgesico significativo in nessuna delle due fasi del dolore indotto dalla formalina (Figura 5). E' da rilevare come nelle condizioni adottate l'effetto analgesico della morfina sia risultato statisticamente significativo solo sulla seconda fase del dolore [F(1,15)=10,24; P<0,01. Morfina vs veicolo]. Un trend positivo, anche se non statisticamente significativo, è stato tuttavia determinato con la morfina anche nei confronti della prima fase della risposta nocicettiva alla formalina.

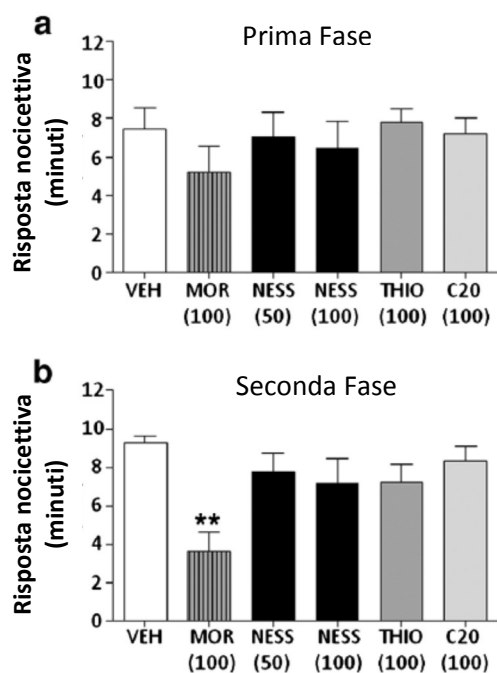


Figura 5. Effetto della somministrazione intraplantare di **NESS002ie** e dei composti di riferimento morfina, tiorfano e C20 sulla prima e seconda fase dell'attività nocicettiva indotta dalla formalina. Le dosi dei composti, in µg/topo, sono indicate tra parentesi. Le differenze tra i diversi gruppi sperimentali sono state valutate statisticamente attraverso ANOVA a una via seguita da Turkey's test. **P<0,01 vs veicolo.

Somministrazione intravenosa dei composti

Il trattamento con morfina alla dose di 1 mg/kg i.v. ha determinato un effetto analgesico in entrambe le fasi della risposta nocicettiva indotta dalla formalina (Morfina vs veicolo. Prima Fase: [F(1,15)=10,16; P<0,01]; Seconda Fase: [F(1,14)=11,93; P<0,01]) (Figura 6). Dei tre inibitori testati, solo **NESS002ie** ha mostrato attività analgesica. In particolare, l'azione del nuovo composto è risultata statisticamente significativa solo alla dose di 50 mg/Kg e sulla seconda fase del dolore indotto dalla formalina [F(2,27)=6,92; P<0,01. NESS002ie vs veicolo]. Come evidenziato in Figura 7, l'effetto antinocicettivo di **NESS002ie** è stato antagonizzato dalla somministrazione (5 mg/kg i.p.) dell'antagonista oppioide non selettivo naloxone [F(2,22)=8,09; P<0,05. **NESS002ie** + Naloxone vs **NESS002ie**].

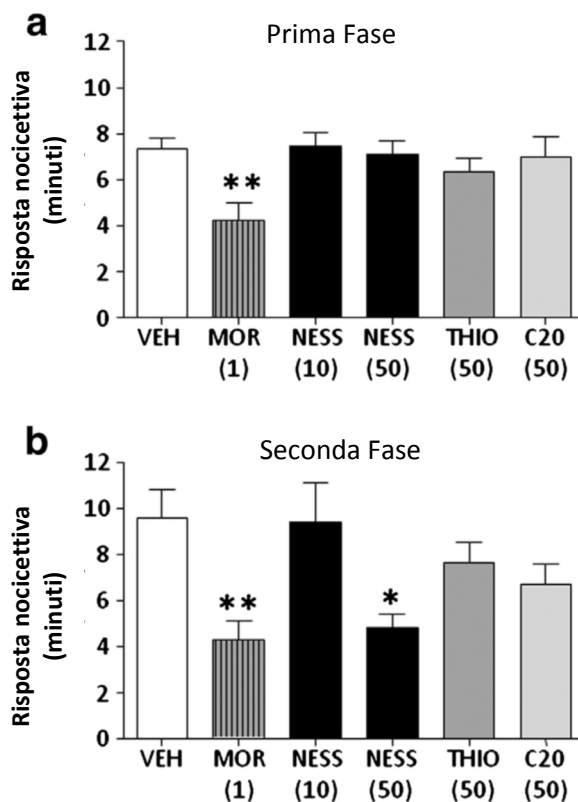


Figura 6. Effetto della somministrazione intravenosa di **NESS002ie** e dei composti di riferimento morfina, tiorfano e C20 sulla prima e seconda fase dell'attività nocicettiva indotta dalla formalina. Le dosi dei composti, in $\mu\text{g}/\text{kg}$, sono indicate tra parentesi. Le differenze tra i diversi gruppi sperimentali sono state valutate statisticamente attraverso ANOVA a una via seguita da Turkey's test. *P<0,05 e **P<0,01 vs veicolo.

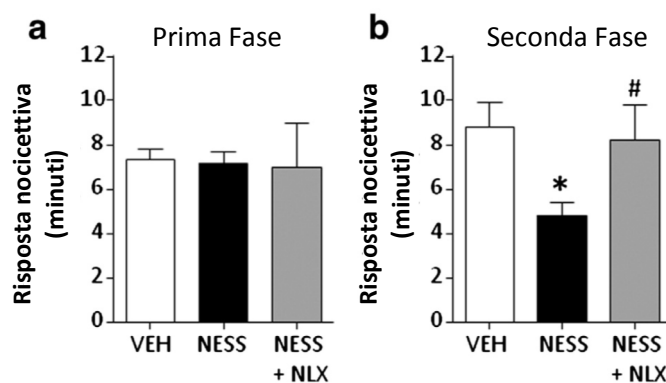


Figura 7. Effetto di un pretrattamento con Naloxone (5 mg/kg; i.p.) sull'attività antinocicettiva indotta dalla somministrazione intravenosa di **NESS002ie** (50 mg/kg) sulla prima e seconda fase dell'attività nocicettiva determinata dalla formalina. Le differenze tra i diversi gruppi sperimentali sono state valutate statisticamente attraverso ANOVA a una via seguita da Turkey's test. *P<0,05 vs veicolo; #P<0,05 vs NESS002ie.

Somministrazione intratecale

La somministrazione i.t. di **NESS002ie**, così come quella di **tiorfano** e **C20**, ha determinato un effetto analgesico nel modello di dolore infiammatorio cronico adottato (Figura 8). A differenza degli inibitori di riferimento che, alla dose di 100 µg/topo, hanno evidenziato un effetto antinocicettivo solo sulla seconda fase del dolore indotto dalla formalina (**tiorfano**: [F(1,17)=7,53; P<0,05 tiorfano vs veicolo]; **C20**: [F(1,19)=8,24; P<0,01 C20 vs veicolo]), il nuovo inibitore delle metalloproteasi ha contrastato il dolore in entrambe le fasi, già alla dose di 50 µg/topo (Prima Fase: [F(2,29)=6,13; P<0,05 **NESS002ie** 50 µg/topo vs veicolo; P<0,01 **NESS002ie** 100 µg/topo vs veicolo]. Seconda Fase: [F(2,29)=9,91; P<0,05 **NESS002ie** 50 µg/topo vs veicolo; P<0,001 **NESS002ie** 100 µg/topo vs veicolo]). L'effetto analgesico indotto da **NESS002ie** alla dose di 100 µg/topo è risultato comparabile a quello della morfina alla dose di 10 µg/topo (Prima Fase: [F(1,19)=13,47; P<0,01 morfina vs veicolo]; Seconda Fase: [F(1,16)=20,75; P<0,001 morfina vs veicolo]).

L'effetto analgesico di **NESS002ie** è stato antagonizzato con modalità differenti dai due antagonisti degli oppioidi naloxone e naltrindolo (Figura 9). Infatti, alla dose di 5 mg/Kg i.p., naloxone ha contrastato l'effetto di **NESS002ie** solo nella sua azione analgesica sulla seconda fase del dolore indotto dalla formalina [F(3,31)=7,10; P<0,05 **NESS002ie** + naltrindolo vs **NESS002ie**]; alla medesima dose, naltrindolo ha invece antagonizzato l'attività analgesica di **NESS002ie** in entrambe le fasi nocicettive [F(3,31)=5,32; P<0,05 **NESS002ie** + naloxone vs **NESS002ie**; P<0,05 **NESS002ie** + naltrindolo vs **NESS002ie**].

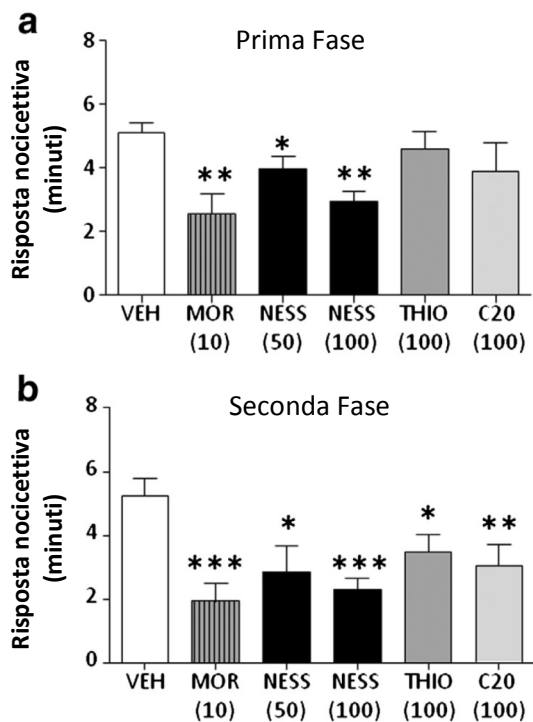


Figura 8. Effetto della somministrazione intratecale di **NESS002ie** e dei composti di riferimento morfina, tiorfano e C20 sulla prima e seconda fase dell'attività nocicettiva indotta dalla formalina. Le dosi dei composti, in $\mu\text{g}/\text{topo}$, sono indicate tra parentesi. Le differenze tra i diversi gruppi sperimentali sono state valutate statisticamente attraverso ANOVA a una via seguita da Turkey's test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs veicolo.

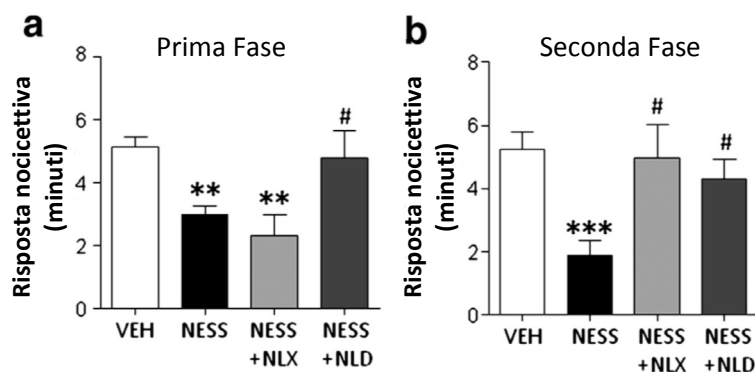


Figura 9. Effetto di un pretrattamento con Naloxone o Naltrindolo ($5 \text{ mg}/\text{kg}$; i.p.) sull'attività antinocicettiva indotta dalla somministrazione intratecale di **NESS002ie** ($100 \mu\text{g}/\text{topo}$) sulla prima e seconda fase dell'attività nocicettiva determinata dalla formalina. Le differenze tra i diversi gruppi sperimentali sono state valutate statisticamente attraverso ANOVA a una via seguita da Turkey's test. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs veicolo; # $P < 0,05$ vs **NESS002ie**.

3.4 Discussione

In questo studio è stata valutata l'attività inibitoria del nuovo inibitore fluorurato delle endopeptidasi **NESS002ie** verso le zinco metallopeptidasi NEP, ACE, APN e ECE-1. I test enzimatici in vitro hanno confermato i risultati preliminari precedentemente ottenuti,²⁹ evidenziando in particolare attività inibitoria di **NESS002ie** sia nei confronti di NEP che di ACE, con valori di K_i dell'ordine del nanomolare (Tabella 1). Nessuna significativa attività inibitoria è stata invece rilevata verso APN e ECE-1. La sostituzione del gruppo isobutilico di **C20** con un gruppo trifluorometilico ha quindi sostanzialmente causato una perdita di selettività inibitoria verso NEP, inducendo un'azione inibitoria duale NEP/ACE, precedentemente individuata anche nel caso di tiorfano.^{13,16} I valori di K_i per NEP determinati per **NESS002ie** sono risultati superiori a quelli calcolati per tiorfano, rispettivamente di 8 e 2 volte.

I saggi in vivo (test della formalina in topi CD1) hanno tuttavia evidenziato un migliorato profilo antinocicettivo di **NESS002ie** rispetto agli inibitori di riferimento. In particolare, rispetto a tiorfano e **C20**, il nuovo inibitore fluorurato delle metalloproteasi:

- a. quando somministrato i.v., è stato in grado di contrastare la seconda fase del dolore indotto dall'iniezione di formalina (i composti di riferimento non hanno invece mostrato alcun effetto);
- b. se iniettato per via intratecale, ha evidenziato un effetto analgesico su tutto il profilo bifasico del dolore indotto dalla formalina (**tiorfano** e **C20** hanno contrastato solo la seconda fase del dolore).

I risultati ottenuti confermano la validità delle strategie di medicinal chemistry adottate, basate sull'introduzione di un gruppo fluoroalchilico in sostituzione di un sostituito alchilico, ed in particolare sul potenziale bioisosterismo tra un gruppo trifluorometilico e un gruppo isobutilico.^{30,32,47,48} In particolare, lo studio condotto ha mostrato un incremento della biodisponibilità dell'inibitore e, conseguentemente della sua efficacia in vivo, a seguito delle modificazioni strutturali apportate al composto di riferimento. Nonostante il profilo dell'attività inibitoria di **NESS002ie** in vitro sia risultato più sfavorevole, è da rilevare come il nuovo inibitore fluorurato **NESS002ie** sia risultato in vivo più attivo anche di un altro inibitore duale delle metalloproteasi NEP e ACE, come il **tiorfano**.

Si ritiene quindi che il migliorato effetto analgesico di **NESS002ie** rispetto agli inibitori di riferimento possa essere dovuto alla migliorata biodisponibilità, con una conseguente incrementata attività nell'inibizione di NEP responsabile della degradazione di Met-enkefalina rilasciata a livello sia spinale che sovra spinale a seguito dell'effetto nocicettivo indotto dalla

formalina.⁴⁹⁻⁵¹ Tecniche in vivo come la microdialisi cerebrale hanno infatti consentito di evidenziare un rilascio dell'oppioide endogeno quale conseguenza dell'effetto indotto dall'iniezione di formalina nella zampa dell'animale da laboratorio.⁵² E' tuttavia da rilevare come il profilo analgesico di **NESS002ie** possa essere in parte attribuito anche all'azione inibitoria del composto verso ACE. E' stato infatti riportato come l'inibizione di ACE giochi un ruolo fondamentale nella regolazione dell'eptapeptide endogeno cerebrale Met-enkefalina-Arg-Phe,⁵³ caratterizzato da elevata attività analgesica mediata dai recettori degli oppioidi mu, delta e kappa.⁵⁴

Lo studio condotto ha inoltre evidenziato una differente azione di naloxone e naltrindolo nell'antagonizzare l'effetto analgesico indotto da **NESS002ie** somministrato i.t. sulla prima fase del profilo nocicettivo causato dall'iniezione della formalina. Come evidenziato in Figura 8, infatti, solo l'antagonista oppioide non selettivo naltrindolo è stato in grado di inibire l'attività di **NESS002ie**. Naloxone, sostanzialmente ligando selettivo mu, ha invece contrastato l'effetto di **NESS002ie** solo nella seconda fase del dolore indotto dalla formalina. Poiché è stato riportato che la prima fase dell'effetto nocicettivo della formalina è mediato principalmente dai recettori degli oppioidi delta, mentre la seconda fase coinvolge sia i recettori mu che quelli delta,^{49,55} in relazione al profilo recettoriale dei due antagonisti degli oppioidi utilizzati ed in base alla loro azione nei confronti dell'attività di **NESS002ie**, è possibile ipotizzare come l'azione del nuovo inibitore fluorurato sia mediata da entrambi i sottotipi recettoriali degli oppioidi mu e delta. I risultati ottenuti con **NESS002ie** sono in accordo con quanto precedentemente riportato relativamente all'inibitore delle endopeptidasi RB101, la cui attività analgesica è risultata attenuata da naltrindolo in entrambi le fasi del dolore indotto dalla somministrazione della formalina nella zampa.⁵⁵ Le differenze riscontrate nell'attività di **NESS002ie** in funzione della specifica via di somministrazione dell'inibitore potrebbero essere correlate al coinvolgimento di un meccanismo d'azione localizzato. In particolare la maggiore attività analgesica rilevata a seguito della somministrazione i.t. del composto rispetto a quella i.v. potrebbe essere legata ad una più diretta e rapida azione quando **NESS002ie** è somministrato direttamente nel Sistema Nervoso Centrale, con una minore probabilità di degradazione. La somministrazione i.pl. della morfina, in accordo con quanto precedentemente riportato per lo stesso composto e per altri agonisti mu come per esempio DAMGO,⁵⁶ ha determinato un significativo effetto analgesico periferico nel modello di dolore cronico/infiammatorio adottato. Nessuno degli inibitori testati, quando somministrato i.pl., è stato invece in grado di contrastare l'effetto nocicettivo indotto dalla formalina. L'inefficacia degli inibitori delle endopeptidasi, riscontrata in questo caso,

potrebbe quindi essere correlata ad un basso o inesistente rilascio di encefalina nei tessuti periferici a seguito della somministrazione di formalina. I risultati ottenuti sono in accordo con precedenti studi che hanno evidenziato come la risposta analgesica degli inibitori delle encefalinasi sia principalmente mediata dal rilascio di encefaline nella regione spinale e sovraspinale.¹³

3.5 Conclusioni

L'introduzione di un gruppo trifluorometilico in sostituzione di un gruppo isobutilico nella struttura del composto noto **C20**,²⁸ inibitore selettivo NEP, ha determinato una modifica del profilo inibitorio verso le metalloproteasi. In particolare, come evidenziato da opportuni saggi in vitro, l'omologo fluorurato **NESS002ie** è risultato attivo sia verso NEP che ACE.

Seppure con modalità differenti a seconda della via di somministrazione adottata, il nuovo inibitore fluorurato ha mostrato in vivo (test della formalina) una maggiore attività analgesica non solo rispetto all'analogo **C20**, ma anche nei confronti di un altro inibitore duale NEP/ACE come il tiorfano.^{13,16}

Anche se ancora in uno stadio preliminare, i risultati della ricerca hanno evidenziato le potenziali attività analgesiche di **NESS002ie**, supportando l'interesse dello sviluppo di detto composto ai fini della definizione di nuove strategie farmacologiche per il trattamento del dolore, con particolare riferimento al dolore persistente/infiammatorio.

3.6 Referenze

1. Arnér S., Meyerson B.A. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain*. **1988**; 33, 11-23.
2. Chau D.L., Walker V., Pai L., Cho L.M. Opiates and elderly: use and side effects. *Clin.Interv.Aging*. **2008**, 3, 273-278.
3. Boudinot E., Morin-Surun M., Foutz A.S., Fournié-Zaluski M., Roques B.P., Denavit-Saubié M. Effects of the potent analgesic enkephalin-catabolizing enzyme inhibitors RB101 and kelatorphan on respiration. *Pain*. **2001**, 90, 7-13.
4. Le Guen S., Noble F., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P., Besson J.M., Buritova J. RB101(S), a dual inhibitor of enkephalinases does not induce antinociceptive tolerance, or cross-tolerance with morphine: a c-Fos study at the spinal level. *Eur.J.Pharmacol*. **2002**, 441, 141-150.

5. Noble F., Roques B.P. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin.Ther.Targets* **2007**, *11*, 145-159.
6. Thanawala V., Kadam V.J., Ghosh R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr.Drug Targets*. **2008**, *9*, 887-894.
7. McDonald J., Lambert D.G. Opioid receptors. *Contin.Educ.Anaesth.Crit.Care Pain*. **2005**, *5*, 22-25.
8. Sinisi R., Ghilardi A., Ruiu S., Lazzari P., Malpezzi L., Sani M., et al. Synthesis and in vitro Evaluation of Trifluoroethylamine Analogues of Enkephalins. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1416-1420.
9. Chang K.J., Cooper B.R., Hazum E., Cuatrecasas P. Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol.Pharmacol*. **1979**, *16*, 91-104.
10. Wolozin B.L., Pasternak G.W. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **1981**, *78*, 6181-6185.
11. VonVoigtlander P.F., Lewis R.A. In vivo disposition and metabolism of enkephalins: relationship to analgesic properties. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol*. **1978**, *20*, 265-274.
12. Waksman G., Hamel E., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase “enkephalinase” and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. **1986**; *83*, 1523-1527.
13. Roques B.P., Noble F., Daugé V., Fournié-Zaluski M.C., Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol.Rev*. **1993**, *45*, 87-146.
14. Malfroy B., Swerts J.P., Guyon A., Roques B.P., Schwartz J.C. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature*. **1978**, *276*, 523-526.
15. Lucius R., Sievers J., Mentlein R. Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13). *J.Neurochem*. **1995**; *64*, 1841-1847.
16. Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C., Soroca E., Lecomte J.M., Malfroy B., Lloren C., et al. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature*. **1980**, *288*, 286-288.
17. Hachisu M., Takahashi H., Hiranuma T., Shibasaki Y., Murata S. Relationship between enkephalinase inhibition of thiorphan in vivo and its analgesic activity. *J.Pharmacobiodyn*.**1985**; *8*, 701-710.

18. Dickenson A.H., Sullivan A.F., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P. Prevention of degradation of endogenous enkephalins produces inhibition of nociceptive neurons in rat spinal cord. *Brain.Res.* **1987**, *408*, 185-191.
19. Beaumont A., Fourniè-Zaluski M., Roques B.P. Neutral endopeptidase-24.11: structure, and design and clinical use of inhibitors. In: N.M. Hooper editor. *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*, London Taylor and Francis; **1996**, pp. 105-129.
20. Bourgoin S., Le Bars D., Artaud F., Clot A.M., Bouboutou R., Fournie-Zaluski M.C., et al. Effects of ketorphan and other peptidase inhibitors on the in vitro and in vivo release of methionine-enkephalin-like material from the rat spinal cord. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1986**, *238*, 360-366.
21. Fournié-Zaluski M.C., Coric P., Turcaud S., Lucas E., Noble F., Maldonado R., et al. "Mixed inhibitor-prodrug" as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes. *J.Med.Chem.* **1992**, *35*, 2473-2481.
22. Noble F., Soleilhac J.M., Soroca-Lucas E., Turcaud S., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P. Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1992**, *261*, 181-190.
23. Maldonado R., Daugé V., Callebert J., Villette J.M., Fournié-Zaluski M.C., Feger J., et al. Comparison of selective and complete inhibitors of enkephalin-degrading enzymes on morphine withdrawal syndrome. *Eur.J.Pharmacol.* **1989**, *165*, 199-207.
24. Eberlin M., Mück T., Michel M.C. A comprehensive review of the pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical effects of the neutral endopeptidase inhibitor racecadotril. *Front.Pharmacol.* **2012**, *3*:93.
25. Spyroulias G.A., Cordopatis P. Current inhibition concepts of zinc metallopeptidases involved in blood pressure regulation. *Current Enzyme Inhibition.* **2005**, *1*, 29-42.
26. Medja F., Lelièvre V., Fontaine R.H., Lebas F., Leroux P., Ouimet T., et al. Thiorphan, a neutral endopeptidase inhibitor used for diarrhoea, is neuroprotective in newborn mice. *Brain.* **2006**, *129*, 3209-3223.
27. Jutkiewicz E.M., Torregrossa M.M., Sobczyk-Kojiro K., Mosberg H.I., Folk J.E., Rice K.C., et al. Behavioral and neurobiological effects of the enkephalinase inhibitor RB101 relative to its antidepressant effects. *Eur.J.Pharmacol.* **2006**, *531*, 151-159.

28. Gomez-Monterrey I., Turcaud S., Lucas E., Bruetschy L., Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C. Exploration of neutral endopeptidase active site by a series of new thiol-containing inhibitors. *J.Med.Chem.* **1993**, *36*, 87-94.
29. Olimpieri F., Tambaro S., Fustero S., Lazzari P., Sanchez-Roselló M., Pani L., et al. Synthesis and enzymatic evaluation of novel partially fluorinated thiol dual ACE/NEP inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2009**, *19*, 4715-4719.
30. Shah P., Westwell A.D. The role of fluorine in medicinal chemistry. *J.Enzyme Inhib.Med.Chem.* **2007**, *22*, 527-540.
31. Meanwell N.A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J.Med.Chem.* **2011**, *54*, 2529-2591.
32. Hodgetts K.J., Combs K.J., Elder A.M., Harriman G.C. Chapter 26 - The Role of Fluorine in the Discovery and Optimization of CNS Agents: Modulation of Drug-Like Properties, In: John E. Macor, editor. Annual Reports in Medicinal Chemistry, Academic Press, Volume 45; **2010**, p. 429-448.
33. Bur D., Dale G.E., Oefner C. A three-dimensional model of endothelin-converting enzyme (ECE) based on the X-ray structure of neutral endopeptidase 24.11 (NEP). *Protein Eng.* **2001**, *14*, 337-341.
34. Dubuisson D., Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* **1977**, *4*, 161-174.
35. Wheeler-Aceto H., Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* **1991**, *104*, 35-44.
36. Abbott F.V., Franklin K.B., Westbrook R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain.* **1995**, *60*, 91-102.
37. Rosland J.H., Tjølsen A., Maehle B., Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain.* **1990**, *42*, 235-242.
38. Tjølsen A., Berge O.G., Hunskaar S., Rosland J.H., Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* **1992**, *51*, 5-17.
39. Shields S.D., Cavanaugh D.J., Lee H., Anderson D.J., Basbaum A.I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain.* **2010**, *151*, 422-429.

40. Florentin D., Sassi A., Roques B.P. A highly sensitive fluorometric assay for “enkephalinase” a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins. *Anal.Biochem.* **1984**, *141*, 62-69.
41. Cheng Y., Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem.Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
42. Maione S., De Petrocellis L., de Novellis V., Moriello A.S., Petrosino S., Palazzo E., et al. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br.J.Pharmacol.* **2007**, *150*, 766-781.
43. Hylden J.L., Wilcox G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur.J.Pharmacol.* **1980**, *67*, 313-316.
44. Palmieri F.E., Bausback H.H., Ward P.E. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem.Pharmacol.* **1989**, *38*, 173-180.
45. Hoorn C.M., Roth R.A. Monocrotaline pyrrole-induced changes in angiotensin-converting enzyme activity of cultured pulmonary artery endothelial cells. *Br.J.Pharmacol.* **1993**, *110*, 597-602.
46. Jeng A.Y., Mulder P., Kwan A.L., Battistini B. Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **2002**, *80*, 440-449.
47. Binkert C., Frigerio M., Jones A., Meyer S., Pesenti C., Prade L., et al. Replacement of isobutyl by trifluoromethyl in pepstatin A selectively affects inhibition of aspartic proteinases. *Chembiochem.* **2006**, *7*, 181-186.
48. Biffinger J.C., Kim H.W., DiMagno S.G. The Polar Hydrophobicity of Fluorinated Compounds. *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 622-627.
49. Wu H.E., Hung K.C., Mizoguchi H., Nagase H., Tseng L.F. Roles of endogenous opioid peptides in modulation of nocifensive response to formalin. *J.Pharmacol.Exp.Ther* **2002**, *300*, 647-654.
50. Bourgoin S., Le Bars D., Clot A.M., Hamon M., Cesselin F. Subcutaneous formalin induces a segmental release of Met-enkephalin-like material from the rat spinal cord. *Pain.* **1990**, *41*, 323-329.

51. Wu S.X., Li Y.Q., Shi J.W. Temporal changes of preproenkephalin mRNA and leu-enkephalin-like immunoreactivity in the neurons of the caudal spinal trigeminal nucleus and upper cervical cord after noxious stimuli. *J.Hirnforsch.* **1998**, *39*, 217-222.
52. Lapeyre S., Mauborgne A., Becker C., Benoliel J.J., Cesselin F., Hamon M, et al. Subcutaneous formalin enhances outflow of met-enkephalin- and cholecystokinin-like materials in the rat nucleus accumbens. *Naunyn.Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **2001**, *363*, 399-406.
53. Benuck M., Berg M.J., Marks N. Met-enkephalin-Arg6-Phe7 metabolism: conversion to Met-enkephalin by brain and kidney dipeptidyl carboxypeptidases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1981**, *99*, 630-636.
54. Vats I.D., Chaudhary S., Karar J., Nath M, Pasha Q., Pasha S. Endogenous peptide: Met-enkephalin-Arg-Phe, differently regulate expression of opioid receptors on chronic treatment. *Neuropeptides.* **2009**, *43*, 355-362.
55. Noble F., Blommaert A., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P. A selective CCKB receptor antagonist potentiates, mu-, but not delta-opioid receptor-mediated antinociception in the formalin test. *Eur.J.Pharmacol.* **1995**, *273*, 145-151.
56. Obara I., Przewlocki R., Przewlocka B. Local peripheral effects of mu-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. *Neurosci.Lett.* **2004**, *360*, 85-89.

CAPITOLO 4

MICROEMULSIONI PER LA VEICOLAZIONE IN ACQUA DI CANNABINOIDI: CARATTERIZZAZIONE DELLA MICROSTRUTTURA DI MICROEMULSIONI NONIONICHE CONTENENTI Δ^9 -TETRAIDROCANNABINOLO

4.1 Introduzione

Lo sviluppo di potenziali formulazioni acquose a base di cannabinoidi risulta particolarmente limitato dalle caratteristiche chimico fisiche di questa classe di composti. Sia i composti cannabinoidergici naturali, come ad esempio il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), sia i cannabinoidi di sintesi sono infatti caratterizzati da un'elevata lipofilità e da una consistenza che li rende difficilmente maneggiabili nei processi di formulazione convenzionali.

L'individuazione di formulazioni base liquide acquose caratterizzate da elevata *shelf-life* ed in grado di veicolare opportuni quantitativi di composti ad azione cannabinoidergica risulta quindi di rilevanza ai fini della validazione delle nuove strategie farmacologiche basate su questa classe di composti e del loro trasferimento nella pratica clinica.

Tra i pochi prodotti attualmente presenti sul mercato di riferimento contenenti cannabinoidi naturali (Cesamet[®], Marinol[®], Sativex[®]), solo Sativex[®] è costituito da una formulazione liquida.¹ Il farmaco, commercializzato in forma di spray per la somministrazione sublinguale, è costituito in particolare da una miscela di Δ^9 -THC e di cannabidiolo in una soluzione alcolica (etanolo) contenente propilen glicole e olio essenziale di menta.² Nonostante Sativex[®] stia riscontrando sempre più interesse nella pratica clinica, anche a seguito della liberalizzazione dell'uso terapeutico dei cannabinoidi in un numero crescente di nazioni, è tuttavia da rilevare come siano stati evidenziati alcuni effetti collaterali e alcuni limiti correlati all'impiego di questo farmaco. In particolare sono stati riportati quali effetti indesiderati: elevata variabilità di efficacia fra soggetti, sapore sgradevole, irritazione del cavo orale.³

Uno studio precedentemente condotto aveva dimostrato la possibilità di solubilizzare Δ^9 -THC in acqua attraverso l'impiego di un tensioattivo nonionico commerciale Solutol[®] HS15 (BASF), costituito da una miscela di poli(etilenglicol)₁₅-12-idrossistearato/PEG in rapporto 70/30 peso/peso.⁴ Composizioni contenenti lo 0,19 % di Δ^9 -THC, nella forma di microemulsioni olio

in acqua caratterizzate da un raggio idrodinamico dell'ordine di 7-8 nm, avevano mostrato attività analgesiche in modelli animali di dolore acuto (tail flick e hot plate), sia nel caso di somministrazione intraperitoneale che orale.⁴

I vantaggi delle specifiche formulazioni del cannabinoide naturale sono stati evidenziati nel lavoro precedentemente pubblicato e sono tuttavia riconducibili in generale alle peculiarità di questa tipologia di sistemi dispersi. A differenza delle emulsioni (sistemi multicomponenti stabilizzati dalla presenza di uno o più tensioattivi e co-tensioattivi, la cui stabilità è esclusivamente cinetica e risulta quindi limitata nel tempo), le microemulsioni presentano infatti stabilità termodinamica e risultano pertanto indefinitivamente stabili, almeno fintanto che non vengano perturbate dall'esterno (ad esempio: variazione della temperatura al di fuori dell'intervallo di stabilità termica, degradazione dei componenti, introduzione di nuovi componenti o solventi). La natura delle microemulsioni, rende questi sistemi di particolare interesse anche dal punto di vista tecnologico. A differenza della preparazione di emulsioni che richiede l'uso di apparecchiature particolari (ad esempio turboemulsori o emulsificatori ad elevata pressione) in grado di fornire un'opportuna energia al sistema al fine di disperdere adeguatamente una delle due fasi nell'altra garantendone la stabilizzazione, le microemulsioni possono essere ottenute per semplice miscelazione dei componenti. I vantaggi dell'uso delle microemulsioni come sistemi base per il *drug delivery* sono ampiamente descritti nella letteratura di riferimento.⁵⁻¹⁰

Allo scopo di ampliare le conoscenze di base sulle microemulsioni precedentemente individuate e al fine di poter successivamente impiegare tali sistemi per la solubilizzazione di altri principi attivi, con particolare riferimento a cannabinoidi ed oppioidi di sintesi, nel corso della presente ricerca si è voluto approfondire lo studio di sistemi binari Solutol[®] HS15 (HS15)/acqua, investigando successivamente l'effetto sulla microstruttura indotto da Δ^9 -THC.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Materiali

Il prodotto commerciale Solutol[®] HS15, poli(etilen glicol)₁₅-12-idrossistearato (HS15), è stato gentilmente offerto dalla BASF GmbH, Germania. In accordo con le informazioni tecniche fornite dal produttore ed in base a quanto descritto in letteratura,^{4,11-12} HS15 è costituito da una miscela consistente nel 70% in peso di poli(etilen glicol)₁₅ mono- e di-esteri dell'acido 12-idrossistearico e nel 30% in peso di PEG libero. Nel corso di questo capitolo il contenuto di

HS15 è riferito alla composizione del campione commerciale del tensioattivo non ionico. La densità di HS15 è stata assunta pari a 1,03 g/ml, senza discriminare tra tensioattivo e PEG libero.

Il Δ^9 -tetraidrodrocannabinolo (THC) è stato acquistato da Sigma-Aldrich in soluzione di etanolo (10 mg/mg). Durante la preparazione del campione pseudo-ternario, il principio attivo è stato essiccato a temperatura ambiente sotto un leggero flusso di azoto, in assenza di luce, prima di addizionarlo agli altri componenti. La completa eliminazione dell'etanolo dai campioni contenenti THC è stata accertata da analisi gas-cromatografiche. L'acqua deuterata (densità 1.11 g/mg) è stata acquistata da “*Cambridge Isotopes Laboratories*”, Inc., il cloruro di sodio è un prodotto Sigma Aldrich.

4.2.2 Diagramma di fase

Allo scopo di poter disporre di sistemi caratterizzabili con le metodologie di analisi tipiche dei sistemi dispersi, con particolare riferimento alla tecnica di *Self-Diffusion* NMR, il diagramma di fase precedentemente studiato,⁴ è stato nuovamente analizzato sostituendo l'acqua con D₂O. Il diagramma di fase THC/HS15/D₂O, e l'analogo contenente 5 mM di NaCl in D₂O, sono stati determinati a 25±1 °C tramite una tecnica di titolazione convenzionale in accordo con procedure riportate precedentemente.^{4,13} I diagrammi di fase sono stati studiati per rapporti THC/HS15 peso/peso inferiori a 20/80. L'attenzione è stata focalizzata su sistemi isotropi e fasi liquido-cristalline. I confini di fase identificati sono stati successivamente confermati attraverso la caratterizzazione di campioni indipendenti.

4.2.3 Reologia

La caratterizzazione reologica dei campioni è stata effettuata a 25±0,5 °C utilizzando un reometro rotazionale *Thermo Haake Mars III*, attrezzato con una cella di misura a piatto di cono (diametri pari a 20 e 60 mm, angolo di cono = 1°). Per evitare l'evaporazione del campione durante gli esperimenti, è stata utilizzata una trappola per solvente.

4.2.4 Misure di conducibilità

Le misure sono state effettuate a 25±0,5 °C utilizzando un conduttimetro *CDM230 (Radiometer Analytical)* attrezzato con una cella a conducibilità a due poli “tailored” *CDC749* per piccoli volumi (costante di cella 1,4543 cm⁻¹).

4.2.5 Misure di *Dynamic Light Scattering*

E' stato utilizzato lo strumento commerciale *Zetasizer-Nano S* (Malvern), operante con un laser a 4 mW He-Ne (633 nm di lunghezza d'onda) e angolo fisso del rivelatore di 173° (geometria di backscattering non invasiva). La funzione di tempo di autocorrelazione (ACF) dell'intensità di luce dispersa è stata convertita nella ACF del campo elettrico disperso. Da questa ultima quantità, il software fornito dal produttore ha valutato il coefficiente di diffusione z-mediato del moto collettivo (Ddls) attraverso l'analisi dei cumulanti (II ordine). Le misure sono state effettuate a 25±0,5 °C.

4.2.6 Misure NMR

Le misure NMR sui nuclei ¹H sono state effettuate con l'utilizzo di uno spettrometro *Bruker Avance 300 MHz* (7.05T) operante alle frequenze di 300,13 e 46,07 MHz, rispettivamente. E' stata usata un'unità di controllo BVT standard a temperatura variabile con una accuratezza di ± 0,5 °C. Gli esperimenti ¹H NMR sono stati effettuati a 25°C.

4.2.7 Esperimenti ¹H NMR di *self-diffusion*

I coefficienti di *self-diffusion* sono stati determinati usando un probe DIFF30 equipaggiato con un amplificatore Bruker 1/40 in grado di generare gradienti di campo sino a 1,2 Tm⁻¹. E' stata impiegata la sequenza "*Pulse Field Gradient Simulated Echo*" (PFGSTE). I coefficienti di *self-diffusion* sono stati ottenuti variando la forza del gradiente (G) mantenendo costanti la lunghezza del pulso del gradiente (d) e gli intervalli tra i pulsanti di gradiente per ciascuna corsa sperimentale. I dati sono stati elaborati in base all'equazione di Stejskal e Tanner:¹⁴

$$I/I_0 = \exp(-Dq^2t)$$

dove I e I₀ sono le intensità di segnale, in presenza ed in assenza di gradiente di campo applicato, q= γGδ è il cosiddetto vettore di scattering (dove γ è il rapporto giromagnetico del nucleo osservato), t=(Δ-δ/3) è il tempo di diffusione, Δ l'intervallo tra i pulsanti e D il coefficiente di *self-diffusion* che deve essere estratto.

Gli errori sui coefficienti di *self-diffusion* sono stati stimati essere attorno al 2% sulla base di misure ripetute.

4.3 Risultati e Discussione

4.3.1 Diagramma di fase

Il diagramma di fase THC/HS15/D₂O costruito a 25°C è stato riportato in Figura 1. Non sono state individuate differenze rilevabili tra il diagramma di Figura 1 e l'analogo diagramma di fase contenente acqua al posto di D₂O.⁴ In particolare, è stata individuata la formazione di fasi liquido cristalline lamellari in corrispondenza di contenuti di D₂O tra 20 e 37 % peso, per rapporti THC/HS15 (peso/peso) compresi tra 4:96 e 17:83. Incrementando il contenuto di D₂O è stato possibile individuare un'ampia regione di esistenza di campioni liquidi isotropi (nominalmente microemulsioni) che si estende fino al vertice di D₂O.

La presenza di NaCl nella fase acquosa, alla concentrazione adottata (5mM) non ha determinato alcuno spostamento dei confini tra le varie aree individuate all'interno del diagramma di fase. L'indagine del sistema pseudo-binario HS15/W è cominciata attraverso l'ispezione visiva ad occhio nudo e tramite luce polarizzata di un numero di campioni preparati a diverso contenuto di acqua (Figura 1). Tutti i campioni binari sono risultati isotropi. L'indagine condotta ha evidenziato un significativo incremento della viscosità fino ad un contenuto di tensioattivo pari al 50 % peso in cui i campioni hanno assunto un aspetto di gel. L'assenza di birifrangenza alla luce polarizzata ha escluso la presenza di fasi liquidi cristalline lamellari o esagonali nei sistemi viscosi individuati.

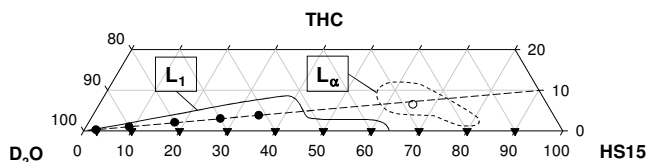


Figura 1. Diagramma di fase THC/HS15/D₂O a 25°C. L₁ fase liquida isotropa, L_α area di fasi liquido cristalline lamellari. Triangoli: campioni liquidi isotropi del diagramma binario HS15/D₂O analizzati nel corso della ricerca; cerchi pieni: campioni liquidi isotropi sistema ternario studiati.

4.3.2 Proprietà reologiche e di trasporto

Gli attributi reologici e le proprietà di trasporto di dispersioni colloidali contengono tipicamente informazioni importanti sulla microstruttura del sistema. La dipendenza della viscosità e della conducibilità del sistema binario HS15/acqua in funzione della frazione di volume del tensioattivo è evidenziata dagli andamenti riportati in Figura 2.

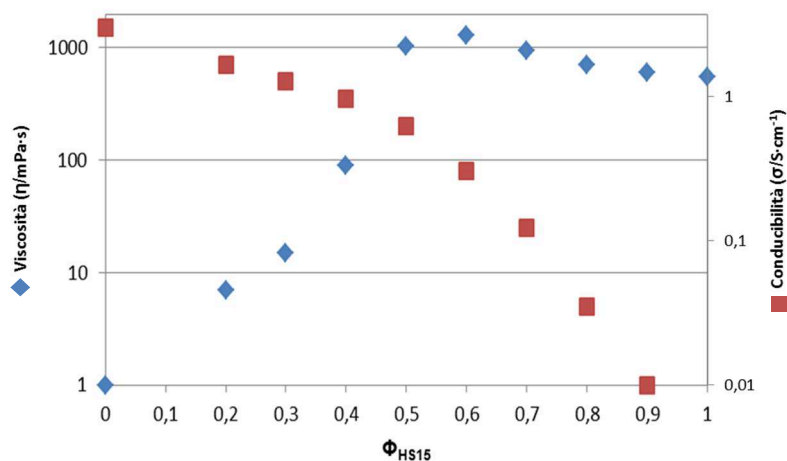


Figura 2. Viscosità e conducibilità di sistemi binari HS15/D₂O (NaCl 5 mM) a 25°C.

La viscosità di D₂O, prossima a 1 mPa s, è stata significativamente incrementata dall'aggiunta di HS15, fino al raggiungimento di valori pari a 1 Pa s per $\Phi_{HS15} \sim 0,5$. Un ulteriore incremento della concentrazione di tensioattivo ha indotto una leggera diminuzione della viscosità che si è attestata intorno al valore corrispondente a HS15 tal quale (circa 0,5 Pa s). A differenza di quanto ci si sarebbe potuto attendere sulla base dell'andamento della viscosità di un sistema determinato dal mescolamento fra due liquidi caratterizzati da viscosità molto diversa, la viscosità del sistema D₂O/HS15 al crescere di HS15 ha presentato un profilo non-monotonico. Decrementi monotonici al crescere del contenuto di HS15 sono stati invece determinati sia per il coefficiente di diffusione di aggregati D_{DLS} determinato mediante laser light scattering (Figura 3), che per il coefficiente di diffusione dell'acqua (D_{HDO}), così come rilevato da misure NMR di self diffusion (Figura 4). E' da rilevare come i valori di D_{DLS} alle più basse concentrazioni di HS15 ($D_{DLS} = 3,31 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), attraverso l'applicazione dell'equazione di Stokes-Einstein priva di fattori di ostruzione:

$$D = KT/6\pi\eta R$$

siano risultati compatibili con aggregati caratterizzati da raggio idrodinamico intorno ai 6 nm, in accordo con dati precedentemente riportati sullo stesso sistema binario, determinati a 25°C mediante la stessa tecnica.⁴ A partire da Φ_{HS15} intorno a 0,6 i valori di D_{DLS} sono risultati decadere drasticamente, in accordo con quanto rilevato anche attraverso la determinazione del coefficiente di diffusione di D_{HDO} mediante esperimenti di NMR *self-diffusion* (Figura 4). L'andamento dei coefficienti di diffusione dell'acqua in funzione della frazione in volume di HS15 è risultato parallelo all'andamento della conducibilità (σ) come mostrato in Figura 2.

Benché sia stata rilevata una diminuzione di σ superiore a due ordini di grandezza, nell'intervallo di concentrazioni studiato non sono state individuate discontinuità evidenti.

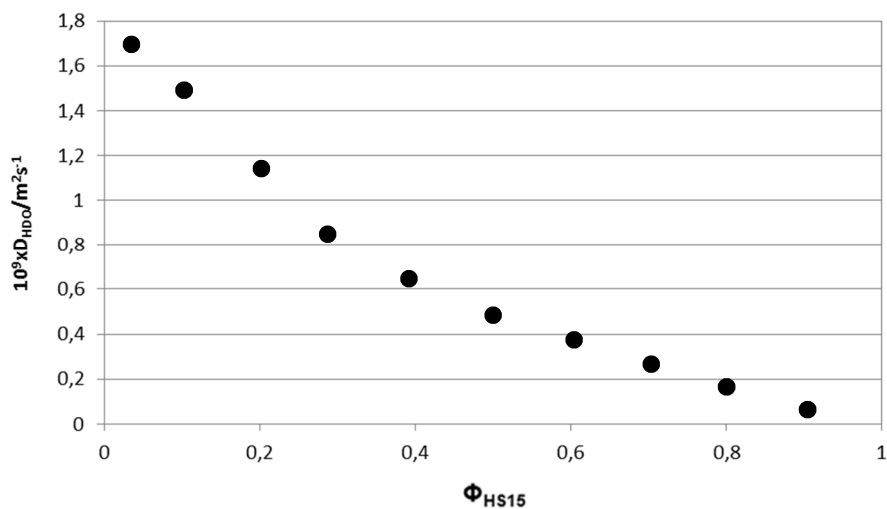


Figura 3. Coefficiente di diffusione di aggregati D_{DLS} determinato a 25°C mediante *laser light scattering*. Fase acqua: soluzione 5 mM NaCl in D_2O .

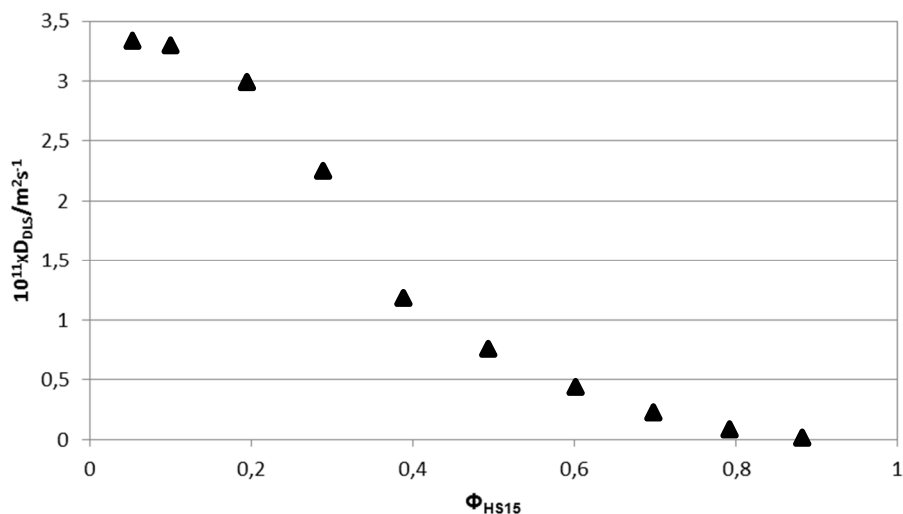


Figura 4. Coefficiente di diffusione dell'acqua (D_{H_2O}) da misure NMR di *self-diffusion*. Fase acqua: soluzione 5 mM NaCl in D_2O .

4.3.3 Diffusione del tensioattivo

L'analisi NMR dei coefficienti di diffusione del tensioattivo è risultata più complessa in relazione alla presenza nel campione commerciale di HS15 anche di PEG. Lo spettro ^1H NMR presenta infatti tre principali picchi corrispondenti a: protoni di gruppi CH_2CH_2 appartenenti a etilenossidi sia del tensioattivo che di PEG (ca. 3,8 ppm), protoni metilenici del tensioattivo (ca. 1,3 ppm), protoni del $-\text{CH}_3$ terminale delle catene di tensioattivo (ca. 0,9 ppm). Conseguentemente il decadimento del segnale a 3,8 ppm non è risultato mono-esponenziale, ma ha presentato un andamento bi-esponenziale, compatibile con la presenza di una specie lenta ed una più rapida, in rapporto molecolare pari a 30:70. In accordo con quanto precedentemente riportato da Momot *et al.* la specie lenta, caratterizzata da coefficiente di diffusione $^{\text{slow}}D_{\text{EO}}$, è risultata riconducibile al tensioattivo vero e proprio, mentre quella più veloce, caratterizzata da coefficiente di diffusione $^{\text{fast}}D_{\text{EO}}$, è stata correlata alle molecole di PEG libero.¹¹⁻¹² L'interpretazione derivante dall'analisi del decadimento del picco a 3,8 ppm è stata confermata seguendo l'andamento del picco corrispondente ai protoni del CH_3 terminale della catena di tensioattivo a 0,9 ppm. L'andamento del coefficiente di diffusione determinato da quest'ultimo segnale (D_{HS}) in funzione della concentrazione di HS15 è risulta infatti sovrapponibile a quello determinato per $^{\text{slow}}D_{\text{EO}}$ (Figura 5). E' da rilevare come, in accordo con l'andamento dei valori di viscosità (Figura 2), il coefficiente di diffusione del tensioattivo presenti un minimo in corrispondenza di concentrazioni di HS15 attorno al 50% in peso.

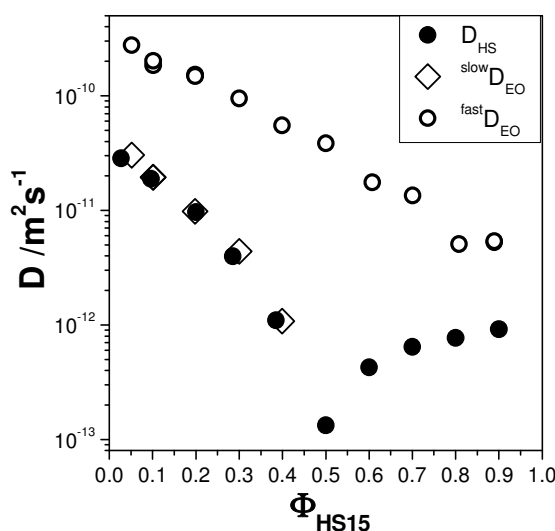


Figura 5. Coefficienti di diffusione a 25°C determinate da misure di PGSTE-NMR echo decay del picco corrispondente ai protoni del CH_3 terminale (cerchi pieni) o di quello dei protoni dei CH_2 etossilici (cerchi e rombi vuoti).

4.3.4 Impatto di Δ^9 -THC sulla diffusione del tensioattivo

La presenza di Δ^9 -THC (THC) ha comportato un sostanziale mutamento delle caratteristiche macroscopiche e della microstruttura dei sistemi binari HS15/acqua. In particolare, in accordo con quanto precedentemente riportato, la penetrazione del cannabinoide all'interno delle catene del tensioattivo ha indotto una riorganizzazione di queste ultime fino alla comparsa di strutture liquido cristalline lamellari (Figura 1).⁴

La regione L_1 del sistema pseudo-ternario HS15/THC/D₂O è stata esaminata lungo una linea di diluizione in acqua per indagare attraverso misure NMR di *self-diffusion* l'effetto della solubilizzazione dei Δ^9 -THC (THC) sulla microstruttura delle micelle di HS15. Le risonanze NMR del ¹H di THC tra 6,0 e 7,0 ppm, corrispondenti ai protoni aromatici del composto cannabinoide sono state usate per calcolare i coefficienti di *self-diffusion* attraverso il fitting mono-esponenziale dei loro valori di intensità.

La determinazione dei coefficienti di diffusione del tensioattivo, dell'acqua e di THC ha permesso di rilevare importanti effetti indotti da Δ^9 -THC sulla microstruttura dei sistemi HS15/Acqua (Tabella 1). I coefficienti di diffusione del cannabinoide sono risultati sovrapponibili a quelli del tensioattivo, indicando quindi nei sistemi analizzati la presenza di aggregati di HS15 contenenti Δ^9 -THC. I dati raccolti hanno quindi confermato la formazione di microemulsioni olio in acqua. A parità di frazione di fase dispersa, rispetto ai sistemi binari, la presenza di Δ^9 -THC ha determinato una diminuzione del coefficiente di diffusione del tensioattivo, indice di un aumento delle dimensioni degli aggregati rispetto a quelle delle micelle del tensioattivo tal quale.

Tabella 1. Coefficienti di diffusione (m^2s^{-1}) di HS15, Δ^9 -THC e acqua determinati in campioni ternari (ter) o binari (bin) caratterizzati da analoghi valori di frazione in volume di fase dispersa (Φ).

Φ_{ter}	$D_{HS15,ter}$	$D_{THC,ter}$	$D_{HDO,ter}$	Φ_{bin}	$D_{HS15,bin}$	$D_{HDO,bin}$
0,02	$2,47 \times 10^{-11}$	$2,38 \times 10^{-11}$	$1,78 \times 10^{-09}$	0,02	$2,85 \times 10^{-11}$	$1,76 \times 10^{-09}$
0,08	$1,51 \times 10^{-11}$	$1,43 \times 10^{-11}$	$1,53 \times 10^{-09}$	0,07	$1,89 \times 10^{-11}$	$1,54 \times 10^{-09}$
0,15	$6,99 \times 10^{-12}$	$6,68 \times 10^{-12}$	$1,18 \times 10^{-09}$	0,15	$9,66 \times 10^{-12}$	$1,13 \times 10^{-09}$
0,23	$2,71 \times 10^{-12}$	$2,66 \times 10^{-12}$	$9,69 \times 10^{-10}$	0,22	$3,97 \times 10^{-12}$	$8,30 \times 10^{-10}$
0,29	$4,10 \times 10^{-13}$	$4,00 \times 10^{-13}$	$7,34 \times 10^{-10}$	0,29	$1,10 \times 10^{-12}$	$5,63 \times 10^{-10}$

I dati riportati in Tabella 1 hanno inoltre evidenziato un significativo effetto di THC sul coefficiente di diffusione del tensioattivo rispetto ai corrispondenti sistemi binari (Confronto $D_{HS15,ter}$ vs $D_{HS15,bin}$). Tale differenza non può essere attribuita al semplice “*swelling*” della micella di tensioattivo dovuto al THC, essendo la frazione di volume della fase dispersa approssimativamente la stessa nei due diversi sistemi per ciascuna delle composizioni indagate. A parità della frazione in volume di fase dispersa (Φ), la variazione fra $D_{HS15,ter}$ vs $D_{HS15,bin}$ può essere piuttosto correlata ad un incremento della viscosità del mezzo a seguito dell’aggiunta di THC o ad una variazione della forma degli aggregati. Relativamente al potenziale effetto indotto dalla variazione della viscosità del mezzo è tuttavia da rilevare come la sostituzione di una frazione di HS15 del sistema binario con un’equivalente frazione di THC determini una conseguente diminuzione della concentrazione di PEG e quindi una riduzione, e non un aumento, della viscosità. E’ infatti noto che PEG, particolarmente solubile nella fase acquosa, possa determinare un incremento della viscosità del mezzo acquoso. Questo effetto risulta di fatto rilevabile anche attraverso l’analisi dei valori di D_{HDO} in Tabella 1, in particolare dal confronto fra $D_{HDO,bin}$ e $D_{HDO,ter}$. A parità della frazione in volume di fase dispersa (Φ), D_{HDO} risulta infatti sempre maggiore in presenza di THC rispetto al corrispondente binario, evidenziando quindi una riduzione, e non un incremento, della viscosità del sistema. In relazione a quanto sopra esposto, la variazione rilevata fra $D_{HS15,ter}$ vs $D_{HS15,bin}$ può quindi essere ragionevolmente correlata ad una variazione della forma degli aggregati. In questo senso è comunque da escludere la formazione di micelle “*wormlike*” che caratterizzano tensioattivi nonionici in presenza di co-tensioattivi.¹⁵ Detti sistemi aggregati, generalmente a basse concentrazioni di tensioattivo, evidenziano infatti un minimo nell’andamento del coefficiente di diffusione del tensioattivo vs Φ , che non è stato invece rilevato nei sistemi studiati.¹⁶

4.4 Conclusioni

L’attività condotta ha permesso di caratterizzare la microstruttura di soluzioni acquose di HS15 e di indagare gli effetti indotti da THC sugli aggregati del tensioattivo nonionico. E’ da rilevare come, nonostante il prodotto commerciale HS15 sia stato approvato per uso parenterale da alcuni anni, non siano stati riportati nella letteratura di riferimento studi analoghi a quelli condotti nella presente ricerca.

I risultati ottenuti da misure reologiche, di conducibilità, di laser light scattering e di *self-diffusion* NMR, hanno evidenziato per il sistema HS15/Acqua un profilo compatibile con una

miscela binaria eterogenea nell'intero campo di composizione, in cui gli aggregati individuabili in presenza di alti contenuti di acqua collassano in prossimità di una frazione di volume di fase dispersa pari a circa 0,5.

L'inclusione di THC nel sistema HS15/acqua ha determinato un aumento del parametro di impaccamento effettivo del tensioattivo con una conseguente modifica dell'arrangiamento del film interfase che ha indotto una alterazione della forma degli aggregati rispetto a quelli caratterizzanti i corrispondenti sistemi binari.

4.5 Referenze

1. Pertwee R.G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonist as medicines. *Br. J.Pharmacol.* **2009**, *156*, 397-411.
2. Rog D.J., Nurmikko T.J., Young C.A. Oromucosal Δ^9 -tetrahydrocannabinol/Cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clin. Ther.* **2007**, *29*, 2068-2079.
3. Mannilla J., Järvinen T., Järvinen K., Tervonen J., Jarho P. Sublingual administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol/ β -cyclodextrin complex increases the bioavailability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rabbits. *Life Sciences* **2006**, *78*, 1911-1914.
4. Lazzari P., Fadda P., Marchese G., Casu G.L., Pani L. Antinociceptive activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol non-ionic microemulsions. *Int.J.Pharm.* **2010**, *393*, 238-243.
5. Jadhav K.R., Shaikh I.M., Ambade K.W., Kadam V.J. Applications of Microemulsion-Based Drug Delivery System. *Curr.Drug.Deliv.* **2006**, *37*, 267-273.
6. Kogan, A., Garti, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv.Colloid.Interface Sci.* **2006**, *123*, 369-385.
7. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2002**, *54 Suppl.1*, S77-S98.
8. Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2000**, *45*, 89-121.
9. Spornath A., Aserin A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv.Coll.Int.Sci.* **2006**, *128*, 47-64.
10. Vandamme, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog.Retin.Eye Res.* **2002**, *21*, 15-34
11. Momot K.I., Kuchel P.W., Chapman B.E., Deo P., Whittaker D. NMR study of the association of Propofol with nonionic surfactants. *Langmuir.* **2003**, *19*, 2088-2095.

12. Momot K.I., Kuchel P.W. Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a tool for studying drug delivery systems. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2003**, *19*, 51-64.
13. Lv F.F., Li N., Zheng L.Q., Tung C.H. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* **2006**, *62*, 288-294.
14. Caboi F., Murgia S., Monduzzi M., Lazzari P. NMR investigation on Melaleuca alternifolia essential oil dispersed in the monoolein aqueous system: Phase behavior and dynamics. *Langmuir.* **2002**, *18*, 7916-7922.
15. Acharya D.P., Kunieda H. Wormlike micelles in mixed surfactant solutions. *Adv.Colloid Interface Sci.* **2006**, *123-126*, 401-413.
16. Lo Nostro P., Murgia S., Lagi M., Fratini E., Karlsson G., Almgren M., Monduzzi M., Ninham B.W., Baglioni P. Interconnected Networks: Structural and Dynamic Characterization of Aqueous Dispersions of Dioctanoylphosphatidylcholine. *J.Phys.Chem.B.* **2008**, *112*, 12625-12634.

CAPITOLO 5

MICROEMULSIONI LIPIDICHE CONTENENTI NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPIOIDI CON ATTIVITA' ANALGESICA

5.1 Introduzione

La rilevanza nel settore farmaceutico di composti caratterizzati da elevata affinità e selettività per i recettori degli oppioidi mu, delta e kappa è confermata attraverso il loro impiego clinico in molte aree terapeutiche come il dolore, i disturbi gastrointestinali, l'abuso di droghe, tosse.¹ Ulteriori applicazioni farmaceutiche sono state ipotizzate sulla base di numerosi studi preclinici, fra queste le più rilevanti sembrano essere: malattie del sistema immunitario, disfunzioni sessuali, glaucoma, disturbi del tratto urogenitale, malattie di Parkinson e di Alzheimer.²⁻⁹ Il trattamento del dolore è considerata la principale applicazione farmaceutica di oppioidi agonisti. La morfina ed i corrispondenti derivati sono ampiamente utilizzati in clinica per il trattamento di diverse forme di dolore, nonostante diversi effetti collaterali siano stati accertati. Tra questi si citano: costipazione, depressione respiratoria, tolleranza, dipendenza, disturbi correlati al *withdrawn*.⁷⁻¹⁰

In virtù di quanto sopra esposto, molti gruppi di ricerca hanno focalizzato l'attenzione verso l'individuazione e lo sviluppo di nuove strategie farmacologiche basate su nuovi composti oppioidergici caratterizzati da ridotti effetti collaterali rispetto a quelli correlati all'uso della morfina e dei suoi derivati. Di particolare interesse sono risultati composti oppioidergici mu selettivi caratterizzati da una struttura base diazabicicloalcanica.¹¹⁻¹³ Un ulteriore sviluppo di detti composti ha portato recentemente all'ottenimento di una nuova classe di diazabicicloalcani contenenti un anello omopiperazinico.¹⁴ I nuovi composti hanno in particolare evidenziato elevata affinità per i recettori mu e, nella maggior parte dei casi, anche una buona o accettabile affinità per gli altri sottotipi recettoriali degli oppioidi delta e/o kappa. Inoltre, anche se solo attraverso saggi preliminari in vivo, *leads* selezionati all'interno della nuova classe di composti hanno mostrato interessanti profili farmacologici, evidenziando ridotti effetti collaterali rispetto alla morfina.¹⁵ Tuttavia la marcata lipofilità dei nuovi composti ha evidenziato alcuni limiti applicativi ai fini dello sviluppo di strategie farmacologiche in clinica basate su questa classe di oppioidi.

Tra le differenti forme di veicolazione, formulazioni basate su sistemi acquosi per la somministrazione parenterale sono risultati di particolare interesse per l'ottenimento di preparati farmaceutici per il trattamento del dolore. Al fine di supportare lo sviluppo di potenziali farmaci basati sulla nuova classe di composti oppioidergici a struttura diazabiccicloalcanica, nell'ambito della presente ricerca è stata valutata la possibilità di ottenere formulazioni acquose iniettabili caratterizzate da elevata stabilità ed in grado di assicurare la biodisponibilità dei suddetti derivati oppioidergici. Considerando la stabilità termodinamica delle microemulsioni ed i riconosciuti vantaggi di questa tipologia di sistemi base nella preparazione di formulazioni farmaceutiche per diversi usi,¹⁶⁻²⁴ l'attenzione è stata rivolta a studi formulativi mirati a solubilizzare i nuovi derivati oppioidergici in microemulsioni olio in acqua (O/W). Lo studio è stato condotto adottando i derivati denominati **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**, rispettivamente 10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicciclo[4.3.1] decano e (*E*)-10-[3'-(3,4-diclorofenil)but-2-en-1-il]-3-propionil-3,10-diazobicciclo [4.3.1]decano, quali *leads* della nuova classe di oppioidi (Figura 1).

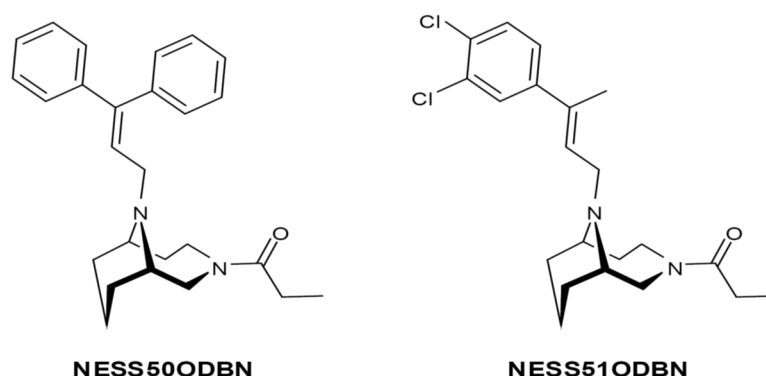


Figura 1: Strutture chimiche dei nuovi composti oppioidergici **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**.

Nell'ambito della ricerca è stata verificata l'attività mu agonista dei suddetti composti attraverso un opportuno saggio in vitro.

Il tensioattivo nonionico commerciale Solutol[®]HS15 (HS15) e una miscela commerciale di trigliceridi a catena media Miglyol[®]812S (MCT), entrambi approvati per la somministrazione parenterale nell'uomo,²⁵⁻²⁸ sono stati utilizzati per la preparazione delle microemulsioni. Nell'ambito degli studi formulativi non è stato invece preso in considerazione l'uso di co-tensioattivi, di modificatori della polarità del solvente (ad esempio: alcoli e polietilenglicole),

o di modulatori della flessibilità dell'interfaccia olio/acqua (ad esempio: alcoli a catena corta), spesso utilizzati al fine di garantire l'ottenimento di microemulsioni. E' tuttavia da rilevare come polietilenglicole (PEG) fosse in ogni caso presente all'interno delle formulazioni studiate in quanto sottoprodotto caratterizzante la composizione commerciale di HS15. Così come fornito dal produttore (BASF GmbH), HS15 consiste infatti in una miscela di poli(etilen glicol)₁₅ mono- e di-esteri dell'acido 12-idrossistearico e di PEG libero (Figura 2).

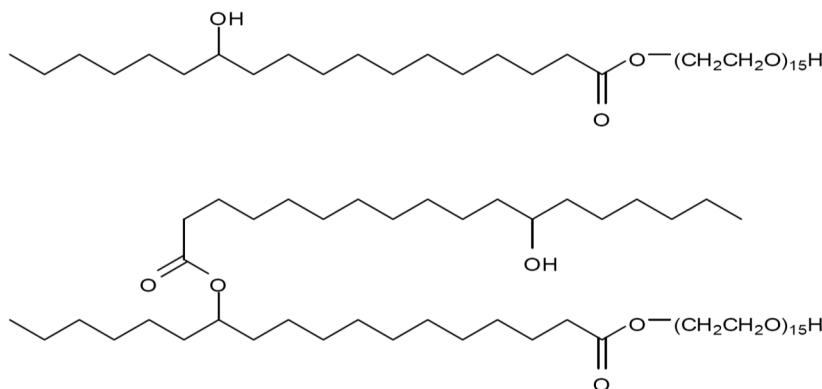


Figura 2: Strutture chimiche del componente principale del campione commerciale del tensioattivo nonionico Solutol[®] HS15.

Lo studio formulativo è stato condotto attraverso la costruzione parziale del diagramma di fase MCT/HS15/acqua (W) o soluzione salina (SS), focalizzando l'attenzione sulla zona del vertice dell'acqua. Il diagramma di fase è stato studiato a 25°C, individuando campioni isotropi liquidi (nominalmente microemulsioni), emulsioni, o campioni bifasici. Entrambi gli oppioidi sono stati solubilizzati in campioni selezionati di microemulsioni all'interno dell'area isotropa liquida individuata nel diagramma di fase studiato.

Alcune microemulsioni sono state caratterizzate in termini di stabilità termica, dimensione e distribuzione dimensionale delle gocce della fase dispersa, oltre che relativamente alla loro microstruttura. Lo studio condotto ha permesso inoltre di selezionare alcune microemulsioni contenenti i composti oppioidergici al fine di determinarne le potenziali applicazioni nel trattamento del dolore attraverso opportuni saggi in vivo.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Materiali

I nuovi composti 10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicyclo [4.3.1]decano e (*E*)-10-[3'-(3,4-diclorofenil)but-2-en-1-il]-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano, denominati rispettivamente **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**, sono stati sintetizzati secondo lo Schema 1, in accordo con quanto precedentemente riportato.¹⁴

Il chetone **4** è stato preparato mediante la classica reazione di Robinson-Schöpf con la contemporanea condensazione tra la benzilammina cloridrata (**1**), la glutaraldeide (**2**) e l'acido 1,3-acetondicarbossilico (**3**).

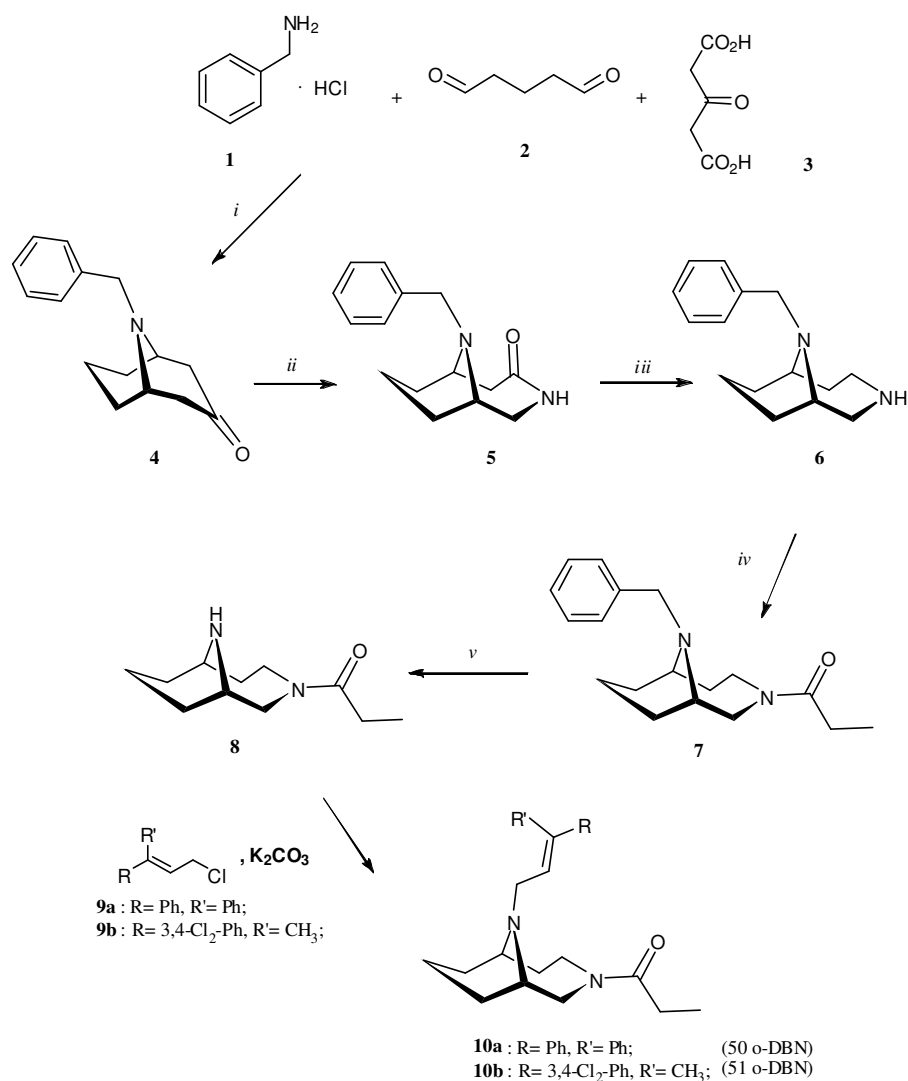
Il chetone **4** nelle condizioni di reazione di Schmidt, con acido solforico concentrato e sodioazide, ha fornito l'amminolattame **5**, che è stato di seguito ridotto a diammina **6** con litio alluminio idruro. La diammina **6** è stata acilata con anidride propionica a corrispondente propionammide **7**, che per idrogenazione catalitica del benzile ha consentito di isolare il 3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano **8**.

Il precursore **8** è stato infine alchilato con i necessari cloruri cinnamili **9a,b** per dare i desiderati prodotti di alchilazione **10a,b**.²⁹⁻³¹

In accordo con quanto descritto in letteratura, entrambi i composti hanno mostrato un'elevata affinità per i recettori degli oppioidi μ e un'accettabile affinità verso i recettori δ e/o κ (Tabella 1).

Tabella 1: Affinità dei nuovi composti per i recettori degli oppioidi. I valori di affinità sono espressi come K_i .

Composto	Affinità per i recettori degli oppioidi: K_i (nM)		
	μ	δ	κ
NESS50ODBN	3.16	187	40
NESS51ODBN	4.25	1117	425



Schema 1: Reagenti e condizioni: (i) HCl 37%, AcONa 10%, H₂O, 50°C, 2-4 h; (ii) H₂SO₄, NaN₃, 50°C, 2h (iii) LiAlH₄, THF, temperatura ambiente, 16h; (iv) (CH₃CH₂CO)₂O, CH₂Cl₂, 40°C, 1h; (v) H₂, Pd/C, EtOH, 3 atm., temperatura ambiente, 19h.

Solutol[®]HS15 (HS15) poli(etilen glicol)₁₅-12-idrossistearato e Miglyol[®]812S (MCT) sono stati forniti rispettivamente da BASF GmbH e da Sasol GmbH. In accordo con le schede tecniche dei prodotti, il campione commerciale di HS15 era una miscela consistente nel 70% in peso di poli(etilen glicol)₁₅ mono- e di-esteri dell'acido 12-idrossistearico e nel 30% in peso di PEG libero. MCT era invece una miscela di trigliceridi degli acidi grassi caprilico e caprico. La composizione dichiarata era in particolare la seguente: acido caproico (C_{6:0}) max. 2,0; acido

caprilico (C_{8:0}) 50,0-65,0; acido caprico (C_{10:0}) 30,0-45,0; acido laurico (C_{12:0}) max. 2,0; acido miristico (C_{14:0}) max 1,0.

Per gli studi formulativi è stata utilizzata acqua distillata, ulteriormente purificata tramite un apparato Milli-Q, o una soluzione salina acquistata da Eurospital SpA. Per la caratterizzazione delle microemulsioni tramite tecniche NMR è stata invece utilizzata acqua deuterata fornita da Bruker Biospin.

5.2.2 Definizione dell'attività intrinseca dei composti per i recettori degli oppioidi mu

L'attività intrinseca dei composti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** è stata valutata mediante un test in vitro basato sulla determinazione dell'espressione della proteina Phospho-ERK 1/2 (P-ERK 1/2) indotta dai composti sulla linea cellulare di Neuroblastoma Uman Cells SH-SY5Y, in cui risultano selettivamente espressi i recettori degli oppioidi. E' infatti noto dalla letteratura che agonisti dei recettori oppioidergici mu influenzano l'espressione della proteina P-ERK 1/2 in cellule di Neuroblastoma Uman Cells SH-SY5Y. In particolare è stato riportato un incremento dell'espressione di P-ERK 1/2 a seguito dell'esposizione di cellule SH-SY5Y ad agonisti mu.³²

Allo scopo di determinare l'attività intrinseca dei composti sintetizzati, si è pertanto provveduto alla messa a punto di un saggio in vitro basato su cellule SH-SY5Y e sulla quantificazione della proteina P-ERK 1/2 mediante Western-blot a seguito del trattamento delle cellule con i composti in esame. Le linee cellulari fornite dall'European Collection of Cell Cultures (ECACC) sono state acquistate da Sigma-Aldrich. La linea cellulare SH-SY5Y è stata fatta crescere a 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1X Penicillina-Streptomicina, 2 mM L-Glutamina, 2,5 µg/mL Amfotericina B e 50 µg/mL Gentamicina (Sigma-Aldrich). I saggi sono stati condotti con i composti da testare, oltre che con DAMGO (25 nM) quale agonista mu di riferimento, in un volume finale di 10 µl/mL di sospensione cellulare per analisi dose/risposta e competizione. A seguito di test preliminari condotti con DAMGO, è stato possibile definire un tempo di esposizione pari a 5 minuti quale tempo ottimale di esposizione delle cellule ai composti. Al fine di verificare che l'eventuale effetto indotto dai nuovi composti sull'espressione di P-ERK1/2 fosse mediato dai recettori mu, sono stati condotti anche saggi in presenza dell'antagonista mu selettivo CTAP (500 nM).

Le dispersioni con le cellule sono state centrifugate a 1.000 x g ed i pellets ottenuti sono stati lavati con PBS a 4°C, ulteriormente centrifugati a 1.000 x g, quindi lisati 4 °C in una soluzione

tampone HEPES. Gli estratti sono stati centrifugati a 10.000 x g per 15 minuti a 4 °C ed i surnatanti sono stati conservati come estratti delle cellule totali. Una porzione degli estratti è stata utilizzata per la quantificazione delle proteine totali. La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata usando Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen™) ed il sistema Qubit® Quantitation Platform (Invitrogen™). Per l'analisi di western-blot, 40 µg di proteine per pozzetto sono state separate su Bis-Tris Gel (NuPAGE® Novex® Invitrogen™) al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). La membrana è stata incubata over night con l'anticorpo primario Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (diluizione 1:1000) e successivamente, per due ore con l'anticorpo secondario Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (diluizione 1:3000). Il segnale di chemiluminescenza è stato visualizzato con l'uso di Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Le bande immunoreattive sono state visualizzate da Fujifilm Las-1000 analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte) e la densità ottica è stata misurata usando il software AIDA 2.11 software (Raytest Isotopenmessgeräte). I differenti livelli di P-ERK sono stati espressi come percentuale rispetto al veicolo (100%) ± SEM (cinque esperimenti indipendenti). L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test one-way Anova seguito dal post test di Dunnet utilizzando il programma GraphPad Prism 5.

5.2.3 Diagramma di fase

Il diagramma di fase è stato studiato a 25°C attraverso valutazione visiva di campioni preparati individualmente e stabilizzati per almeno tre mesi. Considerando l'interesse per l'ottenimento di microemulsioni O/W in funzione degli obiettivi della presente ricerca, il diagramma di fase è stato studiato solo parzialmente, nella regione caratterizzata da quantitativi di fase acquosa superiore al 45%. Al fine di coprire ampiamente la regione del diagramma di fase studiata, sono stati preparati campioni con composizioni crescenti del 3, massimo 5, per cento di fase acquosa lungo diverse linee di diluizione HS15/MCT. Un incremento del 5% del rapporto HS15/MCT da 5:95 a 95:5 è stato adottato come intervallo tra ciascuna linea di diluizione.

Al fine di assicurare l'ottenimento di microemulsioni compatibili con l'uso in vivo, la stessa porzione del diagramma di fase è stata analizzata sostituendo l'acqua con una soluzione salina (SS).

5.2.4 Preparazione e caratterizzazione di microemulsioni contenenti oppioidi

Sistemi liquidi isotropi comprendenti HS15, MCT e W nella seguente composizione (% peso): 7,2, 0,4 e 92,4, sono stati adottati come sistemi base (ME0) per la solubilizzazione di **NESS050ODBN** e **NESS51ODBN**. Al fine di determinare l'effetto della solubilizzazione dei composti oppioidergici sulle caratteristiche macroscopiche così come sulla microstruttura della microemulsione di riferimento ME0, campioni HS15/W/MCT/**NESS50ODBN** (o **NESS51ODBN**) sono stati preparati mantenendo fisse le concentrazioni di HS15 e MCT (rispettivamente 7,2 e 0,4% in peso). In particolare sono stati preparati i campioni caratterizzati dalle composizioni riportate in Tabella 2. Campioni analoghi sono stati preparati sostituendo W con SS.

Tabella 2: Composizione delle microemulsioni.

Campione	Composizione (% peso)					
	H ₂ O	Soluz. Salina	MCT	HS15	NESS50ODBN	NESS51ODBN
ME0	92,4	0,0	0,4	7,2	0,0	0,0
ME1	92,2	0,0	0,4	7,2	0,2	0,0
ME2	91,8	0,0	0,4	7,2	0,6	0,0
ME3	92,2	0,0	0,4	7,2	0,0	0,2
ME4	91,8	0,0	0,4	7,2	0,0	0,6
ME0-SS	0,0	92,4	0,4	7,2	0,0	0,0
ME1-SS	0,0	92,2	0,4	7,2	0,2	0,0
ME2-SS	0,0	91,8	0,4	7,2	0,6	0,0
ME3-SS	0,0	92,2	0,4	7,2	0,0	0,2
ME4-SS	0,0	91,8	0,4	7,2	0,0	0,6

Al fine di verificare la stabilità termica delle microemulsioni, l'aspetto di ME0 e dei campioni quaternari riportati in Tabella 2 è stato analizzato al variare della temperatura, in un intervallo compreso tra 4 e 70°C.

La corrispondenza dei campioni con microemulsioni O/W è stata accertata a 25°C attraverso Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Le misure sono state condotte ad angolo fisso (90°) con uno strumento Brookhaven 90Plus[®] equipaggiato con un laser He-Ne (4mW; lunghezza d'onda: 658 nm). I valori di intensità di scattering sono stati analizzati da un correlatore digitale e fittati con il metodo della trasformata inversa di Laplace. I valori del raggio idrodinamico (R_H) delle gocce di fase dispersa sono stati determinati da quelli del coefficiente di diffusione

D mediante l'equazione di Stokes-Einstein, assumendo una geometria sferica dei sistemi dispersi:²⁸

$$D = K_B T / 6\pi\eta R_H$$

in cui: K_B è la costante di Boltzmann, T è la temperatura, η è la viscosità del sistema.

I valori riportati nel testo sono i valori medi determinati da cinque differenti esperimenti. Dieci misure sono state effettuate per ciascun esperimento.

5.2.5 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e misure di Self-diffusion NMR

Misure ^1H e ^2H sono state effettuate con uno spettrometro NMR Bruker Avance III 400 MHz (9,4 T) con frequenze di Larmor rispettivamente di 400,13 MHz e 100,623 MHz per protone e deuterio. Le misure sono state condotte a 25°C.

Misure NMR di Self-diffusion sono state condotte al fine di definire la microstruttura delle microemulsioni attraverso la determinazione dei coefficienti di diffusione dei differenti componenti.³³ L'analisi è stata condotta utilizzando composizioni analoghe alle formulazioni ME2-SS e ME4-SS riportate in Tabella 2, contenenti 0,6% in peso di **NESS50ODBN** o di **NESS51ODBN**, ma sostituendo l'acqua con acqua deuterata (D_2O). I coefficienti di diffusione di D_2O , HS15, MCT e dei nuovi composti oppioidergici sono stati misurati a 25°C mediante Pulsed Field Gradient Stimulated Spin-Echo (PGSTE) NMR utilizzando un probe DIFF 30 Bruker equipaggiato con una specifica bobina z-gradient per ciascun nucleo (^1H e ^2H), con un'unità di amplificazione Great 1/60 z-gradient in grado di raggiungere gradienti di campo fino a 18,0 T/m. Allo scopo di minimizzare gli effetti di modulazione-j ed errori di fase dovuti a correnti aggiuntive indotte dai gradienti, le misure sono state condotte con due gradienti di *spoiler*.

I valori dei coefficienti di diffusione (D) sono stati determinati attraverso l'equazione:³³

$$A = A_0 \exp[-D(\gamma G \Delta)^2 (\Delta - \delta/3)]$$

in cui: A è l'ampiezza dell'eco in presenza del pulso del gradiente, A_0 è l'ampiezza dell'eco in assenza del pulso del gradiente, γ è il rapporto giromagnetico del protone, D è il coefficiente di diffusione, δ è la lunghezza del pulso del gradiente, G è la forza del campo del gradiente applicato, Δ è l'intervallo di tempo fra due pulsioni di gradiente. Gli esperimenti sono stati condotti variando la forza del gradiente G in sedici o trentadue step incrementati linearmente e

mantenendo i valori degli altri parametri in ristretti intervalli (δ e Δ compresi tra 1 e 5 ms e da 50 a 120 ms, rispettivamente). L'attenuazione dell'intensità del segnale è stata misurata almeno due volte in funzione di $(\gamma G \Delta)^2(\Delta - \delta/3)$. I coefficienti di diffusione sono stati calcolati fittando i valori di intensità con un'interpolazione non lineare. L'errore nelle misure è stato stimato essere inferiore a $\pm 4\%$.

5.2.6 Attività analgesica

I saggi in vivo sono stati condotti usando microemulsioni contenenti SS. In particolare i composti oppioidergici sono stati testati alle dosi di 10, 20 e 30 mg/kg, essendo ME2-SS e ME4-SS le formulazioni al più alto dosaggio rispettivamente di **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**. Il veicolo (microemulsioni contenenti le stesse concentrazioni di MCT e HS15 presenti in ME2-SS e ME4-SS) è stato adottato come formulazione di riferimento. Le microemulsioni contenenti i dosaggi più bassi dei composti oppioidergici sono state ottenute per diluizione di ME2-SS e ME4-SS con il veicolo fino alla desiderata concentrazione di principio attivo.

I saggi di tail flick e hot plate sono stati adottati per la valutazione dell'attività analgesica delle microemulsioni contenenti i nuovi composti oppioidergici. Questi saggi sono convenzionalmente impiegati nell'indagine preclinica di nuovi analgesici per il trattamento del dolore acuto.³⁴ I test sono stati condotti con topi maschi CD1, in accordo con le linee guida europee per la gestione e l'utilizzo di animali da laboratorio (CE N. 86/609). Cibo e acqua sono stati forniti agli animali ad libitum sino al momento della sperimentazione.

I test di tail flick sono stati condotti con un apparato Ugo Basile adottando un cut-off di 15 secondi al fine di evitare danni cutanei alla coda degli animali. Inoltre l'intensità della sorgente termica è stata sintonizzata al fine di produrre un periodo di latenza di 3-5 secondi negli animali trattati con il veicolo.

I saggi di hot plate sono stati condotti con una temperatura della piastra di 55°C, utilizzando un'apposita apparecchiatura Ugo Basile. Gli animali sono stati mantenuti sulla piastra fino alla comparsa dei primi segnali di dolore quali ad esempio: leccate della zampa, balzi, sollevamento della zampa. Per evitare danni cutanei alla zampa degli animali, dopo un periodo massimo pari a 40 secondi (cut-off) gli animali sono stati comunque rimossi dalla piastra.

Ciascun animale è stato testato prima della somministrazione delle microemulsioni al fine di determinarne la latenza di controllo. I dati sperimentali sono stati trasformati in %MPE attraverso la seguente equazione:³⁵

$$\%MPE = \frac{(\text{latenza del test} - \text{latenza di controllo})}{(\text{cut-off} - \text{latenza basale})} \times 100$$

in cui i valori delle latenze sono stati espressi in secondi ed i valori di cut-off sono stati fissati in 15 e 40 secondi, rispettivamente nei test di tail flick e di hot plate. Tutti i saggi sono stati condotti con dieci animali per gruppo sperimentale.

La valutazione dell'attività analgesica è stata condotta dopo 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 ore dalla somministrazione intraperitoneale (i.p.) delle microemulsioni. Quale controllo positivo è stata utilizzata la morfina, alla dose di 10 mg/kg, formulata utilizzando lo stesso veicolo delle microemulsioni da testare.

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata tramite ANOVA a due vie, seguita da Newman-Keuls post hoc test.

5.3 Risultati e Discussione

5.3.1 Attività intrinseca dei composti

In Figura 3 è mostrato lo studio dose/risposta dell'espressione di P-ERK 1/2 a seguito di un'esposizione di 10 minuti delle cellule SH-SY5Y all'agonista selettivo dei recettori degli oppioidi mu DAMGO (25nM) e a differenti concentrazioni del composto **NESS51ODBN** (i dati sono presentati come media della percentuale dell'espressione della proteina assegnando 100% a quella del veicolo). L'andamento riscontrato ha evidenziato per il composto in esame un'attività mu agonista, con un'attivazione dell'espressione di P-ERK 1/2 come nel caso del composto agonista di riferimento DAMGO.

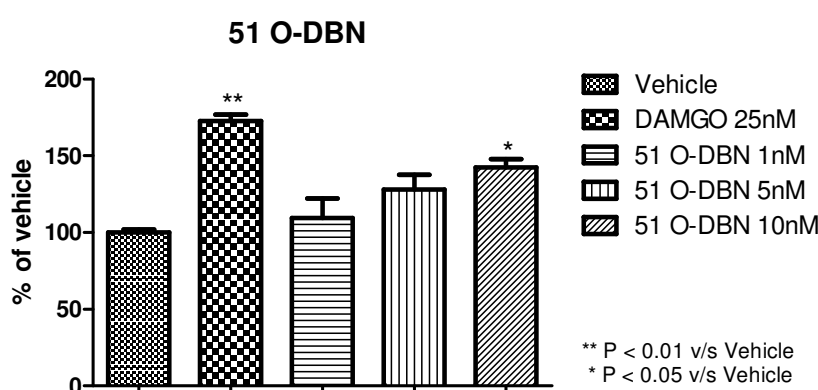


Figura 3: Espressione di P-ERK 1/2 da cellule SH-SY5Y trattate con DAMGO o con **NESS51ODBN** (51-oDBN). Tempo di esposizione delle cellule a DAMGO o a **NESS51ODBN**: 5 minuti

Allo scopo di verificare se l'effetto indotto dal composto **NESS51ODBN** fosse mediato effettivamente dai recettori degli oppioidi mu, la sperimentazione è stata condotta anche a seguito di un pretrattamento di 5 minuti delle cellule con l'antagonista selettivo mu CTAP (500nM). Anche in questo caso i risultati ottenuti sono stati riportati come media della percentuale dell'espressione della proteina assegnando 100% a quella del veicolo (Figura 4). Così come per DAMGO, l'effetto di **NESS51ODBN** sull'espressione di P-ERK 1/2 è stato inibito dall'azione dell'antagonista selettivo mu di riferimento.

I risultati riportati nelle Figure 3 e 4 dimostrano quindi attività mu agonista per il composto **NESS51ODBN**. Analoghi andamenti sono stati riscontrati anche per il composto **NESS50ODBN**.

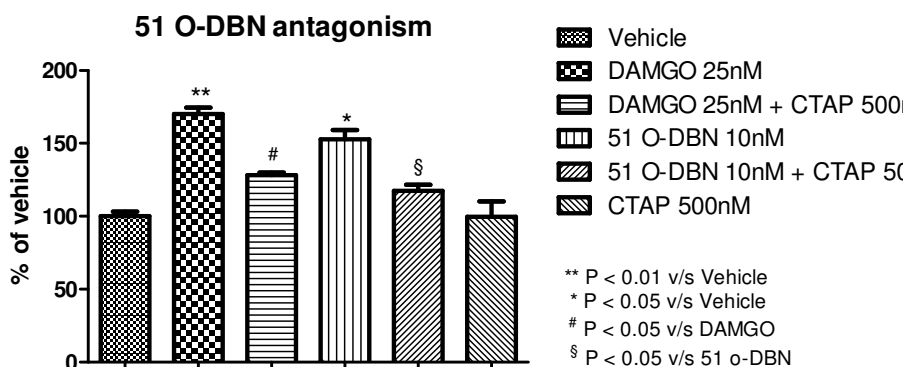


Figura 4. Espressione di P-ERK 1/2 da cellule SH-SY5Y pretrattate con CTAP (500nM) ed esposte successivamente a DAMGO o **NESS51ODBN**. Tempo di pretrattamento con CTAP: 5 minuti. Tempo di esposizione delle cellule a DAMGO o a **NESS51ODBN**: 5 minuti.

5.3.2 Diagramma di fase

Un'ampia regione liquida isotropa è stata evidenziata nella porzione di diagramma di fase studiata (Figura 5). Questa regione ha origine già nei campioni a più basso contenuto d'acqua e per rapporti MCT/HS15 peso/peso inferiori a 35:65 e si estende fino al vertice dell'acqua. Emulsioni o campioni bifasici sono stati invece riscontrati per composizioni caratterizzate da rapporti MCT/HS15 peso/peso superiori a 35:65. Nessun effetto significativo è stato rilevato sostituendo acqua con una soluzione salina.

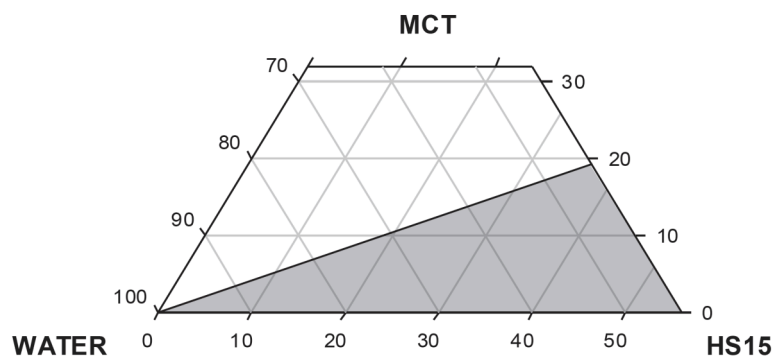


Figura 5: Diagramma di fase parziale HS15/MCT/W ottenuto a 25°C.

5.3.2 Caratterizzazione delle microemulsioni

Come precedentemente riportato, il prodotto commerciale HS15 ha mostrato in soluzione salina un cloud point (T_c) di 68,0°C.³⁶ Come atteso, un leggero incremento della temperatura di clouding è stato rilevato per la presenza di NaCl rispetto al caso di soluzioni del tensioattivo nonionico in acqua distillata ($T_c=67,0^\circ\text{C}$).²⁸ La presenza di MCT nelle micelle di HS15 come nel caso di ME0 ha determinato una diminuzione della stabilità termica della fase isotropa. ME0 è risultata infatti stabile fino ad una temperatura di 62°C. Tutte le altre microemulsioni hanno mostrato stabilità a bassa temperatura, almeno fino a 4°C. Una stabilità termica fino a 55-60°C (T_{max}) è stata rilevata per le microemulsioni quaternarie contenenti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**, con leggere differenze tra i vari campioni in relazione alla presenza di SS al posto di acqua (Tabella 3). Una contrazione dell'intervallo di stabilità termica è stato riscontrato al crescere della concentrazione dei due composti oppioidergici nella microemulsione. In ogni caso anche le microemulsioni contenenti le più alte concentrazioni di **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** sono risultate stabili fino a temperature superiori a quella corporea.

Tutti i campioni analizzati tramite PCS hanno evidenziato la presenza di gocce caratterizzate da stretta distribuzione dimensionale così come evidenziato dai bassi valori degli indici di polidispersità riportati in Tabella 3. I valori dei raggi idrodinamici (R_H) delle gocce calcolati dai dati sperimentali ottenuti dall'analisi PCS sono risultati inferiori a 10 nm, sia per la soluzione di HS15 al 7,2% in peso, sia per le microemulsioni ME0, ME1 e ME3 (Tabella 3). Un aumento del 13-14% del raggio idrodinamico delle gocce è stato indotto dalla presenza di MCT, così come risulta dal confronto fra il valore di R_H delle micelle di HS15 e quello determinato per ME0. Inoltre, un leggero incremento del valore di R_H rispetto al veicolo è stato

rilevato per la presenza dei composti oppioidergici nelle microemulsioni (si veda il confronto fra i valori di ME0 e quelli di ME1 e ME3). L'effetto di **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** sulle dimensioni delle gocce della fase dispersa nella fase acquosa è risultato ancora più evidente al crescere della concentrazione di entrambi i composti nella microemulsione. I valori di R_H determinati nel caso di ME2 e ME4 sono infatti risultati il doppio di quelli riscontrati per le gocce di ME0.

Tabella 3: Stabilità termica e dati PCS determinate a 25°C. la valutazione della stabilità termica è stata condotta tra 4,0 e 70,0°C; T_{max} rappresenta il limite superiore di temperatura alla quale la microemulsione risulta stabile.

Campioni	T_{max} (°C)	R_H (nm)	Indice Polidispersità
HS15 (7,2 % peso)	67,0	7,2	0,045
ME0	62,0	8,2	0,035
ME1	58,5	9,1	0,040
ME2	56,0	17,7	0,046
ME3	57,0	9,3	0,051
ME4	55,5	18,0	0,042
ME0-SS	63,0	8,4	0,048
ME1-SS	60,0	9,0	0,033
ME2-SS	57,5	18,7	0,060
ME3-SS	57,5	9,5	0,055
ME4-SS	55,0	18,5	0,042

In generale i valori di R_H determinati in questo lavoro sia relativamente alle micelle di HS15 che alle microemulsioni basate sullo stesso tensioattivo nonionico sono risultati in accordo con i dati precedentemente pubblicati riguardanti la caratterizzazione di micelle di HS15 tramite studi di NMR di self-diffusion,^{26-27,37} così come microemulsioni basate sullo stesso tensioattivo e contenenti Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC).³⁶ In particolare, valori di R_H di 7,0-7,5 nm sono stati precedentemente determinati nel caso di micelle di HS15 in soluzione salina a 23-25°C (HS15: 9,15% peso). Un valore di R_H pari a 8,0 nm è stato invece riportato per le gocce presenti in microemulsioni di HS15 contenenti Δ^9 -THC (25°C; HS15 e Δ^9 -THC al 2,43 e 0,27 % in peso).

5.3.3 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e misure di Self-diffusion

Gli spettri protonici di HS15 in D₂O e di MCT in CDCl₃ sono stati riportati in Figura 6, mentre gli spettri ¹HNMR dei nuovi composti oppioidergici sono stati riportati in Figura 7.

In accordo con alcuni dati precedentemente pubblicati,^{26-27,37} il campione commerciale di HS15 è risultato caratterizzato da tre segnali principali corrispondenti ai protoni dei gruppi ossietilenici sia del tensioattivo che del PEG libero (3,75 ppm), dei gruppi metilenici (1,32 ppm) e del gruppo metilico terminale della catena dell'acido 12-idrossistearico (0,92 ppm).

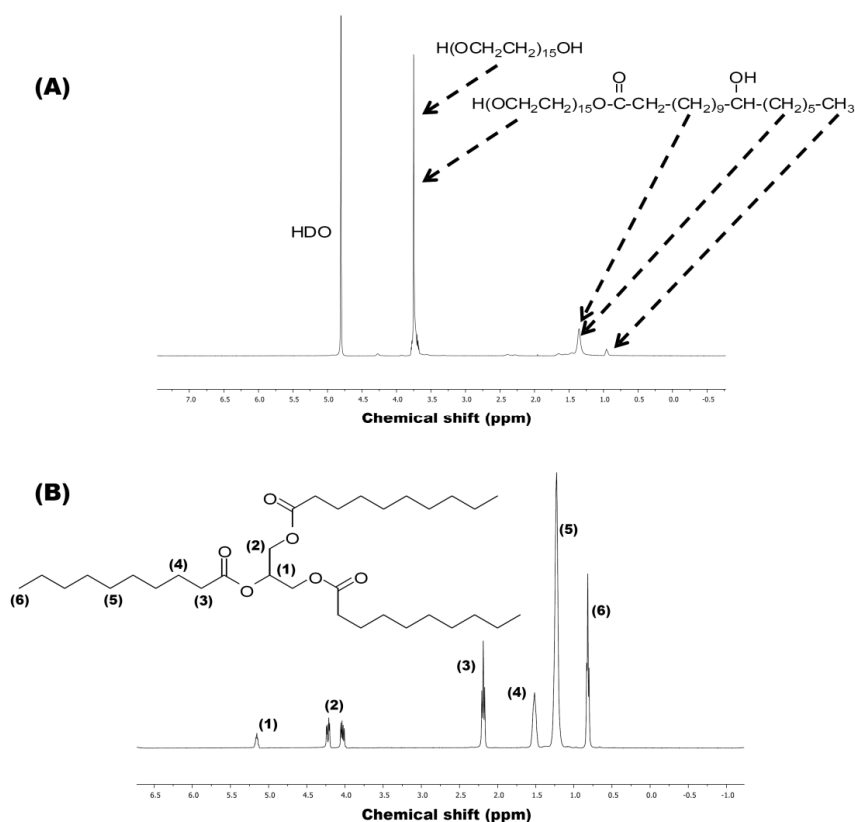


Figura 6: (A) Spettro ¹HNMR di HS15 in HDO. Le frecce tratteggiate mostrano la corrispondenza tra i segnali dei protoni ed i gruppi della struttura chimica della componente tensioattiva e di quella PEG presenti nel campione commerciale di Solutol[®]HS15 (vedere il testo). (B) Spettro ¹HNMR di Miglyol[®]812S (MCT) in CDCl₃. I numeri in parentesi rappresentano l'assegnazione dei segnali protonici con i corrispondenti gruppi presenti nella struttura del trigliceride.

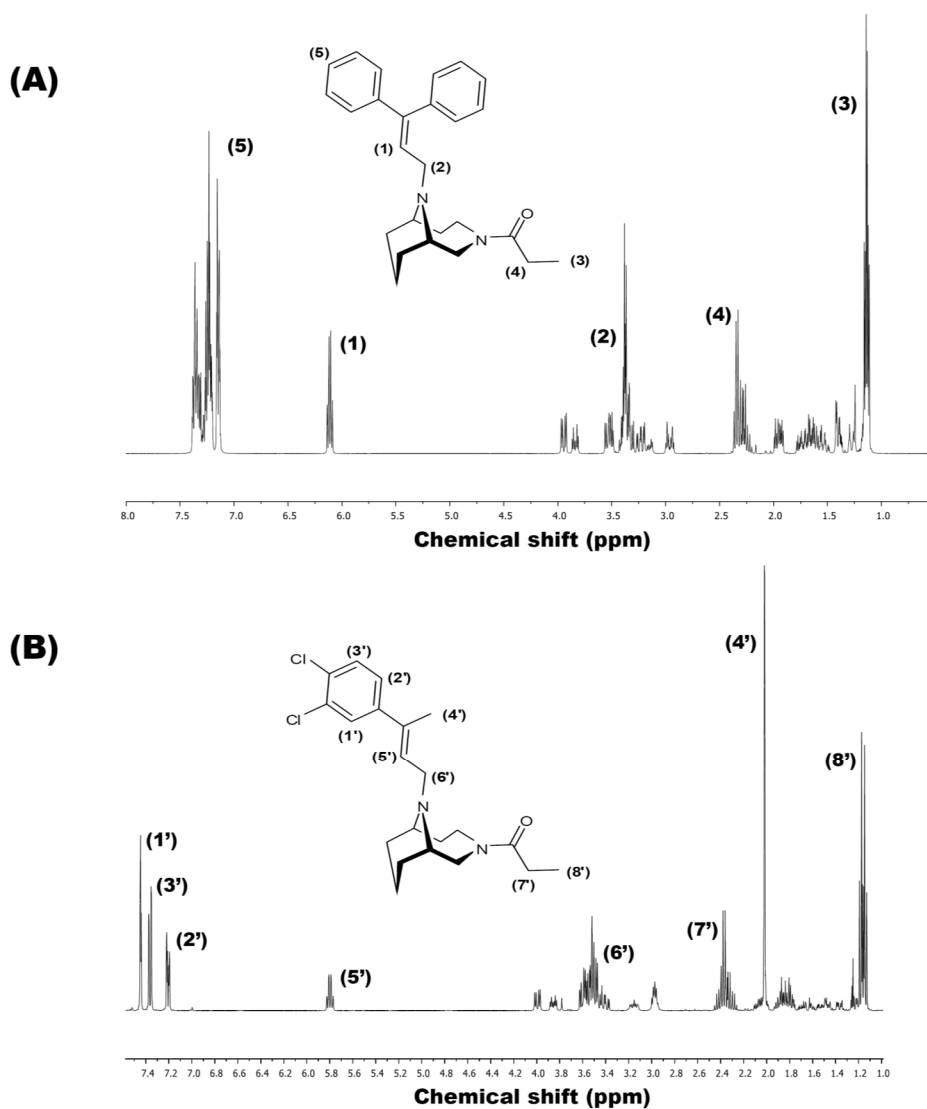


Figura 7: Spettri ¹H NMR di **NESS50ODBN** (A) e **NESS51ODBN** (B) in CDCl₃. I numeri in parentesi rappresentano l'assegnazione dei segnali protonici con i corrispondenti gruppi presenti nelle strutture dei composti oppioidergici.

Gli spettri ¹H NMR dei campioni di microemulsione contenenti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** sono stati riportati in Figura 8. Questi spettri sono stati analizzati nell'ambito degli esperimenti di self-diffusion, con particolare riferimento a quelli relativi ai campioni ME2-SS per **NESS50ODBN** e ME4-SS per **NESS51ODBN**. Il segnale a 5,27 ppm, corrispondente al protone del gruppo -CH- del residuo del glicerolo della struttura del trigliceride, è stato preso in considerazione quale segnale rappresentativo di MCT. I segnali compresi tra 7,00 e 7,50 ppm sono stati attribuiti ai protoni dei gruppi aromatici presenti nei

composti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**. Il segnale residuo di D₂O (HDO) fissato a 4,80 ppm è stato adottato quale chemical shift di riferimento.

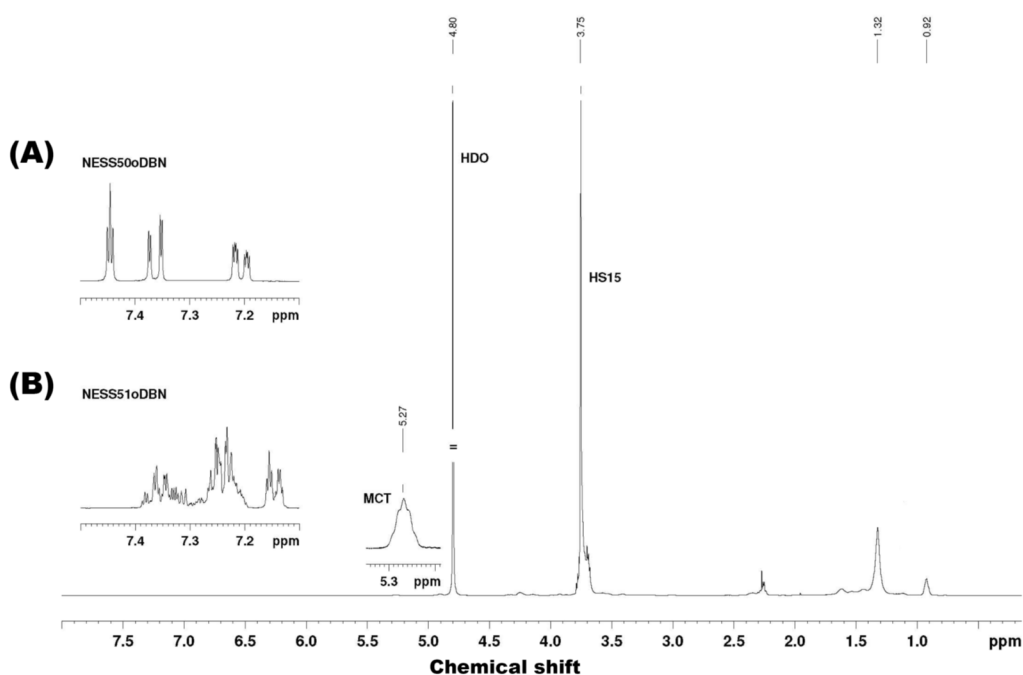


Figura 8: Spettri ¹HNMR dei sistemi ME2-SS (A) and ME4-SS (B). I segnali utilizzati come riferimento per ciascun componente nell'analisi PGSTE-NMR sono stati evidenziati negli spettri.

Le misure di Self-diffusion sono state condotte selezionando i segnali significativi per ciascuno dei componenti delle microemulsioni. Ad esclusione di HS15, i decadimenti delle intensità dei segnali dei protoni selezionati per ciascun componente sono stati analizzati con un fitting mono-esponenziale. Considerando la sovrapposizione di parte dei segnali dei protoni della catena alchilica degli acidi grassi di MCT con quelli dei corrispondenti protoni della catena 12-idrossistearica di HS15, lo studio PGSTE di HS15 è stato basato sulla valutazione del decadimento dell'intensità del segnale a 3,75 ppm. In accordo con precedenti studi di NMR self-diffusion relativi a HS15,^{26-27,37} con riferimento alla composizione del campione commerciale di tensioattivo nonionico, due componenti distinti sono stati identificati analizzando il segnale più intenso a 3,75 ppm. Il decadimento di questo segnale è stato infatti risolto attraverso l'applicazione di un fitting bi-esponenziale di Stejskal-Tanner,²⁶⁻²⁷ evidenziando in particolare nella miscela un componente rapido ed uno più lento, di fatto corrispondenti rispettivamente al PEG libero (HS15 fast) e al poli(etilen glicol)₁₅12-

idrossistearato (HS15 slow). La validità della strategia di analisi adottata ha trovato riscontro nelle misure condotte sulle soluzioni acquose del solo HS15. In questi campioni, infatti, è stata verificata la coincidenza fra i valori di $D_{\text{HS15-slow}}$ estrapolati dal fitting bi-esponenziale del decadimento del segnale a 3,75 ppm con i valori dei coefficienti di diffusione calcolati dall'analisi del decadimento del segnale a 0,92 ppm, corrispondente univocamente ai protoni del gruppo $-\text{CH}_3$ terminale della catena 12-idrossistearica.

I coefficienti di diffusione di tutti i componenti delle microemulsioni sono stati riportati in Tabella 4. I valori di $D_{\text{HS15-slow}}$ e $D_{\text{HS15-fast}}$ ottenuti dall'analisi della microemulsione lipidica ME0-SS sono risultati rispettivamente pari a $2,19 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ e $2,09 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Entrambi i valori sono risultati essere inferiori a quelli determinati nel caso di micelle di HS15 in SS alla stessa concentrazione di tensioattivo. Nei sistemi binari HS15/SS con HS15 al 7,2% in peso, infatti, alla stessa temperatura di 25°C , i valori calcolati di $D_{\text{HS15-slow}}$ e $D_{\text{HS15-fast}}$ sono risultati rispettivamente pari a $2,50 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ e $2,30 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Questi ultimi sono risultati in linea con analoghi dati riportati in precedenza nella letteratura di riferimento e relativi a soluzioni saline contenenti concentrazioni più elevate di HS15.³⁶⁻³⁷ Nel campione ME0-SS, il valore di D_{MCT} è risultato analogo a quello di HS15 slow, mentre per D_2O è stato determinato un valore del coefficiente di diffusione pari a $1,74 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Sulla base dei valori dei coefficienti di diffusione calcolati dai dati sperimentali, è stato quindi possibile definire per ME0-SS una microstruttura compatibile con una microemulsione O/W in cui le micelle di tensioattivo contengono MCT e in cui molecole libere di PEG sono solubilizzate nella fase acquosa.

Tabella 4: Coefficienti di diffusione dei componenti delle microemulsioni base ottenuti da misure di PGSTE-NMR a 25°C . I raggi delle gocce (R) sono stati determinati dai valori di $D_{\text{HS15-slow}}$ usando l'equazione di Stokes-Einstein, assumendo una geometria sferica delle gocce.

Campioni	Coefficienti di Diffusione $\times 10^{10} (\text{m}^2/\text{s}^{-1})$						R (nm)
	$D_{\text{HS15-slow}}$	$D_{\text{HS15-fast}}$	D_{MCT}	$D_{\text{H}_2\text{O}}$	$D_{50\text{ODBN}}$	$D_{51\text{ODBN}}$	
ME0-SS	0,2187	2,087	0,2185	17,35	-----	-----	9,0
ME2-SS	0,1100	1,202	0,1125	18,41	0,1189	-----	18,0
ME4-SS	0,1108	1,279	0,1137	18,32	-----	0,1169	18,1

Nelle microemulsioni quaternarie ME2-SS e ME4-SS, all'interno dell'errore sperimentale, i coefficienti di diffusione di MCT e quelli di **NESS50ODBN** ($D_{50\text{ODBN}}$) e **NESS51ODBN** ($D_{51\text{ODBN}}$) sono risultati coincidenti a quello di $D_{\text{HS15-slow}}$. La coincidenza dei suddetti valori dei coefficienti di diffusione è risultata compatibile con una microstruttura caratterizzata da gocce

di olio contenenti i principi attivi e circondate dalle catene idrofobiche del tensioattivo. La presenza dei composti oppioidergici ha indotto un effetto significativo sia sul valore di $D_{HS15-slow}$ che di D_{MCT} . Nelle microemulsioni quaternarie, infatti, sono stati determinati valori di $D_{HS15-slow}$ e di D_{MCT} in un intervallo di $1,10-1,13 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, pari a circa la metà di quelli calcolati in ME0-SS. Nessun effetto significativo è stato invece indotto dai due composti oppioidergici sul valore di D_{HDO} .

Come conseguenza degli effetti di **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** sui valori di $D_{HS15-slow}$ e di D_{MCT} , i valori di R_H determinati nei campioni ME2-SS e ME4-SS sono risultati circa il doppio dei corrispondenti valori riscontrati in ME0-SS (Tabella 4). Detti valori di R_H sono stati calcolati attraverso l'applicazione dell'equazione di Stokes-Einstein, assumendo una morfologia sferica delle gocce. E' tuttavia da rilevare come anche nel caso delle microemulsioni contenenti la più alta concentrazione di principi attivi (0,6 % in peso), si siano determinati valori di R_H inferiori a 20 nm ($R_H = 18,0-18,1$ nm). Un leggero incremento del valore di R_H rispetto a quello delle micelle di HS15 in SS è stato invece riscontrato in ME0-SS. La presenza di MCT ha determinato infatti un aumento del valore del raggio idrodinamico di un fattore pari a 1,2. Tutti i valori di R_H determinati attraverso l'indagine PGSTE sono risultati in pieno accordo con gli analoghi valori ottenuti mediante analisi PCS.

5.3.4 Attività analgesica

La somministrazione i.p. delle microemulsioni contenenti i nuovi composti oppioidergici **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** ha determinato una significativa attività analgesica sia nei saggi del tail flick che dell'hot plate a partire dalla dose dei principi attivi pari a 20 mg/Kg (Figure 7 e 8). Ad esclusione di qualche minimo effetto riscontrato con **NESS51ODBN** nel tail flick, nessun effetto analgesico è stato registrato alla dose di 10 mg/Kg. I profili dell'attività antinocicettiva delle microemulsioni testate sono risultati analoghi a quelli rilevati con la morfina. Tra le nuove formulazioni, la microemulsione contenente la dose più elevata di **NESS50ODBN**, corrispondente a ME2-SS, ha evidenziato attività analgesica comparabile a quella dell'agonista di riferimento mu alla dose di 10 mg/Kg, specialmente nel test del tail flick (Figura 7b).

Sebbene le microemulsioni contenenti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** abbiano mostrato attività analgesica inferiore o al massimo comparabile a quella di analoghi sistemi contenenti morfina, è da rilevare come l'attività condotta ed i risultati raccolti in questa ricerca possano contribuire allo sviluppo della nuova classe di composti oppioidergici di cui i due *leads* studiati

fanno parte. Studi preliminari hanno infatti mostrato le prime evidenze di ridotti effetti collaterali di questi composti rispetto alla morfina.

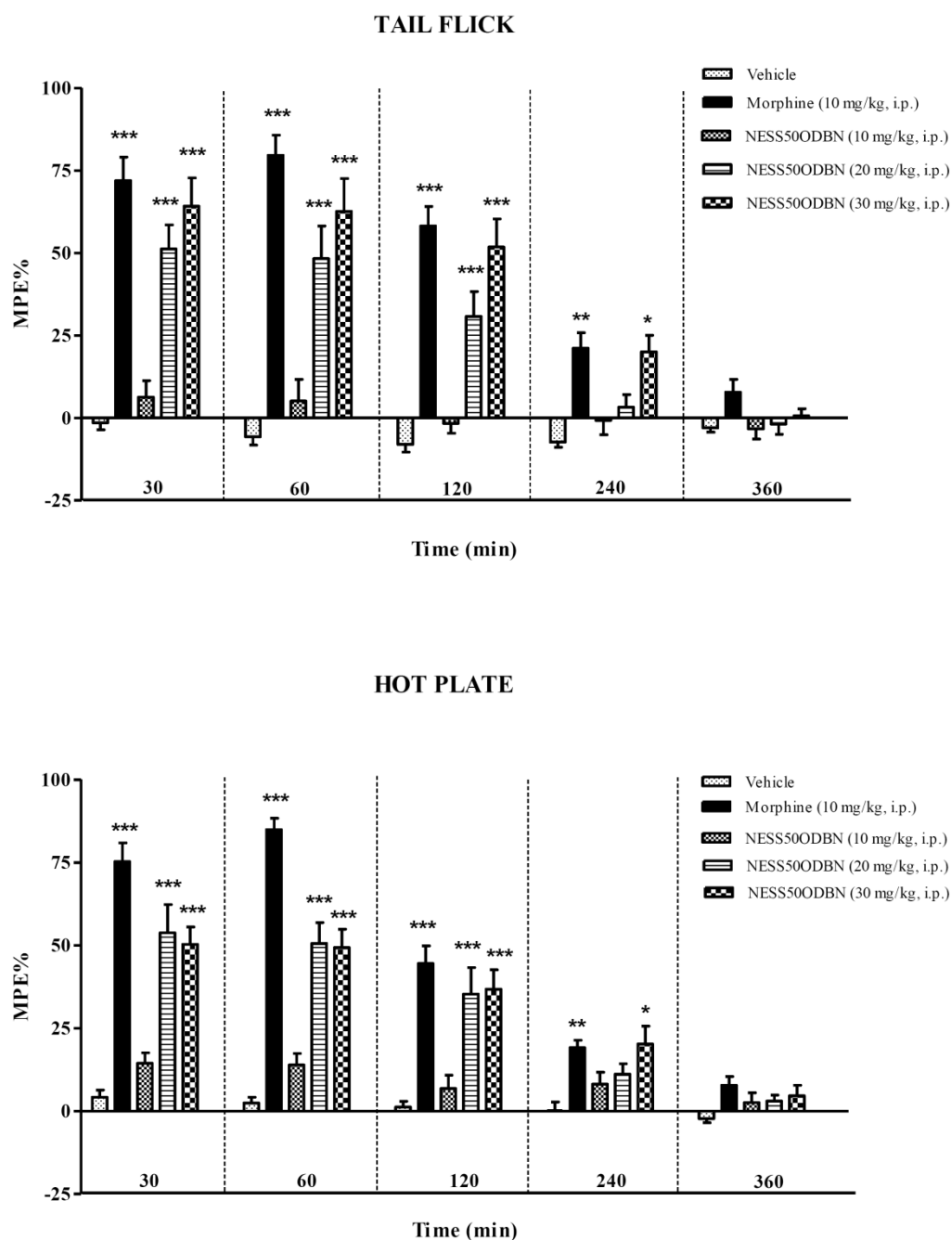


Figura 7: Attività analgesica indotta dalle microemulsioni contenenti **NESS50ODBN** nei test del tail flick e dell'hot plate. I topi sono stati testati dopo 30, 60, 120, 240, e 360 minuti dalla somministrazione i.p. delle formulazioni. Il veicolo rappresenta la stessa microemulsione lipidica base impiegata per la solubilizzazione dei composti oppioidergici (**NESS50ODBN** e morfina). Ciascuna colonna rappresenta la media \pm S.E.M. di %MPE ottenuti da dieci animali. L'analisi statistica è stata condotta con ANOVA a due vie, seguita da Newman-Keuls post hoc test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. topi trattati con il veicolo).

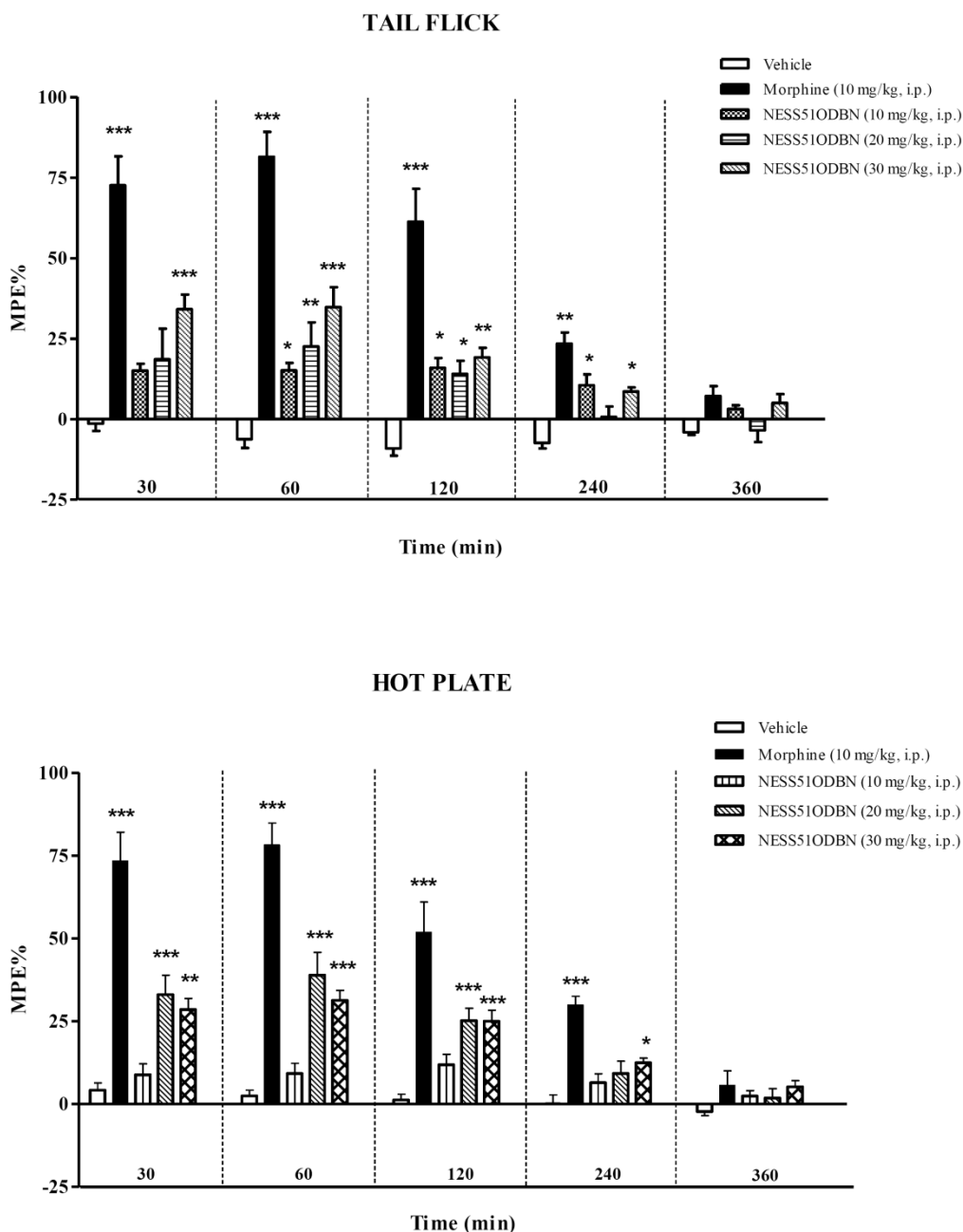


Figura 8: Attività analgesica indotta dalle microemulsioni contenenti **NESS51ODBN** nei test del tail flick e dell'hot plate. I topi sono stati testati dopo 30, 60, 120, 240, e 360 minuti dalla somministrazione i.p. delle formulazioni. Il veicolo rappresenta la stessa microemulsione lipidica base impiegata per la solubilizzazione dei composti oppioidergici (**NESS51ODBN** e morfina). Ciascuna colonna rappresenta la media \pm S.E.M. di %MPE ottenuti da dieci animali. L'analisi statistica è stata condotta con ANOVA a due vie, seguita da Newman-Keuls post hoc test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. topi trattati con il veicolo).

5.4 Conclusioni

L'attività condotta ha permesso di completare il profilo farmacologico di base dei composti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** evidenziando per entrambi i composti attività agonista per i recettori degli oppioidi μ .

L'uso del campione commerciale di HS15 ha consentito l'ottenimento di microemulsioni O/W contenenti MCT, caratterizzate da un'ampia stabilità termica e da gocce della fase dispersa con stretta distribuzione dimensionale e R_H inferiori a 10 nm. Le suddette microemulsioni hanno consentito la solubilizzazione di opportuni quantitativi di nuovi composti oppioidergici diazabicicloalcanici a struttura base omopiperazinica (**NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**), compatibili con la somministrazione di questi nell'animale da laboratorio per i test di analgesia. La solubilizzazione degli agenti oppioidergici nella microemulsione base ha determinato un significativo incremento delle dimensioni delle gocce della fase dispersa, solo con minime variazioni dell'intervallo di stabilità termica. Nelle condizioni studiate, le microemulsioni contenenti **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN** sono in ogni caso risultate essere costituite da gocce caratterizzate da valori di R_H inferiori a 20 nm.

L'analisi PGSTE-NMR ha permesso di definire la microstruttura delle microemulsioni quaternarie comprendenti i composti oppioidergici. I dati sperimentali raccolti sono risultati compatibili con sistemi caratterizzati da gocce di MCT, in cui risultano solubilizzati **NESS50ODBN** e **NESS51ODBN**, circondate dalle molecole di tensioattivo. In accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura, l'analisi condotta ha permesso di discriminare la componente tensioattiva del campione commerciale di HS15 da quella del PEG libero presente.

L'impiego di modelli animali di dolore acuto (tail flick e hot plate) ha consentito di validare le strategie formulative adottate, evidenziando attività analgesica delle microemulsioni sviluppate comparabile con quella della morfina, particolarmente nel caso di sistemi contenenti **NESS50ODBN**.

5.5 Referenze

1. Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H. Opioid Pharmacology. *Pain Physician*. **2008**, *11(2 Suppl)*, S133-S153.
2. Zebraski S.E., Kochenash S.M., Raffa R.B. Lung opioid receptors: pharmacology and possible target for nebulized morphine in dyspnea. *Life Sci*. **2000**, *66*, 2221-2231.

3. Dondio G., Ronzoni S., Petrillo P. Non-peptide δ opioid agonists and antagonists. *Exp.Opin.Ther.Patents*. **1997**, 7, 1075-1098.
4. Dondio G., Ronzoni S., Petrillo P. 1999. Non-peptide δ opioid agonists and antagonists (Part II). *Exp.Opin.Ther.Patents*. **1999**, 9, 353-374.
5. Hille C.J., Fox S.H., Maneuf Y.P., Crossman A.R., Brotchie J.M. 2001. Antiparkinsonian action of a δ opioid agonist in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. **2001**, 172, 189-198.
6. Mathieu-Kia A.M., Fan L.Q., Kreek M.J., Simon E.J., Hiller J.M. μ -, δ - and κ -opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res*. **2001**, 893, 121-134.
7. Sakami S., Kawai K., Maeda M., Aoki T., Ueno S. 2004. Indole derivatives and use thereof in medicines. US Patent 6,770,654.
8. Dolle R.E., Le Bourdonnec B. Substituted piperidine compounds and methods of their use. US Patent 7,087,749, **2006**.
9. Saitoh A., Kimura Y., Suzuki T., Kawai K., Nagase H., Kamei J. Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective δ -opioid agonist, in behavioral models in rodents. *J.Pharmacol.Sci*. **2004**, 95, 374-380.
10. Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L. Opioid receptors. *Annu.Rev.Biochem*. **2004**, 73, 953-990.
11. Barlocco D., Cignarella G., Vianello P., Villa S., Pinna G.A., Fadda P., Fratta W. Synthesis and μ -opioid receptor affinity of a new series of nitro substituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane derivatives. *Il Farmaco*. **1998**, 53, 557-562.
12. Pinna G.A., Murineddu G., Curzu M.M., Villa S., Vianello P., Borea P.A., Gessi S., Toma L., Colombo D., Cignarella G. Synthesis, modelling, and μ -opioid receptor affinity of *N*-3(9)-arylpropenyl-*N*-9(3)-propionyl-3,9-diazabicyclo[3.3.1] nonanes. *Il Farmaco*. **2000**, 55, 553-562.
13. Loriga G., Manca I., Murineddu G., Chelucci G., Villa S., Gessi S., Toma L., Cignarella G., Pinna G.A. Synthesis of 3,6-diazabicyclo[3.1.1]heptanes as novel ligands for the opioid receptors. *Bioorg.Med.Chem*. **2006**, 14, 676-691.
14. Lazzari P., Loriga G., Ruiu S., Manca I., Pani L., Pinna G.A. Pharmaceutical compounds. US Patent Application US2010/0028257, **2010**.

15. Lazzari P., Pira L., Fadda P., Manca I., Cabasino S., Pisu C., Marchese G., Casu G.L., Pani L. Non-ionic microemulsions containing new diazabicyclo opioid compounds with improved antinociceptive activity. Acts of 2nd Conference Innovation in Drug Delivery. Aix-en-Provence, France, 3-6 October **2010**, P.51.
16. Mitchell D.J., Ninham B.W. 1981. Micelles, vesicles and microemulsions. *J.Chem.Soc.Far.Trans.2* **1981**, 77, 601-629.
17. Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2000**, 45, 89-121.
18. Jadhav K.R., Shaikh I.M., Ambade K.W., Kadam V.J. Applications of Microemulsion-Based Drug Delivery System. *Curr.Drug Deliv.* **2006**, 3, 267-273.
19. Kogan A., Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv.Colloid Interface Sci.* **2006**, 123, 369-385.
20. Spornath A., Aserin A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 128, 47-64.
21. Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog.Retin.Eye Res.* **2002**, 21, 15–34.
22. Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2002**, 54 Suppl.1, S77-S98.
23. Fan Y., Li X., Zhou Y., Fan C., Wang X., Huang Y., Liu Y. Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by water-in-oil microemulsions. *Int.J.Pharm.* **2011**, 416, 323-330.
24. Gibaud S., Attivi D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. *Expert Opin.Drug Deliv.* **2012**, 9, 937-951.
25. Coon J.S., Knudson W., Clodfelter K., Lu B., Weinstein R.S. Solutol HS15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res.* **1991**, 51, 897-902.
26. Momot K.I., Kuchel P.W. Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a tool for studying drug delivery systems. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2003**, 19, 51-64.
27. Momot K.I., Kuchel P.W., Chapman B.E., Deo P., Whittaker D. NMR study of the association of Propofol with nonionic surfactants. *Langmuir.* **2003**, 19, 2088-2095.
28. Von Corswant C., Thoren P., Engstrom S. Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. *J.Pharm.Sci.* **1998**, 87, 200-208.

29. Barlocco D., Cignarella G., Vianello P., Villa S., Pinna G.A., Fadda P., Fratta W. Synthesis and μ -opioid receptor affinity of a new series of nitro substituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane derivatives. *Il Farmaco*. **1998**, *53*, 557-562.
30. Pinna G.A., Loriga G., Cignarella G. 3,6-Diazabicyclo[3.1.1]heptane derivatives with analgesic activity. WO2005/108402. **2005**.
31. Murineddu G., Asproni B., Pinna G., Curzu M.M., Dore A., Pau A., Deligia F., Pinna G.A. Synthesis of biologically active bridged diazabicycloheptanes. *Curr.Med.Chem.* **2012**, *19*, 5342-5363.
32. Bilecki W., Zapart G., Ligeza A., Wawrzczak-Bargiela A., Urbanski M.J., Przewlocki R. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *CMLS*. **2005**, *62*, 2369-2375.
33. Caboi F., Murgia S., Monduzzi M., Lazzari P. NMR investigation on Melaleuca alternifolia essential oil dispersed in the monoolein aqueous system: Phase behavior and dynamics. *Langmuir*. **2002**, *18*, 7916-7922.
34. Ruiu S., Pinna G.A., Marchese G., Mussinu J.M., Saba P., Tambaro S., Casti P., Vargiu R., Pani L. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB₁ cannabinoid receptor. *J. Pharmacol.Exp.Ther.* **2003**, *306*, 363-370.
35. Harris L.S., Pierson A.K. Some narcotic antagonists in the benzomorphan series. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **1964**, *143*, 141-148.
36. Lazzari P., Fadda P., Marchese G., Casu G.L., Pani L. Antinociceptive activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol non-ionic microemulsions. *Int.J.Pharm.* **2010**, *393*, 238-243.
37. Murgia S., Fadda P., Colafemmina G., Angelico R., Corrado L., Lazzari P., Monduzzi M., Palazzo G. Characterization of the Solutol[®] HS15/Water phase diagram and the impact of the Δ^9 -Tetrahydrocannabinol solubilization. *J.Colloid Interface Sci.* **2013**, *390*, 129-136.

CAPITOLO 6

NUOVI DERIVATI DELLE TUBULISINE

6.1 Introduzione

La patologia oncologica, costituita di fatto da una famiglia di malattie caratterizzate da una crescita cellulare sregolata e dalla possibilità di invadere e colonizzare distretti corporei diversi dal sito di origine, rappresenta uno dei problemi più rilevanti della salute pubblica con più di 3 milioni di nuovi casi per anno e circa 1,7 milioni di decessi/anno nella sola Europa (dati 2006). Nonostante il numero di tumori scoperti per anno continui ad aumentare, anche a causa dell'invecchiamento della popolazione, è in ogni caso da rilevare una significativa riduzione della mortalità in relazione ai nuovi metodi di indagine, alle campagne di prevenzione, oltre che all'individuazione di nuove strategie farmacologiche.

Le proprietà caratteristiche della maggior parte dei tumori sono rappresentate dall'acquisizione della capacità di produrre segnali autonomi di crescita, dalla capacità di sottrarsi ai segnali che inibiscono la crescita, dall'incapacità di andare incontro a morte apoptotica, dal potenziale proliferativo illimitato, dalla capacità di indurre la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi), da invasione e metastatizzazione. I fattori di rischio correlati a questa patologia sono legati sia allo stile di vita che alla fisiologia (sottoprodotti del metabolismo ed errori che si verificano durante la replicazione del DNA) e, in ultima analisi, alla costituzione genetica che contribuiscono alla cancerogenesi.

L'obiettivo delle terapie antitumorali farmacologiche o radioterapiche è quello di impedire la proliferazione (effetto citostatico) e di uccidere le cellule cancerose (effetto citotossico), con il fine ultimo di ottenere un risultato efficace e con il minimo di effetti collaterali.

Le ricerche di base e cliniche svolte negli ultimi decenni hanno fornito numerosi importanti contributi allo sviluppo della chemioterapia antitumorale, tuttavia per molti tumori la terapia medica è tuttora di limitata efficacia. Il fallimento dei trattamenti chemioterapici è principalmente dovuto a:

- a. aspecificità degli agenti chemioterapici, con conseguente tossicità generalizzata;
- b. manifestazione di fenomeni di resistenza, innata o acquisita agli agenti chemioterapici, che determinano un fenotipo resistente attraverso la messa in opera di meccanismi difensivi,

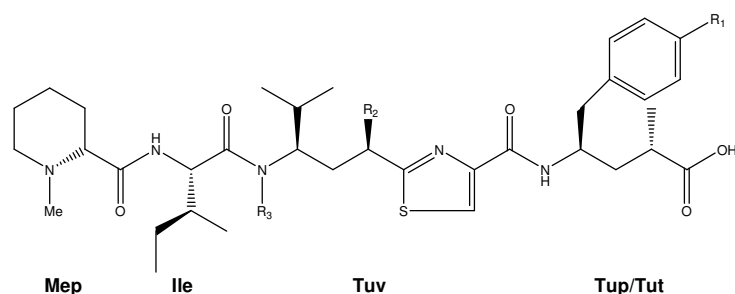
- quali aumentato efflusso o ridotto ingresso del farmaco, alterato metabolismo dello stesso o incremento nei livelli di produzione o modificazione del bersaglio terapeutico;
- c. variabilità intra-paziente della risposta al trattamento e delle dosi massime tollerate in relazione alla componente genetica, età, sesso, funzionalità organiche (renale, epatica, endocrina), abitudini alimentari, esposizione ad altri farmaci, all'alcool ed al fumo di sigaretta, come pure le abitudini alimentari;
 - d. dosaggi limitati in relazione alla ristretta finestra terapeutica.

La prevenzione o la riduzione degli effetti collaterali e la possibilità di aggirare specifici meccanismi di resistenza innata o acquisita rappresentano due aspetti chiave per l'identificazione e lo sviluppo di nuovi principi attivi alla base di strategie terapeutiche innovative e di maggiore efficacia.

Tra i vari trattamenti chemioterapici vi sono quelli basati sull'interferenza con la meccanica della divisione cellulare. In particolare sono state sviluppate due strategie differenti ed opposte mirate a distruggere il fuso mitotico: la prima, come nel caso degli alcaloidi della vinca, è fondata sull'inibizione dell'assemblaggio dei microtubuli; la seconda si riferisce al meccanismo d'azione dei taxani, composti che si legano alla subunità beta della tubulina nei polimeri e stabilizzano i microtubuli contro la depolimerizzazione. Le tubuline sono infatti elementi del citoscheletro che svolgono funzioni fondamentali nelle cellule eucariotiche, come ad esempio il trasporto di vescicole e mitocondri, la trasduzione di segnali, la divisione cellulare e la mitosi. Recentemente è stata individuata una nuova classe di composti naturali ad elevata citotossicità in grado di agire con meccanismo analogo a quello degli alcaloidi della vinca, le tubulisine. Questi composti, caratterizzati da una struttura tetrapeptidica, sono stati ottenuti attraverso un processo biotecnologico basato sull'uso di due differenti specie di mixobatteri: *Archangium gephyra* e *Angiococcus disciformis*. La struttura, la stereochimica e la via biosintetica delle tubulisine, così come la loro potente attività citotossica, sono state determinate solo di recente.¹⁻⁴

La struttura tetrapeptidica delle tubulisine è caratterizzata in particolare da un'unità di acido N-metil-pipecolico (**Mep**) in posizione N-terminale legata ad un'isoleucina (**Ile**, unico amminoacido proteinogenico). Alla posizione successiva della catena amminoacidica delle tubulisine è presente un inusuale amminoacido, denominato tubuvalina (**Tuv**), contenente un anello tiazolico e due centri stereogenici. A questo sono legati due differenti possibili γ -amminoacidi in posizione C-terminale: la tubutirosina (**Tut**, caratterizzante le tubulisine A, B, C, G, e I) o la tubufenilalanina (**Tup**, presente nelle tubulisine D, E, F, e H). Inoltre, il residuo

N-terminale di **Tuv** è funzionalizzato con un sostituito N,O-acetalico con differenti funzioni esteree, altamente insolito per questo tipo di strutture (Figura 1).⁵



Tubulisina	R ₁	R ₂	R ₃
A	OH	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-isobutile
B	OH	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-n-propile
C	OH	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-etile
D	H	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-isobutile
E	H	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-n-propile
F	H	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-etile
G	OH	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)CH=C(CH ₃) ₂
H	H	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-metile
I	OH	OC(O)CH ₃	CH ₂ OC(O)-metile
U	H	OC(O)CH ₃	H
V	H	H	H
Y	OH	OC(O)CH ₃	H
Z	OH	H	H

Figura 1. Struttura chimica delle tubulisine naturali.

Le basse rese del processo biotecnologico e le ridotte concentrazioni derivanti dall'estrazione delle tubulisine naturali dai brodi di coltura hanno limitato lo sviluppo preclinico di questa classe di composti particolarmente promettenti per la chemioterapia. Tuttavia nel corso degli ultimi anni questa area di ricerca ha suscitato grande interesse, soprattutto per quanto concerne l'individuazione e lo sviluppo di nuove strategie di *medicinal chemistry*, basate su processi ad alte rese e facilmente scalabili, in grado di assicurare l'ottenimento di composti con strutture coincidenti con quelle delle tubulisine naturali o di analoghi con citotossicità equivalente a quella dei composti naturali di riferimento. Le difficoltà maggiormente evidenziate nell'ambito degli approcci sintetici investigati hanno riguardato in particolare l'inserimento della catena N,O-aminoacetalica, estremamente delicata sia in condizioni acide che basiche, oltre che la sensibilità e i vincoli configurazionali del frammento **TUV** contenente l'anello tiazolico.⁶

Le procedure sintetiche sviluppate hanno riguardato in particolare l'ottenimento delle tubulisine U e V,^{5,7-11} caratterizzate da strutture chimiche esemplificate rispetto a quelle degli omologhi a

maggiore citotossicità, quale ad esempio la tubulisina A. Sono stati inoltre riportati processi di sintesi relativi all'ottenimento delle tubulisine B e D che hanno in ogni caso evidenziato limiti significativi in termini di resa e di scalabilità.¹²⁻¹³

Le strategie sintetiche adottate dai diversi gruppi di ricerca hanno previsto l'assemblaggio della struttura tetrapeptidica attraverso reazioni di *coupling* dei diversi frammenti amminoacidici (Figura 2). I limiti dei processi preparativi riportati nella letteratura di riferimento non hanno riguardato le reazioni di *coupling*, ma essenzialmente la costruzione del frammento **Tuv**, con particolare riferimento all'introduzione del sostituente sull'azoto N- terminale e alla definizione della stereochimica richiesta.

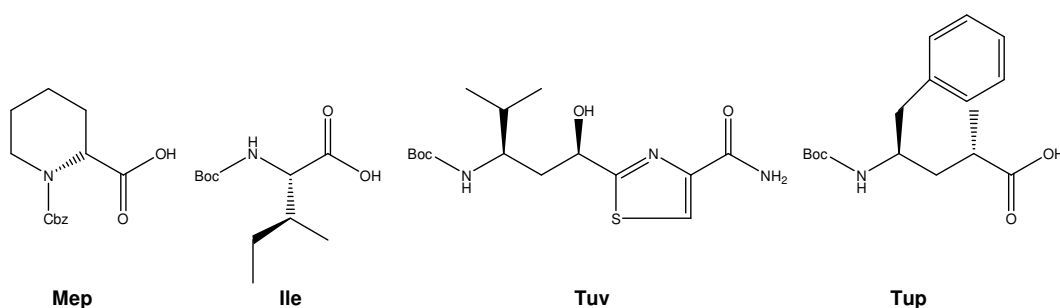


Figura 2. Frammenti amminoacidici impiegati per la sintesi attraverso reazione di *coupling* della tubulisina V.

In relazione alle potenzialità di questa classe di composti quali nuovi chemioterapici, soprattutto nel trattamento di tumori con resistenza innata o acquisita verso i chemioterapici ad oggi utilizzati nella pratica clinica, e sulla base dei risultati finora raggiunti relativamente allo sviluppo di adeguati processi sintetici per l'ottenimento di tubulisine o di analoghi ugualmente citotossici e attivi, risulta evidente l'interesse scientifico e applicativo nell'individuazione di nuove strategie di *medicinal chemistry* in grado di superare i limiti sopra esplicitati.

A partire dalle differenti procedure sintetiche riportate nella letteratura di riferimento, nel corso della presente ricerca si è voluto intervenire al fine di individuare ed ottimizzare una procedura di sintesi totale che potesse portare all'ottenimento di quantitativi significativi (centinaia di milligrammi) di derivati delle tubulisine naturali. La ricerca è stata condotta in collaborazione con la società KemoTech Srl, localizzata presso le strutture del Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna di Pula (CA). Attraverso il procedimento sviluppato, si è voluto inoltre avviare uno studio struttura/attività mirato all'individuazione di potenziali *leads* da sviluppare a valle della presente ricerca quali nuovi chemioterapici. Sulla base di precedenti studi, l'approccio

SAR è stato condotto mantenendo fissa la stereochimica dei differenti frammenti, oltre che il gruppo isopropilico sulla porzione della **Tuv**, ed ha riguardato in particolare la valutazione dell'effetto del sostituito R^1 sulla citotossicità dei composti verso differenti linee cellulari tumorali (Classe **1**; Figura 3). Precedenti studi SAR hanno infatti evidenziato l'influenza della stereochimica dei vari stereocentri distribuiti lungo la catena peptidica delle tubulisine, così come del gruppo isopropilico presente nel frammento della tubuvalina e del gruppo benzilico, eventualmente sostituito con gruppi opportuni, del frammento della **Tup/Tut**, nel determinare un'elevata citotossicità dei derivati delle tubulisine.¹⁴⁻¹⁶

Una valutazione ulteriore della presente ricerca ha riguardato lo studio dell'eventuale effetto sulla citotossicità dei composti correlato all'introduzione di un atomo di fluoro sul benzile della porzione della **Tup**.

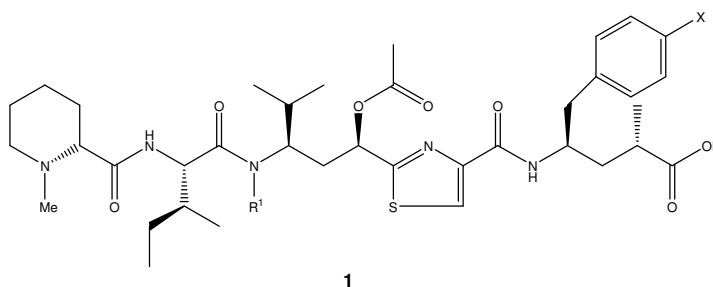


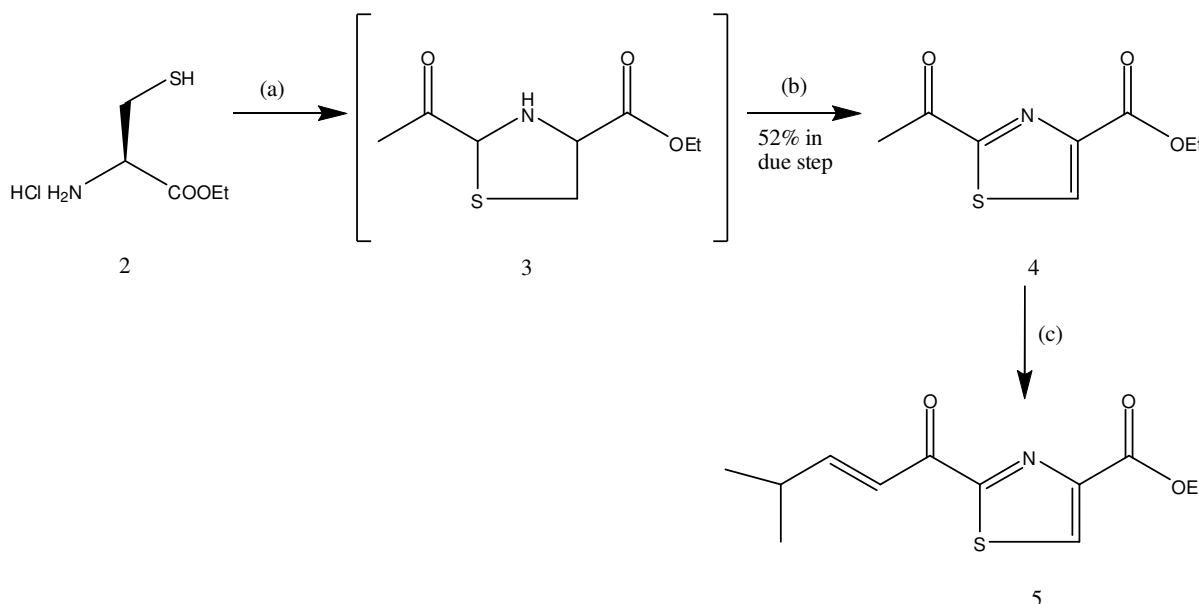
Figura 3. Struttura chimica generale dei derivati delle tubulisine sintetizzati nel corso della ricerca (X: H o F; R^1 : fenile, benzile, metil-cicloalchili, metil-eteroarili, metil-eterocicloalchili).

I composti sintetizzati sono stati sottoposti ad opportuni saggi in vitro basati sull'uso di diverse linee cellulari. Tra queste sono state utilizzate anche linee cellulari di tumori caratterizzati da fenotipi di resistenza acquisita nei confronti di chemioterapici convenzionali.

In relazione ai profili individuati attraverso i saggi in vitro, tra i nuovi composti studiati è stato selezionato un *lead compound* con il quale sono stati condotti sia test mirati a valutarne il meccanismo d'azione che saggi in vivo al fine di verificarne le potenzialità terapeutiche.

6.2 Sintesi dei composti

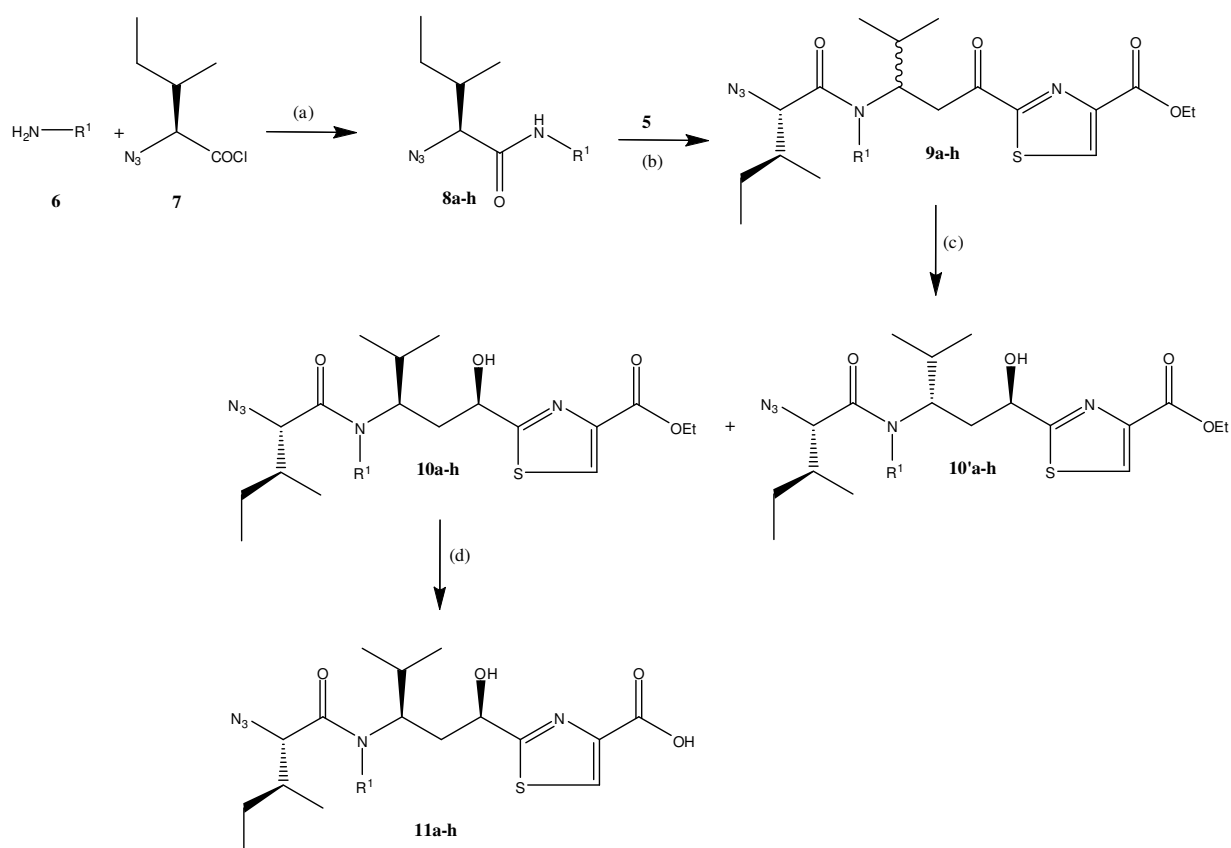
La sintesi del frammento **Tuv** è stata avviata a partire dalla generazione dell'anello tiazolico. L'estere etilico della L-Cisteina cloridrata **2** è stato condensato con metil gliossale in presenza di carbonato di sodio, ottenendo la 2-acetil-4-etossicarboniltiazolidina **3** (instabile a temperature superiori ai 30°C in etanolo). Questa è stata solubilizzata in CH₃CN e ossidata con MnO₂ a 65°C con l'ottenimento del 2-acetil tiazolo **4**, con una resa del 52% sui due passaggi sintetici. Il tiazolo **4**, è stato quindi sottoposto a condensazione aldolica con isobutirraldeide in THF anidro, utilizzando come catalizzatore l'acido di Lewis TiCl₄, Et₃N a -78°C per un'ora. Successivamente la miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente per ottenere così il tiazolil chetone α,β insaturo **5** con una resa del 70% (Schema 1).



Schema 1. Reagenti e condizioni: (a) metil gliossale, NaHCO₃, EtOH-H₂O (1:1), o.n; (b) MnO₂, MeCN, 65°C, o.n; (c) isobutirraldeide, TiCl₄, Et₃N, THF anidro, da -78°C a T.amb.

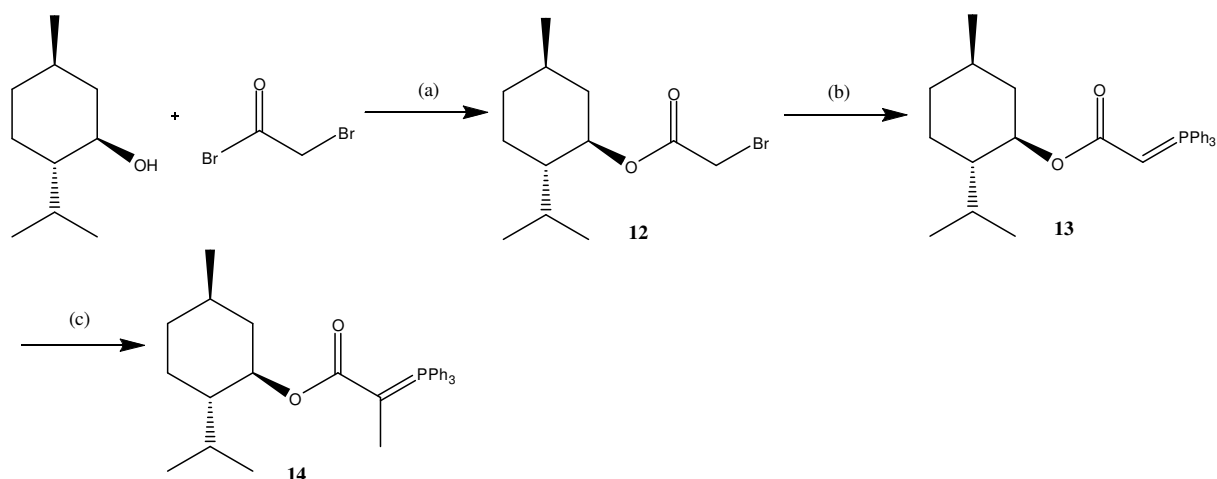
Con l'intento di ampliare gli studi SAR su nuovi derivati tubulinici, si è pensato di variare la natura dei sostituenti sull'azoto presente nel frammento **Tuv**. A tal proposito, sono stati scelti una serie di derivati amminici **6** in cui il sostituito R¹ era costituito da raggruppamenti alchilici, arilici, etero alchilici ed eteroarilici. Le ammine **6** sottoposte a reazione con il derivato acilico **7** enantiomericamente puro, a 0°C in presenza di diisopropilettilammina, hanno portato all'ottenimento degli azido derivati **8a-h**, con rese comprese tra 80 e 99% (Schema 2).

Attraverso la reazione di addizione Aza-Michael tra i derivati **8a-h** e il derivato α,β insaturo **5**, è stato possibile inserire il gruppo amminico originario nel frammento **Tuv** con ottenimento dei β -amino chetoni **9a-h**. Questi sono stati recuperati come miscela diastereoisomerica, in cui il rapporto tra i due diastereoisomeri è risultato differente in relazione alla tipologia di sostituito R^1 presente nell'azido derivato **8**. Al fine di ottenere i frammenti **Tuv** stereochimicamente puri, è stata condotta una riduzione asimmetrica della funzione chetonica mediata da ossazaborolidine chirali (riduzione di Corey-Bakshi-Shibata, CBS catalizzata). L'(S)-CBS, in presenza del complesso $BH_3 \cdot Me_2S$, ha infatti reagito quasi esclusivamente con la faccia *Si* dei derivati **9** per dare gli alcoli **10a-h** e **10'a-h** come miscele diastereoisomeriche che sono state facilmente separate attraverso cromatografia flash. In relazione ai risultati precedentemente pubblicati in merito alla definizione della stereochimica ottimale delle tubulisine in grado di assicurare elevata citotossicità, il processo di sintesi è stato proseguito con gli alcoli **10a-h**. Questi, a seguito di una blanda saponificazione della funzione esterea, sono stati trasformati nei corrispondenti derivati carbossilici (frammento Tuv) **11a-h** (Schema 2).



Schema 2. Reagenti e condizioni: (a) $i\text{-Pr}_2\text{EtN}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 1h; (b) KHMDS , THF anidro, -78°C , 1h; (c) (S)-CBS, THF anidro, $BH_3 \cdot Me_2S$ 10M, da 0°C a T.amb.; (d) LiOH , THF/ H_2O 4:1, 12h, T.amb.

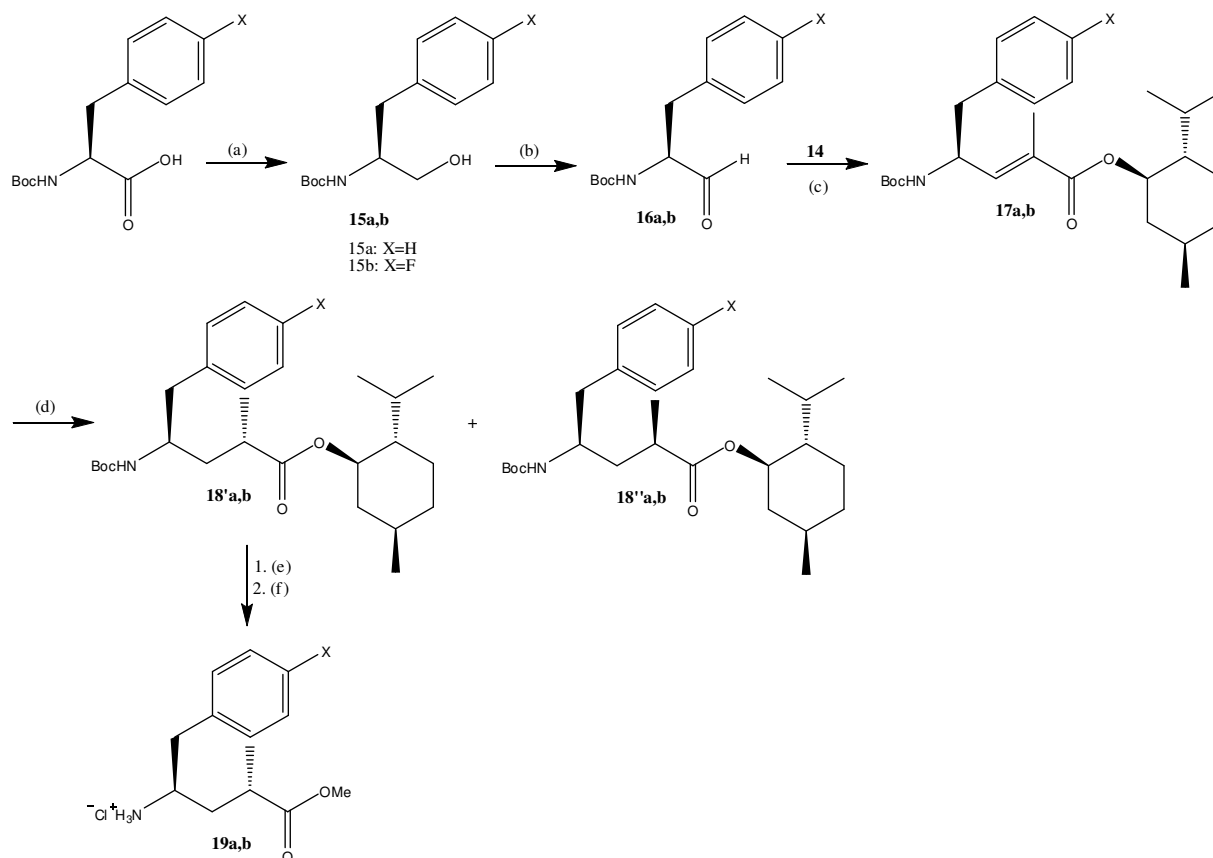
Lo step successivo ha riguardato la sintesi del secondo aminoacido non proteinogenico rappresentato dal frammento **Tup**. L'acilazione del (-)-Mentolo utilizzando bromoacetil bromuro ha portato al composto **12**. Per trattamento con trifenilfosfina in THF a refluxo per 2h e successivo trattamento con una soluzione di NaOH 0,38N, il composto **12** ha portato all'ilide derivato **13**, il quale è stato successivamente metilato mediante MeI per ottenere l'ilide **14** come riportato nello Schema 3.



Schema 3. Reagenti e condizioni: (a) Et₃N, THF anidro, da 0°C a T.amb., 2h; (b) PPh₃, THF a refluxo, 2h, NaOH 0,38N, toluene a T.amb.; (c) MeI, CH₂Cl₂, da 0°C a T.amb., o.n.

La reazione chiave per l'assemblaggio del frammento **Tup** è data dalla reazione di olefinazione di Wittig tra l'ilide **14** e l'aldeide **16** (Schema 4). Le aldeidi **16a,b** sono state ottenute per ossidazione con Dess-Martin periodinane dei rispettivi Boc-Fenilalanilolo e Boc-4-fluoro-L-fenilalanina **15a** e **15b**. Il derivato **15b** è stato ottenuto per reazione con etil cloroformiato in THF a 0°C e successivo trattamento con una soluzione acquosa di NaBH₄, mentre l'alcol **15a**, reperibile in commercio, è stato acquistato da Sigma Aldrich. La reazione di olefinazione di Wittig ha portato agli aminoesteri α,β insaturi **17a,b** con buone rese. Questi sono stati successivamente ridotti sotto flusso di H₂ usando Pd/C (10%) in acetato di etile, ottenendo i precursori Tup N,C-protetti **18'a,b** e **18''a,b** come miscela dei loro corrispondenti diastereoisomeri (rapporto diastereoisomerico di 2:1), facilmente separabili tramite cromatografia flash. La separazione dei due diastereoisomeri è stata seguita dalla totale deprotezione attraverso idrolisi acida con una soluzione di HCl 6N a 130°C, per dare i prodotti stereochimicamente puri H-Tup-OH cloridrati. Per successiva metilazione del gruppo

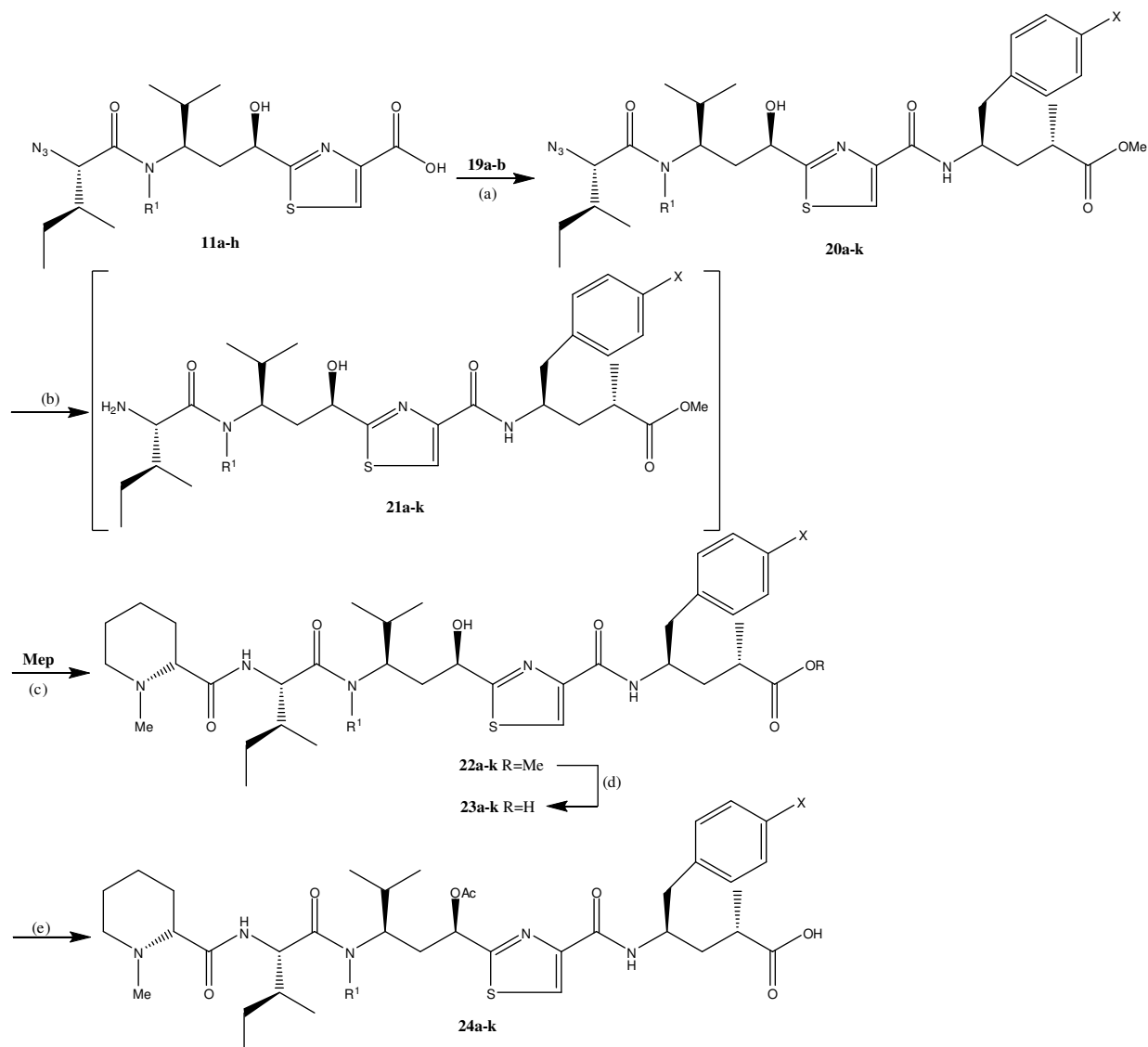
carbossilico con 2,2-dimetossipropano in metanolo a 50°C, i prodotti H-Tup-OH cloridrati sono stati trasformati con buone rese nei corrispondenti frammenti H-Tup-metil esteri cloridrati **19a,b** enantiomericamente puri (Schema 4).



Schema 4. Reagenti e condizioni: (a) THF anidro, 0°C, etil cloroformiato, Et₃N, 1h, NaBH₄ in H₂O a 0°C; (b) Dess-Martin periodinane, NaHCO₃, CH₂Cl₂, 2h; (c) CH₂Cl₂, da 0°C a T.amb., 2h; (d) H₂, Pd/C 10%, EtOAc, o.n.; (e) HCl 6N, 130°C, 1h; (f) 2,2-dimetossipropano, HCl 37% 2μL, MeOH, 50°C, 12h.

Il completamento della sintesi delle tubulisine **24a-k** è stato realizzato seguendo gli step standard del protocollo di sintesi peptidica come mostrato nello Schema 5. La sintesi ha riguardato inizialmente il coupling dei frammenti **Tuv 11a-h** con i frammenti H-**Tup**-metil esteri cloridrati **19a,b** usando Hatu, HOAt e Et₃N in DMF, ai fini dell'ottenimento dei tripeptidi **20a-k**. La funzione azidica dei derivati **20a-k** è stata ridotta sotto flusso di H₂ con Pd/C (10%) in MeOH a funzione amminica portando ai derivati **21a-k**. Questi sono stati direttamente sottoposti a successivo coupling con l'acido N-metil pipercolico (Mep) in presenza di Hatu, HOAt e Et₃N per ottenere con buona resa i tetrapeptidi **22a-k**. Le tubulisine **24a-k** in forma

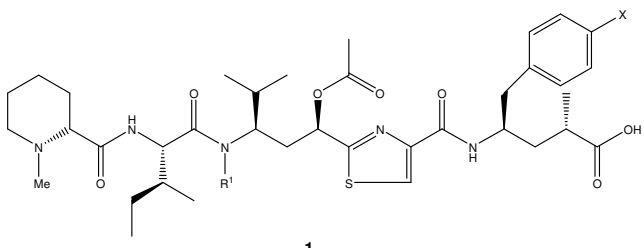
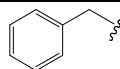
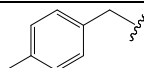
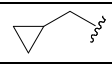
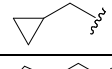
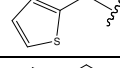
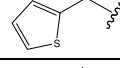
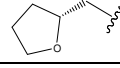
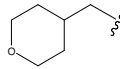
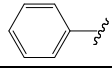
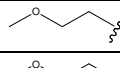
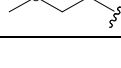
stereopura sono state ottenute per acetilazione dei sali dell'acido trifluoroacetico (TFA) **23a-k** a loro volta ottenuti attraverso saponificazione dell'estere metilico dei composti **22a-k**, seguita da trattamento con TFA.



Schema 5. Reagenti e condizioni: (a) HATU, HOAt, Et₃N, DMF, T.amb., 2h; (b) H₂, Pd/C 10%, MeOH, o.n.; (c) HATU, HOAt, Et₃N, CH₂Cl₂, T.amb., 4h; (d) LiOH 1N, THF, 48h, T.amb., TFA pH=2; (e) Ac₂O, piridina, T.amb., o.n.

Attraverso il processo generale sopra descritto, sono stati ottenuti 11 nuovi derivati delle tubulisine (**24a-k**), caratterizzati dalle strutture chimiche riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Struttura chimica e denominazione dei nuovi derivati sintetici delle tubulisine.

			
Composto	Denominazione	R ¹	X
24a	KEMTUB001		H
24b	KEMTUB032		H
24c	KEMTUB012		H
24d	KEMTUB013		F
24e	KEMTUB019		H
24f	KEMTUB016		F
24g	KEMTUB017		F
24h	KEMTUB018		F
24i	KEMTUB031		F
24j	KEMTUB006		H
24k	KEMTUB030		F

6.3 Valutazione in vitro della citotossicità dei nuovi derivati delle tubulisine

La citotossicità dei composti sintetizzati è stata valutata nei confronti delle linee cellulari tumorali HL60 (leucemia umana) e A2780 (carcinoma ovarico umano). A questo scopo è stato utilizzato il test ATPlite (Perkin Elmer), basato sulla determinazione della produzione di ATP (marker di vitalità cellulare) attraverso la chemiluminescenza causata dalla reazione dell'ATP con la luciferasi e la D-luciferina.¹⁴⁻¹⁵ I saggi sono stati condotti per confronto con composti di riferimento quali paclitaxel, vinblastina, tubulisina A e tubulisina U.

I valori di IC₅₀ sono stati determinati dopo incubazione delle cellule per 72 ore in presenza del composto da testare. I risultati della sperimentazione, riportati in Tabella 2 come media dei valori di IC₅₀ ottenuti da cinque esperimenti indipendenti, hanno evidenziato una significativa

citotossicità dei nuovi derivati delle tubulisine, con valori di IC₅₀ inferiori al nanomolare su entrambe le linee cellulari tumorali adottate. E' inoltre da rilevare come tutti i nuovi composti sintetizzati abbiano mostrato citotossicità significativamente superiore rispetto a quella determinata con Paclitaxel e a vinblastina, oltre che con le tubulisine di riferimento A e U. Tra i nuovi composti, la maggiore attività citotossica è stata rilevata in quelli afferenti alle sottoclassi in cui R¹ ha il significato di benzile (composto **KEMTUB001**) o di ciclopropilmetile (**KEMTUB012** e **KEMTUB013**).

Tabella 2. Valori di IC₅₀ dopo incubazione di cellule HL60 o A2780 per 72 ore in presenza del composto da testare.

Composto	Denominazione	HL60 (IC ₅₀ nM)	A2780 (IC ₅₀ nM)
24a	KEMTUB001	0,0005±0,0002	0,0018±0,0008
24b	KEMTUB032	0,0020±0,0009	0,0095±0,0025
24c	KEMTUB012	0,0006±0,0003	0,0008±0,0002
24d	KEMTUB013	0,0005±0,0001	0,0005±0,0002
24e	KEMTUB019	0,0007±0,0002	0,0011±0,0007
24f	KEMTUB016	0,0003±0,0001	0,0002±0,0001
24g	KEMTUB017	0,0057±0,0018	0,0045±0,0022
24h	KEMTUB018	0,0014±0,0007	0,0084±0,0015
24i	KEMTUB031	0,0025±0,0009	0,0015±0,0007
24j	KEMTUB006	0,0038±0,0009	0,0055±0,0020
24k	KEMTUB030	0,0025±0,0007	0,0033±0,0009
Riferimenti	TUBULISINA A	0,0712±0,0155	2,1000±0,4552
	TUBULISINA U	13,7000±1,895	27,4500±3,455
	PACLITAXEL	45,5600±6,555	70,5000±8,958
	VINBLASTINA	5,7800±1,025	7,8900±1,764

La citotossicità di alcuni dei composti sintetizzati è stata valutata anche nei confronti di altre linee cellulari tumorali, con particolare riferimento alle cellule tumorali umane del seno (BT474, HCC1954, MDA-MB-468, SKBR3, MCF7), del tratto gastrico (N87), del peritoneo (MESO, STO) e del colon (LoVo). Anche in questi saggi, i nuovi derivati delle tubulisine hanno mostrato elevata citotossicità, con valori di IC₅₀ inferiori rispetto a quelli di citotossici di riferimento (Tabella 3). Le potenzialità dei nuovi derivati delle tubulisine sono state ulteriormente evidenziate attraverso il confronto dei valori di IC₅₀ medi dei composti **KEMTUB001** e **KEMTUB012**, determinati con le linee cellulari tumorali umane di tumore al seno BT474, MDA-MB-361-DYT2 e N87, con chemioterapici convenzionali utilizzati nella pratica clinica (Tabella 4).

Tabella 3. Valori di IC₅₀ dopo incubazione di differenti linee cellulari tumorali per 48 o 72 ore in presenza del composto da testare.

Composto	IC ₅₀ (nM)						
	BT474	HCC195 4	MDA- MB-468	SKBR3	N87	MESO (48h)	STO (48h)
24a	0,078±0,025	0,019±0,010	0,104±0,055	0,035±0,012	0,116±0,075	0,220±0,095	0,220±0,058
24c	0,070±0,031	0,017±0,008	0,116±0,038	0,038±0,009	0,094±0,025	0,036±0,003	0,019±0,004
24e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,310±0,15	0,240±0,08
24f	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,470±0,11	0,370±0,14
24h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,50±3,5	2,80±1,1
24i	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,97±0,23	1,60±0,61
Tubulis.A	0,414±0,085	0,213±0,090	0,542±0,088	0,328±0,055	0,294±0,085	1,50±0,35	1,20±0,42
Tubulis.U	10,4±2,62	7,8±1,10	9,9±2,10	5,9±0,95	4,35±0,88	4,50±1,2	6,00±1,3
Paclitaxel	8,36±1,55	n.d.	7,77±2,05	n.d.	7,64±1,25	26,00±5,3	27,00±4,8
Vinorelb.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,50±7,2	5,60±1,1

Tabella 4. Valori medi di IC₅₀ dei nuovi derivati delle tubulisine determinati con linee cellulari tumorali umane di tumore al seno. Confronto con tubulisina A e chemioterapici commerciali.

Composto	Meccanismo	IC ₅₀ (nM)		
		BT474	MDA-MB-361- DYT2	N87
KEMTUB001	Tubulina	0,078	0,066	0,116
KEMTUB012	Tubulina	0,070	0,072	0,094
TubulisinaA	Tubulina	0,414	0,539	0,294
Docetaxel	Tubulina	4,34	2,63	6,37
Paclitaxel	Tubulina	8,36	6,77	7,64
Vinblastina	Tubulina	0,60	1,09	1,76
Vincristina	Tubulina	0,435	2,28	2,43
Camptotechina	DNA	281,8	71,0	16,2
Doxorubicina	DNA	69,4	76,6	10,4
Gemcitabina	DNA	347,2	15,55	3,39

Saggi in vitro condotti su linee di cellule tumorali esprimenti fenotipi resistenti ai citotossici convenzionali, come le cellule LoVo/DX e MCF7/DX, hanno permesso di confermare ulteriormente le potenzialità terapeutiche delle nuove tubulisine, con particolare riferimento al loro impiego nel trattamento di tumori con resistenza innata o acquisita. Come evidenziato dai dati sperimentali riportati in Tabella 5, i nuovi derivati delle tubulisine hanno infatti mostrato

valori di IC₅₀ dell'ordine del nanomolare o inferiori anche sulle linee cellulari LoVo/DX e MCF7/DX.

Tabella 5. Valori di IC₅₀ dopo incubazione di cellule LoVo e MCF7 e dei corrispondenti fenotipi resistenti LoVo/DX e MCF7/DX con alcuni dei composti sintetizzati o con chemioterapici di riferimento. Tempo di esposizione delle cellule in presenza del composto da testare: 72 ore.

Composto	IC ₅₀ (nM)			
	LoVo	LoVo/DX	MCF7	MCF7/DX
24a	1,87±0,6	1,35±0,3	0,375±0,38	0,725±0,39
24c	0,70±0,4	2,10±0,3	0,070±0,04	0,485±0,30
24e	3,10±1,2	1,40±0,2	1,56±0,54	0,980±0,41
24f	1,90±1,1	10,5±4,9	0,74±0,03	1,08±0,39
24h	14,2±7,1	100,0±9,8	4,77±0,035	22,2±4,9
24i	7,50±4,5	60,9±6,3	2,75±0,26	2,97±1,6
Tubulis.A	10,5±3,8	68,8±7,2	0,60±0,09	35,0±6,2
Paclitaxel	1000±88	3500±90	30,0±3,5	530±79
Vinorelbina	375±55	1740±75	4,30±1,8	77,7±9,8
Doxorubicina	n.d.	n.d.	50,0±8,5	507±58

6.4 Valutazione preliminare del meccanismo d'azione dei nuovi derivati delle tubulisine

Nell'ambito della ricerca si è inoltre provveduto a verificare quanto l'azione citotossica dei nuovi derivati delle tubulisine potesse essere riconducibile al meccanismo d'azione mostrato dalle tubulisine naturali di riferimento. Poiché è noto dalla letteratura che le tubulisine naturali agiscono sulla vitalità cellulare con modalità analoga a quella degli alcaloidi della vinca, inibendo la polimerizzazione della tubulina, il meccanismo d'azione dei nuovi derivati delle tubulisine è stato studiato attraverso un opportuno saggio di polimerizzazione della tubulina utilizzando la linea cellulare di carcinoma del colon LoVo. I saggi utilizzati sono stati in particolare basati sulla quantificazione di α tubulina impiegando un anticorpo specifico, adottando la tecnica di western-blot.

I risultati ottenuti con i composti **KEMTUB001**, **KEMTUB012**, **KEMTUB016** e **KEMTUB019**, sono stati confrontati con quelli di taxolo e vinorelbina, considerati rispettivamente controllo negativo e positivo per il saggio adottato. Nel caso del taxolo, è infatti

noto che l'azione citotossica non è determinata dall'inibizione della polimerizzazione delle tubuline, ma piuttosto da una perturbazione della formazione del fuso mitotico cellulare per aumento della polimerizzazione della tubulina.

I dati ottenuti mostrano chiaramente che i nuovi derivati delle tubulisine sono stati in grado di interferire marcatamente con il processo di polimerizzazione della tubulina (Figura 4). In particolare, dopo 48 e 72 ore di esposizione delle cellule LoVo ai nuovi composti, così come nel caso della vinorelbina, è stato possibile apprezzare un marcato aumento del quantitativo di tubulina solubile rispetto alla polimerizzata. Come previsto, nel caso del taxolo il rapporto tra la componente della tubulina polimerizzata e quella in soluzione è risultato opposto a quello riscontrato nel caso delle tubulisine e del derivato della vinblastina, una frazione della tubulina polimerizzata marcatamente più alta rispetto alla solubile (Figura 4B).

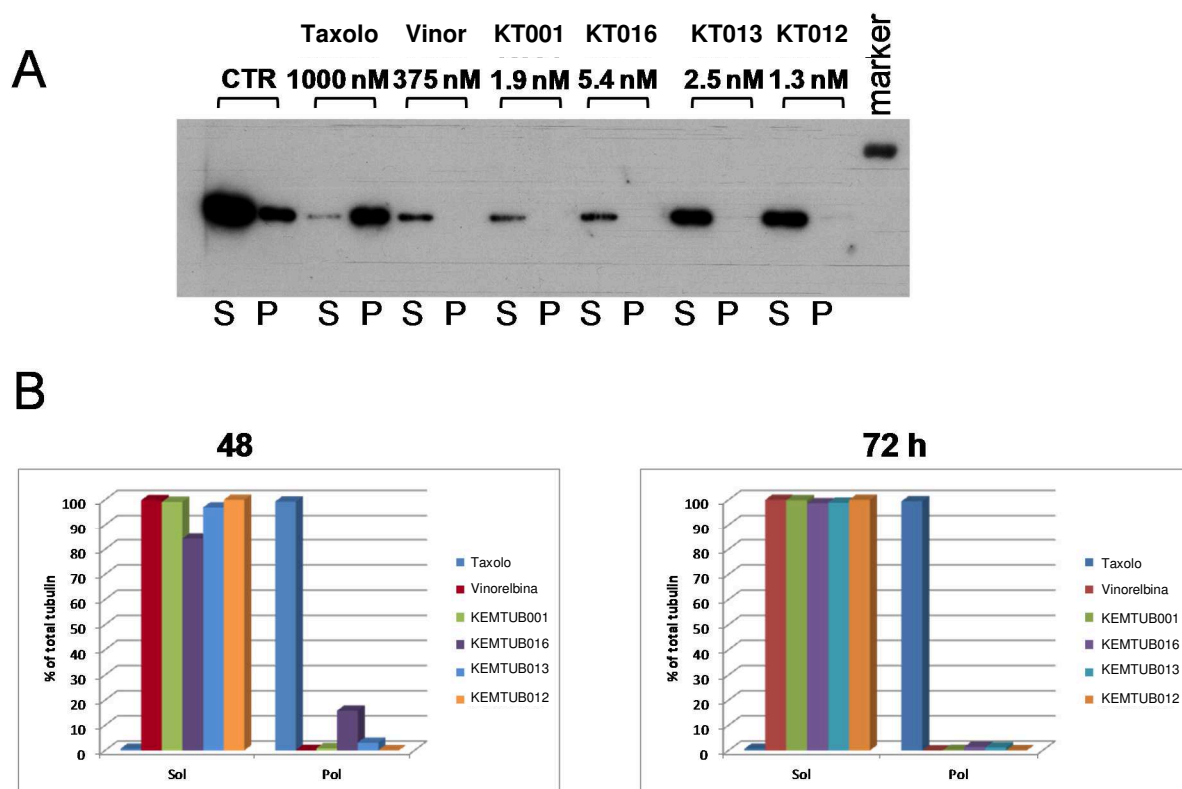


Figura 4. (A) Saggio della polimerizzazione della tubulina effettuato su estratti proteici ottenuti dalle cellule LoVo esposte ai derivati KEMTUB, al taxolo e alla vinorelbina; S: frazione solubile; P: frazione polimerizzata. (B) Quantificazione dei dati relativi alla polimerizzazione della tubulina ottenuti dopo 48 e 72 ore di trattamento delle cellule LoVo ai diversi agenti antitumorali.

6.5 Saggi in vivo

In base al profilo mostrato nell'ambito dei test *in vitro*, **KEMTUB012** è stato selezionato quale *lead* della nuova classe di composti da sottoporre alla valutazione *in vivo* in modelli animali tumorali. Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti utilizzando femmine di topo nudo atimico Swiss (età 10 settimane, Charles River, Calco, Italia), utilizzando quali riferimenti il veicolo e un'analogia formulazione del chemioterapico di riferimento vinorelbina. Gli animali sono stati stabulati in stanze a flusso laminare a temperatura e umidità costanti. I topi hanno avuto libero accesso a cibo e acqua e gli esperimenti, condotti presso lo stabulario dell'Istituto dei Tumori di Milano, sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dello stesso Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, in accordo con le linee guida istituzionali e internazionali.

Le cellule di mesotelioma peritoneale maligno umano (MESOII), provenienti da colture *in vitro* in monostrato, sono state inoculate sottocute in topi sani (10^7 cellule/fianco). Quando il volume tumorale è risultato dell'ordine dei $90-100\text{mm}^3$ (4 giorni dall'inoculo), gli animali sono stati randomizzati per il trattamento (7 animali/gruppo sperimentale). Il derivato **KEMTUB012**, solubilizzato in un veicolo costituito da Cremophor EL (BASF), etanolo ed acqua, è stato somministrato per via endovenosa (i.v.) in un volume di 10 ml/Kg di peso corporeo. Il composto è stato somministrato ogni 4 giorni per 4 volte. La crescita tumorale è stata seguita misurando due volte alla settimana i diametri dei tumori. Il volume tumorale (TV) è stato calcolato secondo la formula:

$TV = d^2 \times D / 2$ (d = diametro minore, D = diametro maggiore).

Gli animali sono stati eliminati quando la media dei volumi tumorali ha raggiunto $500-600\text{mm}^3$. L'efficacia del trattamento è stata valutata in termini d'inibizione del volume tumorale, in accordo alla seguente formula:

$TVI\% = 100 - (TV \text{ medio dei topi trattati} / TV \text{ medio dei topi controlli} \times 100)$.

Gli animali sono stati pesati 2 volte alla settimana allo scopo di evidenziare eventuali differenze di peso, espresse in percentuale rispetto all'inizio del trattamento. Per valutare la tossicità del trattamento è stato preso in considerazione il massimo calo di peso osservato. Gli animali trattati e morti prima del primo controllo, sono stati considerati morti per gli effetti tossici (tossicità letale). Per l'analisi statistica dei risultati, i volumi tumorali degli animali trattati rispetto ai controlli sono stati confrontati utilizzando il test t di Student a due code. Le differenze sono state considerate significative quando P era $< 0,05$.

Gli effetti determinati dalla somministrazione i.v. del composto **KEMTUB012** sono evidenziati dai risultati sperimentali riepilogati in Tabella 5. Alle dosi di 0,100 e 0,125 mg/kg, il nuovo derivato delle tubulisine ha determinato una riduzione del volume notevolmente superiore rispetto a quella indotta dalla somministrazione di vinorelbina alla dose di 5,000 mg/kg. In particolare, il valore di TVI% per **KEMTUB012** alla dose di 0,125 mg/kg è risultato pari al 77 %, con una significatività statisticamente rilevante non solo rispetto alla somministrazione del veicolo, ma anche rispetto al chemioterapico di riferimento somministrato ad una dose quaranta volte superiore di quella del nuovo derivato delle tubulisine (P<0,05 vs vinorelbina; P<0,001 vs veicolo). Alle dosi sopracitate, **KEMTUB012** non è risultato letale (Tox: 0/n; nessuna morte / numero animali testati) e non ha evidenziato effetti tossici riscontrabili attraverso la perdita di peso. Alle stesse dosi, anche indagini preliminari condotte sugli organi principali (fegato, milza, intestino) degli animali a fine sperimentazione non hanno rilevato effetti riconducibili ad una tossicità del composto in esame.

Tabella 5. Valutazione dell'attività antitumorale in un modello murino di tumore peritoneale maligno umano (Meso II). Trattamento ai giorni 4, 8, 12, 16 dall'inoculo.

Composto	Dose (mg/kg)	TVI%	Perdita Peso %	Tox
KEMTUB012	0,100	63	4	0/7
KEMTUB012	0,125	77** ^o	5	0/11
Vinorelbina	5,000	40	3	0/11
**P<0,001 vs veicolo; ^o P<0,05 vs Vinorelbina				

6.6 Conclusioni

La ricerca condotta ha consentito di individuare una nuova classe di derivati delle tubulisine naturali ottenibili attraverso un processo di sintesi totale a partire da composti commerciali facilmente reperibili. Il processo di sintesi individuato ed ottimizzato nel corso della ricerca è risultato scalabile, almeno ai fini dell'ottenimento di quantitativi di tubulisine dell'ordine delle centinaia di milligrammi.

I nuovi composti sintetizzati, caratterizzati da opportuni sostituenti (etero)-aromatici o (etero)-ciclici sull'azoto del frammento **TUV** delle tubulisine, hanno mostrato elevata citotossicità nei confronti di differenti linee tumorali, comprese cellule di tumori intrinsecamente resistenti o con resistenza acquisita ai chemioterapici convenzionali. In particolare, per i nuovi composti

sintetizzati sono stati determinati valori di IC₅₀ dell'ordine del nanomolare o inferiori, significativamente più bassi rispetto a quelli di Paclitaxel e vinblastina, oltre che inferiori a quelli di tubulisine di riferimento (tubulisine A e U).

L'introduzione dei nuovi sostituenti sul frammento **TUV** non ha comportato alcun cambiamento sul meccanismo d'azione delle tubulisine. Come nel caso della vinorelbina, i nuovi derivati delle tubulisine hanno infatti mostrato la capacità di inibire la polimerizzazione della tubulina in cellule LoVo.

Anche se attraverso un saggio preliminare, il composto **KEMTUB012**, selezionato quale *lead* fra i nuovi derivati sintetizzati, ha mostrato in vivo una significativa attività antitumorale in un L'attività condotta ha confermato le grandi potenzialità dei nuovi derivati delle tubulisine. I risultati preliminari ottenuti dovranno essere ulteriormente approfonditi a valle della presente ricerca, sia relativamente all'impiego dei composti tal quale nell'ambito di modelli animali più completi ed accurati, sia per quanto concerne gli aspetti tossicologici. Un ulteriore aspetto rilevante da valutare potrà inoltre essere rappresentato dalla coniugazione dei nuovi derivati delle tubulisine con anticorpi o frammenti di anticorpi in grado di riconoscere marcatori tumorali per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali basate sulla *target therapy*.

6.7 Referenze

1. Sasse F., Steinmetz H., Heil J., Höfle G., Reichenbach H. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J.Antibiot.* **2000**, *53*, 879-885.
2. Sandmann A., Sasse F., Müller R. Identification and Analysis of the Core Biosynthetic Machinery of Tubulysin, a Potent Cytotoxin with Potential Anticancer Activity. *Chem.Biol.* **2004**, *11*, 1071-1079.
3. Mohamed W. Khalil M.W., Sasse F., Lünsdorf H., Elnakady Y.A., Reichenbach H. Mechanism of Action of Tubulysin, an Antimitotic Peptide from Myxobacteria. *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 678-683.
4. Kaur G., Hollingshead M., Holbeck S., Schauer-Vukasinovic, Camalier R.F., Dömling A., Agarwal S. Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product. *Biochem.J.* **2006**, *396*, 235-242.
5. Sani M., Fossati G., Huguenot F., Zanda M. Total Synthesis of Tubulysins U and V. *Angew.Chem.* **2007**, *119*, 3596-3599.

6. Dömling A., Richter W. Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents. *Molecular diversity*. **2005**, *9*, 141-147.
7. Dömling A., Beck B., Eichelberger U., Sakamuri S., Menon S., Chen Q.Z., Lu Y., Wessjohann L.A. Total Synthesis of Tubulysins U and V. *Angew.Chem.* **2006**, *43*, 7393-7397.
8. Balasubramanian R., Raghavan B., Begaye A., Sackett D.L., Fecik R.A. Total Synthesis and Biological Evaluation of Tubulysin U, Tubulysin V, and Their Analogues. *J.Med.Chem.* **2009**, *52*, 238-240.
9. Shibue T., Hirai T., Okamoto I., Morita N., Masu H., Azumaya I., Tamura O. Total Synthesis of Tubulysins. *Chem.Europ.J.* **2010**, *16*, 11678-11688.
10. Yang X.D., Dong C.M., Chen J., Ding Y.H., Liu Q., Ma X.Y., Zhang Q., Chen Y. Total synthesis of tubulysin U and its C-4 epimer. *Chem.Asian J.* **2013**, *8*, 1213-1222.
11. Wang R., Tian P., Lin G. Stereoselective total synthesis of tubulysin V. *Chin.J.Chem.* **2013**, *31*, 40-48.
12. Pando O., Dörner S., Preusentanz R., Denkert A., Porzel A., Richter W., Wessjohan L. First total synthesis of Tubulysin B. *Org.Lett.* **2009**, *11*, 5567-5569.
13. Peltier H.M., McMahon J.P., Patterson A.W., Ellman J.A. The total synthesis of Tubulysin D. *JACS.* **2006**, *128*, 16018-16019.
14. Shankar S.P., Jagodzinska M., Malpezzi L, Lazzari P, Manca I., Greig I.R., Sani M., Zanda M. Synthesis and structure-activity relationship studies of novel tubulysin U analogues - effect on cytotoxicity of structural variations in the tubuvaline fragment. *Org.Biomol.Chem.* **2013**, *11*, 2273-2287.
15. Shankar S.P., Bigotti S., Lazzari P., Manca I., Spiga M., Sani M., Zanda M. Synthesis and cytotoxicity evaluation of diastereoisomers and N-terminal analogues of tubulysin U. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 6137-6141.
16. Kazmaier U., Ullrich A., Hoffmann J. Synthetic Approaches Towards Tubulysins and Derivatives Thereof. *The Open Nat.Prod.J.* **2013**, *6*, 12-30.

CAPITOLO 7

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI COMPOSTI OTTENUTI

7.1 NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEI CANNABINOIDI

7.1.1 SINTESI DI NUOVI COMPOSTI AGONISTI DEI RECETTORI DEI CANNABINOIDI CB₂

7.1.1.1 Sintesi di *N*-Mirtanil-6-bromo-1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (NESS207C5):

3-Cloro-1-(tiofen-2'-il)propan-1-one (3). Il 3-cloropropionil cloruro (**2**) (8,30 g, 65,4 mmoli) è stato aggiunto ad una sospensione di AlCl₃ (9,50 g, 71,3 mmoli) in diclorometano (30 mL) raffreddata a 0°C. Dopo aver lasciato la miscela di reazione sotto agitazione a 0°C per 15 minuti, si è aggiunta goccia a goccia una soluzione di tiofene (**1**) (5,00 g, 59,4 mmoli) in diclorometano (10 mL), facendo poi risalire la temperatura fino a temperatura ambiente. La miscela è stata fatta reagire per 4 ore. La reazione è stata quindi spenta con acqua e ghiaccio e la miscela ottenuta è stata quindi estratta con etere etilico. Le fasi organiche riunite sono state anidificate su sodio solfato ed il solvente eliminato al rotavapor. Il prodotto è stato utilizzato tal quale nel passaggio successivo. Ottenuti 10,51 g del prodotto **3** (resa quantitativa). *R_f* = 0,43 (Etere di petrolio/AcOEt 85:15). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,39 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,90 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz); 7,13-7,18 (m, 1H); 7,68 (d, 1H, *J* = 4,8 Hz); 7,74 (d, 1H, *J* = 3,8 Hz).

1-(Tiofen-2'-il)prop-2-en-1-one (4). Ad una soluzione di **3** (10,38 g, 59,4 mmoli) in etere etilico (156 mL) è stata aggiunta trietilammina (9,94 mL, 71,3 mmoli). La soluzione ottenuta è stata lasciata reagire sotto agitazione a temperatura ambiente per 48 ore. E' stato quindi aggiunto HCl 1N fino a pH acido; la fase eterea è stata quindi separata e lavata con acqua. La fase organica ottenuta è stata anidificata su sodio solfato ed il solvente eliminato al rotavapor per ottenere 7,59 g di prodotto **4** come liquido giallino. La resa è stata pari al 92,42%. *R_f* = 0,48 (Etere di petrolio/AcOEt 95:5). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 5,85 (dd, 1H, *J* = 1,6 e 10,5 Hz); 6,47 (dd,

1H, $J = 1,6$ e $17,2$ Hz); 7,05 (dd, 1H, $J = 10,5$ e $17,2$ Hz); 7,12-7,16 (m, 1H); 7,65 (bd, 1H, $J = 5,1$ Hz); 7,76 (bd, 1H, $J = 3,8$ Hz).

4,5-Diidro-ciclopenta[*b*]tiofen-6-one (5). Una soluzione di **4** (4,27 g, 30,9 mmoli) in 1,2-dicloroetano (42,7 mL) è stata aggiunta goccia a goccia ad una miscela 1:1 di 1,2-dicloroetano (23,55 mL) ed acido solforico (23,55 mL). La miscela è stata scaldata a 80°C per 75 minuti, quindi è stata raffreddata a temperatura ambiente e successivamente diluita con acqua. La miscela ottenuta è stata estratta con diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di sodio bicarbonato, poi con acqua, quindi anidificate su sodio solfato. Il solvente è stato eliminato al rotavapor. Il residuo è stato purificato tramite cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 7:3), ottenendo 2,24 g del prodotto **5** puro (resa 52,46%). $R_f = 0,47$ (Etere di petrolio/AcOEt 7:3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,96-3,06 (m, 4H); 7,04 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz); 7,89 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz).

2-(5,6-Diidro-6-osso-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofen-5-il)-2-ossoacetato di etile (6). 0,51 g di sodio metallico (22,4 mmoli) sono stati disciolti in 19,38 mL di EtOH assoluto sotto atmosfera inerte di azoto. Alla soluzione limpida di etossido di sodio così ottenuta è stato aggiunto il dietilossalato (3,04 mL, 22,4 mmoli) e di seguito una soluzione del composto **5** (1,55 g, 11,2 mmoli) in EtOH assoluto (20 mL). La miscela è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 20 ore, quindi è stata versata in ghiaccio e HCl 10%. Il precipitato formatosi è stato filtrato su setto poroso ed asciugato per ottenere 2,41 g di prodotto **6** come polvere giallina (resa 90,31%). $R_f = 0,30$ (Etere di petrolio/AcOEt 7:3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,41 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); 3,87 (s, 2H); 4,39 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz); 7,12 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz); 7,93 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz).

1-Pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossilato di etile (8). Una miscela del composto **6** (0,48 g, 2,0 mmoli) e di pentilidrazina cloridrato **7** (0,30 g, 2,2 mmoli) in acido acetico (2,25 mL) è stata scaldata a riflusso per una notte. La miscela è stata neutralizzata con una soluzione satura di sodio bicarbonato ed estratta con etere etilico. Le fasi organiche sono state riunite ed anidificate su sodio solfato. Il solvente è stato eliminato al rotavapor. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 85:15) per ottenere 0,12 g del prodotto **8** puro (resa 17%). $R_f = 0,21$ (Etere di petrolio/AcOEt 85:15). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz); 1,31-1,38 (m, 4H); 1,41 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz); 1,94-2,03 (m, 2H); 3,61 (s, 2H); 4,30 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 4,42 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz); 7,13 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 7,30 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

Acido 1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossilico (9). Ad una soluzione del composto **8** (0,50 g, 1,6 mmoli) in 5 mL di metanolo sono stati aggiunti

0,37 g (6,6 mmoli) di KOH solido. La miscela così ottenuta è stata scaldata alla temperatura di riflusso per 2 ore e quindi versata in ghiaccio e HCl al 10%. E' stato ottenuto un precipitato bianco che, una volta filtrato, è stato lavato con acqua e seccato all'aria per ottenere 0,45 g dell'acido **9** puro (resa quantitativa). $R_f = 0,47$ (CHCl₃/MeOH 9:1). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,86 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz); 1,30-1,40 (m, 4H); 1,92-2,02 (m, 2H); 3,57 (s, 2H); 4,28 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz); 4,70 (bs, 1H); 7,10 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz); 7,28 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz).

***N*-Mirtanil-1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta [1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (11).** Una miscela dell'acido **9** (0,45 g, 1,6 mmoli), *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbo-diimmide cloridrato (EDC) (1,2 eq) e 1-idrossibenzotriazolo idrato (HOBt) (1,2 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL) è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Alla miscela di reazione è stata quindi aggiunta goccia a goccia una soluzione di (-)-*cis*-mirtanilammina (**10**) (2 eq) in CH₂Cl₂ (3 mL). La miscela ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 14 ore. Al termine è stata concentrata a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato per cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 75:25) ottenendo il composto **11** con una resa del 78%. $R_f = 0,29$ (Etere di petrolio/AcOEt 75:25). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,90 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); 0,92 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz); 1,09 (s, 3H); 1,21 (s, 3H); 1,29-1,42 (m, 4H); 1,53-1,64 (m, 1H); 1,81-2,03 (m, 7H); 2,29-2,40 (m, 2H); 3,33-3,41 (m, 1H); 3,46-3,53 (m, 1H); 3,66 (s, 2H); 4,21 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz); 6,91 (bs, 1H); 7,14 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 7,28 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

***N*-Mirtanil-6-bromo-1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5] ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (NESS207C5).** Ad una sospensione del composto **11** (0,53 g, 1,3 mmoli) in acetonitrile anidro (10 mL), raffreddata a 0°C sotto atmosfera inerte, è stata aggiunta a piccole porzioni la *N*-bromosuccinimmide (0,28 g, 1,5 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte e quindi versata in una soluzione satura di Na₂S₂O₃. Il precipitato formatosi è stato filtrato, asciugato all'aria e sgranato con *n*-esano per ottenere 0,35 g del composto **NESS207C5** puro (resa 56%). $R_f = 0,60$ (Etere di petrolio/AcOEt 8:2). ¹H NMR (DMSO) δ: 0,80-0,85 (m, 4H); 1,04 (s, 3H); 1,15 (s, 3H); 1,20-1,35 (m, 4H); 1,46-1,56 (m, 1H); 1,75-1,92 (m, 7H); 2,22-2,34 (m, 2H); 3,16-3,27 (m, 2H); 3,56 (s, 2H); 4,22 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz); 7,42 (s, 1H); 8,00-8,10 (m, 1H).

7.1.1.2 Sintesi di *N*-Mirtanil-6-fenil-1-pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (NESS209C5):

Una soluzione del composto **NESS207C5** (0,20 g, 0,4 mmoli) in 1,2-dimetossietano (4 mL) è stata degasata e mantenuta sotto atmosfera inerte di azoto. A questa soluzione sono stati aggiunti 20 mg (0,02 mmol) di Pd(PPh₃)₄ e, dopo qualche minuto, 0,07 g (0,61 mmoli) di acido fenilboronico (**12**). Infine sono stati aggiunti 0,06 g (0,5 mmoli) di Na₂CO₃ disciolti in acqua (2 mL) e la miscela è stata scaldata a riflusso per 18 h. Il solvente è stato evaporato ed il residuo purificato per cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 7:3). Il prodotto così ottenuto è stato ricristallizzato con una miscela di n-esano/AcOEt 95:5 per dare 0,10 g di **NESS209C5** puro (resa 50%). *R_f* = 0,77 (Etere di petrolio/AcOEt 7:3). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,80-0,88 (m, 4H); 1,10 (s, 3H); 1,22 (s, 3H); 1,33-1,44 (m, 4H); 1,55-1,66 (m, 1H); 1,83-2,07 (m, 7H); 2,30-2,42 (m, 2H); 3,34-3,43 (m, 1H); 3,47-3,55 (m, 1H); 3,70 (s, 2H); 4,23 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 6,87-6,93 (m, 1H); 7,27-7,32 (m, 1H); 7,37-7,43 (m, 3H); 7,59-7,63 (m, 2H).

7.1.1.3 Sintesi di *N*-Mirtanil-6-bromo-2-pentil-2,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (**17**):

1,4-Diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossilato di etile (13**)**. Una miscela del composto **6** (1,00 g, 4,2 mmol) e di idrazina idrata (0,22 mL, 4,6 mmol) in etanolo assoluto (8 mL) è stata scaldata a riflusso per 5 ore. La miscela di reazine è stata quindi riportata a temperatura ambiente ed il solvente evaporato al rotavapor. Il residuo ottenuto è stato purificato per cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 8:2) per ottenere 0,49 g del prodotto **13** puro (resa 51%). *R_f* = 0,30 (Etere di petrolio/AcOEt 8:2). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,43 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz); 3,67 (s, 2H); 4,43 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz); 7,11 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz); 7,37 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz); 10,71 (bs, 1H).

1-Pentil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossilato di etile (8**) e 2-Pentil-2,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-*c*]pirazol-3-carbossilato di etile (**14**)**. Una miscela del composto **13** (0,49 g, 2,1 mmoli), di 1-bromopentano (0,29 mL, 2,3 mmoli) e di carbonato di potassio (0,58 g, 4,2 mmoli) in dimetilformammide (0,5 mL) è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata quenched con acqua, diluita con etere etilico e lavata con acqua. Le fasi organiche riunite sono state anidificate su sodio solfato ed il solvente è stato allontanato al rotavapor. Il residuo ottenuto è stato purificato

mediante cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 94:6 fino a 8:2) per ottenere 0,40 g del prodotto **14** puro (resa 63%) e, di seguito, 0,19 g del prodotto **8** (resa 30%).

Composto 8. $R_f = 0,42$ (Etere di petrolio/AcOEt 8:2). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz); 1,31-1,38 (m, 4H); 1,41 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz); 1,94-2,03 (m, 2H); 3,61 (s, 2H); 4,30 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 4,42 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz); 7,13 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 7,30 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

Composto 14. $R_f = 0,58$ (Etere di petrolio/AcOEt 94:6). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,90 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz); 1,30-1,38 (m, 4H); 1,41 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz); 1,83-1,92 (m, 2H); 3,61 (s, 2H); 4,38 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz); 4,57 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz); 7,08 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 7,31 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

Acido 2-pentil-2,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c] pirazol-3-carbossilico (15). Ad una soluzione del composto **14** (0,40 g, 1,3 mmoli) in 5 mL di metanolo sono stati aggiunti 0,29 g (5,3 mmoli) di KOH solido. La miscela così ottenuta è stata scaldata alla temperatura di riflusso per 14 ore e quindi versata in ghiaccio e HCl al 10%. È stato ottenuto un precipitato bianco che è stato filtrato, lavato con acqua e seccato all'aria per ottenere 0,32 g dell'acido **15** puro (resa 89%). $R_f = 0,73$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1). $^1\text{H NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) δ : 0,89 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz); 1,25-1,47 (m, 4H); 1,80-1,95 (m, 2H); 2,70 (bs, 1H); 3,64 (s, 2H); 4,58 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 7,10 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz); 7,31 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

N-Mirtanil-2-pentil-2,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carbossammide (16). Una miscela dell'acido **15** (0,30 g, 1,1 mmoli), *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC) (1,2 eq) e 1-idrossibenzotriazolo idrato (HOBt) (1,2 eq) in CH_2Cl_2 (7 mL) è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per un'ora. Alla miscela di reazione è stata quindi aggiunta goccia a goccia una soluzione di (-)-*cis*-mirtanilammina (**10**) (2 eq) in CH_2Cl_2 (7 mL). La soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 14 ore, quindi concentrata a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (Etere di petrolio/AcOEt 92:8) ottenendo 0,40 g del composto **16** (resa 88%). $R_f = 0,26$ (Etere di petrolio/AcOEt 94:6). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,89 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz); 0,95 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz); 1,09 (s, 3H); 1,23 (s, 3H); 1,28-1,40 (m, 4H); 1,84-2,07 (m, 8H); 2,26-2,45 (m, 2H); 3,44-3,49 (m, 2H); 3,57 (s, 2H); 4,53-4,65 (m, 2H); 5,84 (bs, 1H); 7,09 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 7,32 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

N-Mirtanil-6-bromo-2-pentil-2,4-diidro-tieno[3',2':4,5] ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carbossammide (17). Ad una soluzione del composto **16** (0,38 g, 0,9 mmoli) in acetonitrile anidro (9 mL), raffreddata a 0°C sotto atmosfera inerte, è stata aggiunta a piccole porzioni la *N*-bromosuccinimmide (0,20 g, 1,1 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto

agitazione a temperatura ambiente per una notte e quindi versata in una soluzione satura di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Il precipitato formatosi è stato filtrato e asciugato all'aria per ottenere 0,31 g del composto **17** puro (resa 69%). $R_f = 0,37$ (Etere di petrolio/AcOEt 9:1). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz); 0,95 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz); 1,09 (s, 3H); 1,22 (s, 3H); 1,26-1,40 (m, 4H); 1,83-2,08 (m, 8H); 2,26-2,35 (m, 1H); 2,36-2,45 (m, 1H); 3,42-3,48 (m, 2H); 3,55 (s, 2H); 4,52-4,64 (m, 2H); 5,79 (bs, 1H); 7,10 (s, 1H).

7.1.1.4 Sintesi di 1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-3-(1-osso-2-cicloesilet-1-il)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazolo (CB139S):

Etil α -(2-metil-6-osso-4H-5,6-diidrociclopenta[b]tiofen-5-il)- α -osso-acetato (23). 0,6 g di sodio metallico sono stati aggiunti in piccole porzioni a 15 mL di etanolo assoluto agitando fino a completa dissoluzione. Sono stati quindi aggiunti dietilossalato (1,92 g) e 40 mL di una soluzione di etanolo assoluto contenente 2,00 g di 2-metil-4H-5,6-diidrociclopenta[b]tiofen-6-one **22**. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 5 ore. La miscela è stata quindi versata in ghiaccio acidificato con HCl 1N. È stato recuperato un precipitato bianco che è stato filtrato, lavato ed asciugato all'aria. Sono stati ottenuti 2,32 g del composto **23**. Resa: 70 %. $R_f = 0,47$ (CHCl_3); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1725, 1680. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,41 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz); 2,63 (s, 3H); 3,81 (s, 2H); 4,39 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz); 6,84 (s, 1H); 12,80 (bs, 1H).

Etil 6-metil-1-(4'-metilbenzil)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclo-penta[1,2-c]pirazol-3-carbossilato (25). È stata preparata una miscela costituita da 1,0 g (3.95 mmoli) del composto **23** e da 4,55 mmoli del cloridrato di 1,2-diclorofenilidrazina **24** in acido acetico glaciale (8 mL). La miscela è stata riscaldata a riflusso per 8 ore, quindi è stata raffreddata a temperatura ambiente. È stato ottenuto un precipitato che è stato filtrato, lavato ed asciugato all'aria. È stato così ottenuto il composto etil 1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carbossilato **25**. Resa: 64%. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1725. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,43 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz); 2,52 (s, 3H); 3,66 (s, 2H); 4,46 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz); 6,83 (s, 1H); 7,40 (dd, 1H, $J = 2,2$ and 8,4 Hz); 7,54-7,61 (m, 2H).

N-metossi-N-metil-1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carbossiammide (26). Trimetilalluminio (0,92 mL di una soluzione 2 M solution in esano, 1,84 mmoli) è stato aggiunto goccia a goccia ad una sospensione del cloridrato di dimetilidrossilammina (0,18 g, 1,84 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) a

0°C. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 0 °C per 45 minuti e quindi a temperatura ambiente per 40 minuti. Alla soluzione ottenuta è stato aggiunto sotto agitazione il composto **25** (0,4 g, 0,92 mmoli), preventivamente solubilizzato in 2 mL di CH₂Cl₂. L'agitazione è stata mantenuta per 4 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi raffreddata a 0 °C, acidificata con HCl 10%, quindi estratta con CH₂Cl₂. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl, disidratate su solfato di sodio ed in fine filtrate. Il solvente è stato allontanato a pressione ridotta ottenendo un residuo grezzo che è stato purificato con cromatografia flash (etere di petrolio/acetato di 7:3) per ottenere il composto **26** come solido bianco. Resa 66%. $R_f = 0,39$ (etere di petrolio/etile acetato 6:4). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1686. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 2,51 (s, 3H); 3,53 (bs, 3H); 3,63 (s, 2H); 3,82 (s, 3H); 6,82 (s, 1H); 7,41 (dd, 1H, $J = 2,2$ e 8,6 Hz); 7,53 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,61 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz).

1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-3-(1-osso-2-cicloesilet-1-il)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazolo (CB139S). 3,86 mL di una soluzione 0,5 M di cicloesilmethylmagnesio bromuro **27** in THF sono stati aggiunti goccia a goccia a 0°C, in atmosfera di azoto, a 6 mL di una soluzione di THF contenente 0,29 g (0,64 mmoli) del composto **26**. La miscela di reazione è stata portata lentamente a temperatura ambiente e mantenuta sotto agitazione per 24 ore. La temperatura è stata quindi riportata a 0°C e alla miscela sono stati aggiunti goccia a goccia 15 mL di una soluzione acquosa satura di NH₄Cl. La temperatura è stata nuovamente riportata a temperatura ambiente e la miscela è stata diluita con acetato di etile (15 mL). La fase acquosa e quella organica sono state separate. La fase acquosa è stata estratta con acetato di etile (3x10 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua, disidratate su Na₂SO₄, filtrate. Dopo evaporazione del solvente è stato ottenuto un residuo grezzo che è stato purificato tramite cromatografia flash (etere di petrolio/dietiletere 9:1). È stato così ottenuto il composto **CB139S**. Resa: 46%. $R_f = 0,38$ (etere di petrolio/dietiletere 9:1). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1684. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,00-1,13 (m, 2H); 1,14-1,38 (m, 4H); 1,60-1,82 (m, 4H); 2,00-2,13 (m, 1H); 2,52 (s, 3H); 2,94 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz); 3,66 (s, 2H); 6,83 (s, 1H); 7,43 (dd, 1H, $J = 2,2$ and 8,6 Hz); 7,54 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,63 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz).

7.1.1.5 Sintesi di 1-(2',4'-diclorofenil)-6-metil-3-(1-idrossi-2-cicloesilet-1-il)-1,4-diidro-tieno[3',2':4,5]ciclopenta[1,2-c]pirazolo (CB140S):

Ad una sospensione del composto **CB139S** (60 mg, 0,12 mmoli) in metanolo (3 mL) è stato aggiunto sodio boroidruro (10 mg, 0,25 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per due ore, quindi è stata diluita con CHCl_3 e lavata con acqua. La fase organica è stata recuperata, disidratata su solfato di sodio, filtrata e concentrata a pressione ridotta ottenendo il composto **CB140S**. Resa: 95%. $R_f = 0,22$ (etere di petrolio/acetato di etile 8:2). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 3319. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,95-1,08 (m, 2H); 1,13-1,32 (m, 4H); 1,51-1,61 (m, 1H); 1,61-1,74 (m, 3H); 1,75-1,90 (m, 3H); 2,42 (bs, 1H); 2,51 (s, 3H); 3,42-3,55 (m, 2H); 4,93-5,02 (m, 1H); 6,79 (s, 1H); 7,37 (dd, 1H, $J = 2,2$ e 8,6 Hz); 7,48 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,58 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz).

7.1.2 SINTESI DELL'AGONISTA **CB₁ NESS10SM**

Acido 4-(3-Clorofenossi)butirrico (31).¹ 1 equivalente di NaOH in pellets è stato aggiunto a 3-clorofenolo 30 (1 eq, 23,31 mmoli). La miscela ottenuta è stata riscaldata a 170°C fino a completa dissoluzione della base. E' stato quindi aggiunto γ -butirrolattone (1,4 eq) goccia a goccia, mantenendo successivamente la miscela alla stessa temperatura per 5 ore. La reazione è stata bloccata in ghiaccio, provvedendo ad acidificare con HCl 6N. Si è quindi estratto con CHCl_3 e le fasi organiche riunite sono state disidratate su Na_2SO_4 e successivamente concentrate al rotavapor. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di petrolio/EtOAc 8:2) per dare l'acido 31 come solido giallo. Resa: 46,87%. $R_f = 0,15$ (etere di petrolio/EtOAc 8:2); m.p. 47 °C (51-53 °C);¹ IR 3223 (OH), 1709 (CO). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,11 (qu, 2H, $J = 6,8$ Hz); 2,58 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz); 4,0 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz); 6,76 (dd, 1H, $J_m = 1,0$ Hz, $J_o = 8,2$ Hz); 6,88 (s, 1H); 6,92 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 7,18 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz); 10,20 (br s, OH scamb. con D_2O).

8-Cloro-1-osso-2,3,4,5-tetraidrobencocicloeptan-5-one (32).¹ Una miscela dell'acido 4-(3-clorofenossi)butanoico 31 (27,96 mmoli) e acido polifosforico (48 g) è stata scaldata a 90 °C per 1,5 h. La miscela è stata quindi versata in ghiaccio ed estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica è stata lavata con una soluzione acquosa di Na_2CO_3 al 10%, disidratata su solfato di sodio e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash (etere di

petrolio/EtOAc 9:1) per dare il chetone **32** come olio arancione. Resa: 45,53%; b.p. 46-47 °C/27 mm Hg (107 °C/0,4 Torr).¹ ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,22 (qu, 2H, *J* = 6,4 Hz); 2,89 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz); 4,25 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz); 7,05-7,16 (m, 2H); 7,71 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz).

Etil γ-(7-cloro-5-osso-2,3,4,5-tetraidrobencocicloepten-2-il)-α-ossoacetato (33). 2,0 equivalenti di sodio metallico sono stati aggiunti in piccole porzioni a 5 mL di etanolo anidro. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione fino a completa reazione del sodio. E' stato quindi aggiunto etil-ossalato (1 eq) e, successivamente, una soluzione del chetone **32** (1 eq, 6,0 mmoli) in etanolo anidro (30 mL). La soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 1,5 ore e quindi versata goccia a goccia in ghiaccio per essere poi acidificata con HCl 2N. Si è successivamente estratto con EtOAc e le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua, anidificate su solfato di sodio e concentrate. Il residuo è stato purificato tramite cromatografia flash (etere di petrolio/EtOAc 8:2) per dare il composto **33** come olio arancione. Resa: 88,74%. *R_f* = 0,46 (etere di petrolio/EtOAc 8:2); m.p. 135°C; IR 1823 (CO), 1713 (CO), 1683 (CO). ¹H NMR (CDCl₃/DMSO) δ: 1,40 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz); 2,78-2,98 (m, 2H); 4,22-4,50 (m, 4H); 7,08 (s, 1H); 7,15 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz); 7,81 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 15,76 (br s, OH scamb. con D₂O).

Etil 8-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-diidrobenzo-1H-6-ossa-cicloepita[1,2-c]pirazol-3-carbossilato (34). Una miscela di dichetoestere **33** (1,0 eq, 13,68 mmoli) e del cloridato della 2,4-diclorofenilidrazina (1,1 eq) in EtOH (50 mL) è stata riscaldata a riflusso per 1.5 h. Dopo eliminazione del solvente, il residuo è stato purificato tramite cromatografia flash (etere di petrolio/EtOAc 9:1) per dare l'estere **34** come solido arancione. Resa: 47,48%. *R_f* = 0,32 (etere di petrolio/EtOAc 9:1); m.p. 135-136 °C; IR 1712 (CO). ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1,42 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz); 3,44 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz); 4,35-4,51 (m, 4H); 6,65 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz); 6,81 (dd, 1H, *J_m* = 2,2 Hz, *J_o* = 8,6 Hz); 7,14 (s, 1H); 7,39-7,44 (m, 2H); 7,49 (s, 1H).

Acido 8-Cloro-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-diidrobenzo-1H-6-ossa-cicloepita[1,2-c]pirazol-3-carbossilico (35). Una soluzione di idrossido di potassio (2 eq) in metanolo (7 mL) e qualche goccia di acqua sono state aggiunte ad una miscela dell'estere **34** (1,0 eq, 2 mmoli) in CH₃OH (10 mL). La soluzione risultante è stata riscaldata a riflusso per 12 h, quindi versata in ghiaccio e acidificata con HCl 1N. E' stato recuperato un precipitato che, una volta filtrato, è stato lavato con acqua ed asciugato all'aria. E' stato così ottenuto l'acido puro **35** come solido giallo. Resa: 91,23 %. *R_f* = 0,38 (CHCl₃/MeOH 9:1); m.p. 230-231 °C; IR 1689 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃/DMSO) δ: 3,10-3,45 (br s, 3H, 1 OH scamb. con D₂O); 4,30-4,48 (m, 2H); 6,67 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 6,83 (dd, 1H, *J_m* = 3,0 Hz, *J_o* = 8,2 Hz); 7,13 (s, 1H); 7,44-7,50 (m, 3H).

8-Cloro-1-(2,4-diclorofenil)-N-(6,6-dimetil-biciclo[3.1.1]ept-2-il-metil)-4,5-diidrobenzo-1H-6-ossa-cicloepita[1,2-c]pirazole-3-carbossiammide (37). Una miscela dell'acido 8-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-diidro-1H-6-ossa-cicloepita[1,2-c]pirazol-3-carbossilico **35** (1 eq, 0,64 mmoli), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimide (EDC) (1,2 eq) e 1-idrossibenzotriazolo (BtOH) (1,2 eq) in diclorometano (2 mL) è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. E' stata quindi aggiunta una soluzione di *cis*-mirtanilamina **36** (2 eq) in diclorometano (2 mL), continuando l'agitazione a temperature ambiente per altre due ore. Il solvente è stato eliminato al rotavapor ed il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (etere di petrolio/EtOAc 9:1) per ottenere il composto **37** come solido bianco. Resa: 25,47%. $R_f = 0,31$ (etere di petrolio/EtOAc 9:1); m.p. 142-143 °C; IR 3403 (NH), 1676 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,07 (s, 3H); 1,19 (s, 3H); 1,45-1,62 (m, 1H); 1,82-2,04 (m, 6H); 2,21-2,43 (m, 2H); 3,26-3,57 (m, 4H); 4,35-4,42 (m, 2H); 6,60 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 6,81 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 6,93 (t, 1H, NH, scamb. con D_2O); 7,14 (s, 1H); 7,31-7,39 (m, 2H); 7,54 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19,84 (CH_3); 23,22 (CH_3); 26,00 (CH_2); 27,08 (CH_2); 27,96 (CH_3); 33,26 (CH_2); 38,70 (C); 41,32 (CH); 41,50 (CH); 43,80 (CH); 44,57 (CH_2); 73,56 (CH_2); 120,03 (C x 2); 122,75 (CH); 123,44 (CH); 128,01 (CH); 128,33 (CH); 130,32 (CH); 130,67 (CH); 132,93 (C); 134,61 (C); 136,05 (C); 137,16 (C); 139,05 (C); 144,51 (C); 159,62 (C); 162,25 (CO).

7.2 NUOVI AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPIOIDI DELTA

7.2.1 Sintesi di 4-[bromo-(3'-metossifenil)metil]-N,N-dietil benzamide (10):

4-metil-3'-metossibenzofenone. Ad una sospensione di AlCl_3 (1,1 equivalenti) in CH_2Cl_2 (40 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di *m*-anisoilcloruro (12,0 g) e toluene (1 equivalente) in CH_2Cl_2 (10 mL). La soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore, quindi versata in 200 mL di una miscela di ghiaccio e HCl al 37% peso (1/1 v/v). La fase organica è stata separata da quella acquosa, anidrificata su solfato di sodio, filtrata ed evaporata per dare 4-metil-3'-metossibenzofenone. Resa: quantitativa. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1690 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,44 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 7,08-7,18 (m, 1H); 7,20-7,40 (m, 5H); 7,73 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

Acido 4-(3'-metossibenzoil)benzoico. 4,0 grammi di 4-metil-3'-metossibenzofenone sono stati solubilizzati in 40 mL di una miscela *t*-butanolo/acqua 1/1 (v/v). Alla soluzione sono stati aggiunti 6,44 grammi di permanganato di potassio. La miscela di reazione è stata scaldata a riflusso per 8 ore, quindi filtrata su celite e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato solubilizzato in una soluzione acquosa di NaOH 5% peso. La soluzione ottenuta è stata lavata con etere etilico e acidificata con una soluzione acquosa di HCl 37%. È stato ottenuto un precipitato di colore bianco corrispondente all'acido 4-(3'-metossibenzoil)benzoico. Il solido è stato filtrato e ricristallizzato da una soluzione metanolo/H₂O (1/1 v/v). Resa: 76 %. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1690 (C=O), 1715 (C=O), 3300 (OH). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3,57 (bs, 1H); 3,86 (s, 3H); 7,10-7,45 (m, 6H); 7,81 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

***N,N*-dietil-4-(3'-metossibenzoil)benzamide.** Una miscela di 0,23 grammi dell'acido 4-(3'-metossibenzoil)benzoico, 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (1,2 equivalenti) e 1-idrossi benzotriazolo idrato (1,2 equivalenti) in CH₂Cl₂ anidro (2 mL) è stata agitata a temperatura ambiente per 30 minuti. Alla miscela è stata quindi aggiunta goccia a goccia una soluzione di dietilammina (1,5 equivalenti) in CH₂Cl₂ anidro (8 mL). La miscela ottenuta è stata agitata a temperatura ambiente per 14 ore e quindi lavata con bicarbonato di sodio acquoso saturo, poi con acqua. Le fasi organiche riunite sono state anidificate su solfato di sodio, filtrate ed evaporate sotto vuoto. Il residuo ottenuto è stato purificato per cromatografia flash (etere di petrolio/acetato di etile 1/1) per dare *N,N*-dietil-4-(3'-metossibenzoil) benzamide. Resa: 98 %. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1690 (C=O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1,00-1,38 (m, 6H); 3,20-3,38 (m, 2H); 3,50-3,70 (m, 2H); 3,86 (s, 3H); 7,10-7,40 (m, 4H); 7,48 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,84 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

***N,N*-dietil-4-[idrossi-(3'-metossifenil)metil]benzamide.** A 5,16 grammi di *N,N*-dietil-4-(3'-metossibenzoil)benzamide solubilizzati in 56 mL di Etanolo/H₂O 3/1 è stato aggiunto lentamente NaBH₄ (6 equivalenti). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore, quindi concentrata sotto vuoto e acidificata con acido acetico fino a pH, ottenendo di una dispersione di *N,N*-dietil-4-[idrossi-(3'-metossifenil)metil]benzamide. La dispersione è stata filtrata e il solido ottenuto è stato essiccato all'aria ottenendo il composto *N,N*-dietil-4-[idrossi-(3'-metossifenil)metil]benzamide. Resa: quantitativa. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1680 (C=O), 3300 (OH). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1,00-1,35 (m, 6H); 2,39 (s, 1H); 3,10-3,18 (m, 2H); 3,20-3,30 (m, 2H); 3,79 (s, 3H); 5,82 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz); 6,75-7,00 (m, 3H); 7,24 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz); 7,25-7,38 (m, 1H); 7,41 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz).

4-[bromo-(3'-metossifenil)metil]-*N,N*-dietilbenzamide (10). 5,08 grammi di *N,N*-dietil-4-[idrossi-(3'-metossifenil) metil]benzamide sono stati solubilizzati in 18 mL di cloroformio. Alla soluzione è stato aggiunto HBr (135 equivalenti). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 14 ore, quindi diluita con acqua ed estratta con cloroformio (50 mL per 3 volte). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate su solfato di sodio, filtrate ed evaporate ottenendo 4-[bromo-(3'-metossifenil)metil]-*N,N*-dietilbenzamide. Resa: 95 %. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1680 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,00-1,78 (m, 6H); 3,08-3,38 (m, 2H); 3,40-3,60 (m, 2H); 3,80 (s, 3H); 6,09 (s, 1H); 6,80-7,00 (m, 4H); 7,35 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,44 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

7.2.2 Sintesi di 4-[(3-Alil-3,6-diazabicyclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-dietilbenzamide (101 DBE):

3-Benzil-3,6-diazabicyclo[3.1.1]eptano (9). Il composto **9** è stato preparato seguendo la metodica riportata in letteratura.² $R_f = 0,18$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1); b.p. 155°C/0,1 mmHg; IR(film, cm^{-1}) ν : 1600, 3250; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,80 (br s, 1H); 1,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 2,40-2,53 (m, 1H); 2,65 (d, 2H, $J = 11,0$ Hz); 3,07 (d, 2H, $J = 11,0$ Hz); 3,50-3,65 (m, 2H); 3,72 (s, 2H); 7,25-7,40 (m, 5H).

14-[(3-Benzil-3,6-diazabicyclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil) metil]-*N,N*-dietil benzamide (11). Una miscela di ammina **9** (0,50 g, 2,66 mmoli), bromuro benzidrilico (1,2 eq) e carbonato di potassio (3,75 eq), sotto atmosfera inerte in acetonitrile (11 mL), è stata agitata alla temperatura di riflusso per 24 h, quindi riportata a temperatura ambiente e concentrata. Il residuo è stato purificato per cromatografia flash eluendo con AcOEt per ottenere 0,91 g (resa 71%) di un olio chiaro. $R_f = 0,23$ (AcOEt); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1640 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,03-1,26 (m, 6H); 1,96 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz); 2,35-2,47 (m, 1H); 2,66-2,75 (m, 2H); 2,95-3,08 (m, 2H); 3,13-3,30 (m, 2H); 3,37-3,60 (m, 4H); 3,77 (s, 3H); 3,84 (s, 2H); 4,43 (s, 1H); 6,66-6,70 (m, 1H); 6,91-6,97 (m, 2H); 7,11-7,17 (m, 1H); 7,22 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,31-7,45 (m, 7H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 14,2; 21,0; 28,2; 53,4; 55,2; 58,0; 58,1; 59,3; 111,9; 113,4; 120,0; 126,5; 127,6; 128,3; 129,3; 135,6; 159,6; 171,3.

4-[(3,6-Diazabicyclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-dietilbenzamide (12). Una miscela di **9** (0,89 g, 1,84 mmoli) e Pd/C 10% (90 mg) in etanolo (26 mL) è stata agitata sotto 3 atm di idrogeno alla temperatura di 60°C per una notte. Il catalizzatore è stato filtrato su

celite e lavato con etanolo. La soluzione è stata concentrata per ottenere 0,64 g (resa 89%) di un solido bianco. $R_f = 0,44$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1641 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,04-1,26 (m, 6H); 1,80 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz); 2,10-2,52 (m, 1H); 2,60-2,75 (m, 3H); 3,18-3,62 (m, 8H); 3,79 (s, 3H); 5,06 (s, 1H); 6,70-6,75 (m, 1H); 7,07-7,22 (m, 3H); 7,27 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz); 7,56 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz).

4-[(3-Allil-3,6-diazabicyclo[3.1.1]ept-6-il)-(3-metossifenil) metil]-N,N-dietil benzamide (101 DBE). Una miscela dell'ammina **12** (0,64 g, 1,63 mmoli), di bromuro di allile (0,21 mL, 2,45 mmol) e di carbonato di potassio (0,45 g, 3,26 mmoli) in acetone (11 mL) è stata agitata alla temperatura di riflusso per una notte e quindi concentrata. Il residuo è stato purificato per cromatografia flash eluendo con AcOEt per ottenere 0,32 g (resa 45%) di un solido bianco. $R_f = 0,33$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1644 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,02-1,27 (m, 6H); 1,91 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz); 2,41-2,50 (m, 1H); 2,69-2,78 (m, 2H); 2,86-2,97 (m, 2H); 3,16-3,30 (m, 2H); 3,31 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz); 3,38-3,61 (m, 4H); 3,79 (s, 3H); 4,82 (s, 1H); 5,17-5,31 (m, 2H); 5,94-6,05 (m, 1H); 6,69-6,74 (m, 1H); 7,06-7,11 (m, 2H); 7,16-7,22 (m, 1H); 7,26 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,52 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz).

7.2.3 Sintesi del composto 4-[(9-allil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil) metil]-N,N-dietilbenzamide (128OP):

9-benzil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonano (18a). Il composto è stato sintetizzato in accordo con la procedura descritta da Audouze K. et al. a partire dal composto commerciale benziltropinone **16a**.³ 15 grammi di benziltropinone sono stati aggiunti a 150 mL di cloroformio a -5°C . Alla soluzione sono stati aggiunti goccia a goccia 35 mL di H_2SO_4 conc. facendo in modo che la temperatura non superasse i 5°C . Dopo l'aggiunta di 9,06 g di sodio azide, la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 14 ore, quindi a 60°C per due ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, alla miscela di reazione è stata aggiunta lentamente acqua a 4°C (120 mL) e, successivamente, una soluzione di NaOH fino a neutralità, mantenendo poi in agitazione per 14 ore a temperatura ambiente. Sono stati quindi aggiunti 40 mL di una soluzione di NaOH 4M, estraendo successivamente con cloruro di metilene (3 x 80 mL). Le fasi organiche riunite sono state disidratate su Na_2SO_4 . Dopo filtrazione è stato allontanato il solvente ottenendo il composto 9-benzil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nona-4-one **17a**. 11,8 grammi di quest'ultimo sono stati dissolti in 250 mL

di THF contenenti 4,08 g di LiAlH₄ mantenuti a 20°C. La miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 12 ore a temperatura ambiente, quindi è stata aggiunta acqua lentamente (15 mL). La miscela è stata estratta con dietil etere (2 x 50 mL) ottenendo il composto 9-benzil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonano come olio. Resa: 88%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,12 (1H, m); 1,41 (1H, m); 1,65 (2H, m); 2,00 (2H, m); 2,46 (1H, m); 2,68 (2H, m); 2,93 (1H, m); 3,11 (1H, m); 3,20 (1H, m); 3,55 (2H, m); 7,07 (1H, m); 7,16 (2H, m); 7,24 (2H, m).

4-[(9-benzil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (19a). E' stata ripetuta la stessa procedura riportata per la preparazione del composto **11**, ma utilizzando il composto **18a** al posto di 9-benzil-9,10-diazatriciclo[4.2.1.1^{2,5}]decano **9**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(9-benzil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 50%. *R_f* = 0,33 (CHCl₃/MeOH 9,8:0,2); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1645 (C=O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,00-1,42 (m,6H); 1,43-1,49 (m,1H); 1,64-1,82 (m,2H); 1,87-2,06 (m,2H); 2,13-2,38 (m,2H); 2,45-2,65 (m,2H); 2,70-2,85 (m,1H); 3,05-3,14 (m,1H); 3,17-3,37 (m,3H); 3,44-3,60 (m,2H); 3,74 (bs,2H); 3,77 (s,3H); 4,40 (s,1H); 6,67-6,76 (m,1H); 6,92-6,99 (m,1H); 7,00-7,09 (m,1H); 7,12-7,22 (m,2H); 7,23-7,32 (m,4H); 7,33-7,43 (m,3H); 7,47 (d,1H, *J* = 8,1Hz).

4-[(3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (20a). E' stata ripetuta la procedura per l'ottenimento del composto **12**, ma utilizzando il composto **19a** al posto del composto **11**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 41%. *R_f* = 0,38 (CHCl₃/MeOH 9:1); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1641 (C=O), 3133 (NH). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,01-1,31 (m,6H); 1,47-1,60 (m,1H); 1,82-2,25 (m,4H); 2,33-2,61 (m,2H); 2,63-2,92 (m,4H); 3,14-3,28 (m,2H); 3,30-3,40 (m,1H); 3,42-3,62 (m,3H); 3,76 (s,3H); 4,42-4,50 (m,1H); 6,68-6,74 (m,1H); 6,91-7,03 (m,2H); 7,13-7,21 (m,1H); 7,25-7,29 (m,2H); 7,35-7,49 (m,2H).

4-[(9-allil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (128OP). E' stata ripetuta la procedura adottata per la sintesi del composto **1 (101DBE)**, ma utilizzando il composto **20a** invece del composto **12**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(9-allil-3,9-diazabicyclo[4.2.1]nonan-3-il)(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 20%. *R_f* = 0,32 (CHCl₃/MeOH 9,5:0,5). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1643 (C=O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,03-1,26 (m,6H); 1,40-1,51 (m,1H); 1,70-1,91 (m,2H); 1,92-2,02 (m,2H); 2,21-2,40 (m,2H); 2,47-2,60 (m,2H); 2,72-2,85 (m,1H); 3,17-3,32 (m,5H); 3,39-3,56 (m,3H); 3,77 (s,3H); 4,40 (s,1H); 5,06-5,22 (m,2H); 5,87-6,02 (m,1H); 6,68-6,74 (m,1H); 6,92-

6,96 (m,1H); 6,98-7,05 (m,1H); 7,14-7,21 (m,1H); 7,26-7,29 (m,2H); 7,37-7,41 (m,1H); 7,42-7,48 (m,1H).

7.2.4 Sintesi del composto 4-[(10-allil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (10oDBN):

9-benzil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (16b). Ad una soluzione di pentadiene (84,5 g) e di benzilamina idrocloruro (36,3 g) in acqua (400 mL) raffreddata a 0°C sono stati aggiunti 30,8 grammi di acido 1,3-acetondicarbossilico e, successivamente, 70 mL di una soluzione acquosa di acetato di sodio al 10%. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per un'ora, quindi è stata riscaldata per 4 ore a 50°C. Successivamente la miscela è stata acidificata fino a pH 2 con una soluzione acquosa di HCl al 10%, quindi lavata con dietil etere. Attraverso l'aggiunta di una soluzione di bicarbonato di sodio, il pH è stato riportato a 6, quindi si è estratto con diclorometano. Gli estratti organici riuniti sono stati anidrificati su solfato di sodio, il solvente è stato evaporato per ottenere 38,5 grammi del composto 9-benzil-9-azabicyclo[3.3.1] nonan-3-one come solido leggermente colorato. Resa 78%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,49-1,59 (m, 6H); 2,26 (d, 2H, *J* = 19 Hz); 2,76 (dd, 2H, *J* = 8 e 19 Hz); 3,28-3,49 (bs, 2H); 3,91 (s, 2H); 7,22-7,46 (m, 5H).

10-Benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1] decan-4-one (17b). Ad una soluzione di 9-benzil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one **16b** (0,5 g) in cloroformio (4,4 mL), raffreddata a -5°C, è stato aggiunto goccia a goccia 1 mL di H₂SO₄ conc., mantenendo la temperatura al di sotto di 15°C. E' stato quindi aggiunto NaN₃ (0,28 g) lentamente, con piccole aggiunte, evitando di superare i 35°C nella miscela di reazione. La miscela di reazione è stata scaldata a riflusso per 2 ore ed è stata successivamente versata in un contenitore contenente circa 200 mL di ghiaccio. Si è aggiunto K₂CO₃ solido fino a pH fortemente alcalino con formazione di un'emulsione. All'emulsione sono stati aggiunti 25 mL di una soluzione acquosa di KOH al 60%. Dopo 10 minuti di agitazione, i sali inorganici sono stati filtrati e la miscela di reazione è stata estratta con cloroformio. La fase organica è stata anidrificata su solfato di sodio ed il solvente evaporato. Sono stati ottenuti 0,50 g di 10-benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decan-4-one **17b** come un solido chiaro. Resa: 95%. *R_f* = 0,42 (CHCl₃-MeOH 97:3). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,43-1,70 (m,3H); 1,90-2,23 (m,3H); 2,37-2,53 (m,1H); 2,80-3,15 (m,4H); 3,75 (dt,1H, *J* = 3,8 e 15Hz); 3,93 (s,2H); 5,82 (bs,1H); 7,20-7,40 (m,5H).

10-Benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1] decano (18b). In una sospensione di LiAlH_4 (0,19 g) in THF anidro (9 mL), raffreddata a 0°C , tenuta in atmosfera inerte di argon, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione ottenuta sciogliendo 0,50 g di 10-benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decan-4-one **17b** in THF (4 mL). La miscela è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 14 ore, per essere poi raffreddata a 0°C . Sono stati quindi aggiunti cautamente circa 0,9 mL di H_2O lasciando sotto agitazione per 10 minuti. E' stato ottenuto un precipitato che è stato filtrato sotto vuoto e lavato con diclorometano. Il filtrato è stato recuperato ed evaporato, ottenendo un olio che è stato disciolto in diclorometano. La soluzione organica è stata anidrificata con solfato di sodio ed il solvente evaporato. Sono stati recuperati 0,47 g del composto 10-benzil-3,10-diazabicyclo [4.3.1]decano **18b**. Resa: quantitativa. $R_f = 0,62$ (CH_2Cl_2 -MeOH 8:2). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 1,17-2,18 (m,8H); 2,62 (bs,1H); 2,76-2,92 (m,2H); 2,99-3,18 (m,4H); 3,97 (s,2H); 7,20-7,42 (m,5H).

4-[(10-benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (19b). E' stata ripetuta la stessa procedura riportata per la preparazione del composto **11**, ma utilizzando il composto **18b** al posto di 9-benzil-9,10-diazatriciclo [4.2.1.1^{2,5}]decano **9**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(10-benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide **19b**. Resa: 28%. $R_f = 0,25$ (CH_2Cl_2 -Acetone 9:1). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1641 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,00-1,46 (m,8H); 1,54-2,05 (m,6H); 2,33-2,46 (m,1H); 2,48-2,96 (m,4H); 3,05-3,62 (m,5H); 3,76 (s,3H); 3,96 (s,2H); 4,41 (s,1H); 6,63-6,76 (m,1H); 6,91-7,43 (m,10H); 7,49 (d,2H, $J = 7,6\text{Hz}$).

4-[(3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (20b). E' stata ripetuta la procedura per l'ottenimento del composto **12**, ma utilizzando il composto **19b** al posto del composto preparato **11**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide **20b**. Resa: 35%. $R_f = 0,30$ (CHCl_3 -MeOH 9:1). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1639 (C=O), 3130 (NH). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,00-1,32 (m,8H); 1,42-2,35 (m,7H); 2,47-2,64 (m,1H); 2,72-3,06 (m,4H); 3,12-3,32 (m,2H); 3,40-3,62 (m,3H); 3,76 (s,3H); 4,50 (s,1H); 6,68-6,78 (m,1H); 6,90-7,07 (m,2H); 7,14-7,24 (m,1H); 7,26-7,34 (m,2H); 7,35-7,52 (m,2H).

4-[(10-allil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (100oDBN). E' stata ripetuta la procedura adottata per la sintesi del composto **1 (101DBE)**, ma utilizzando il composto **20b** invece del composto **12**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(10-allil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]dec-3-il)-(3-

metossifenil)metil]-N,N-dietil-benzamide. Resa: 50%. $R_f = 0,27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9,5:0,5). IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1655 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,00-1,48 (m,7H); 1,51-1,72 (m,3H); 1,72-1,95 (m,3H); 1,95-2,14 (m,2H); 2,41-2,92 (m,4H); 3,14-3,38 (m,3H); 3,38-3,65 (m,4H); 3,78 (s,3H); 4,42 (bs,1H); 5,04-5,30 (m,2H); 5,80-6,05 (m,1H); 6,66-6,79 (m,1H); 6,94-7,10 (m,2H); 7,13-7,24 (m,1H); 7,25-7,35 (m,2H); 7,39-7,58 (m,2H).

7.2.5 Sintesi del composto 4-[(3-allil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil) metil]-N,N-dietilbenzamide (238DBO):

3-Benzil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ottano (26a). Il composto **26a** è stato preparato seguendo la metodica riportata in letteratura.⁴ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,65-1,97 (m, 4H); 2,2 (d, 2H, $J = 12$ Hz); 6,45 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz); 3,42 (m, 2H); 3,46 (s, 2H); 7,18-7,38 (m, 5H).

4-[(3-benzil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil) metil]-N,N-dietilbenzamide (27a). E' stata ripetuta la stessa procedura riportata per la preparazione del composto **11**, ma utilizzando il composto **26a** al posto di 9-benzil-9,10-diazatriciclo [4.2.1.1^{2,5}]decano **9**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3-benzil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 66%. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1644 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,05-2,12 (m, 12H), 2,66-2,86 (m, 2H); 2,95-3,22 (m, 6H); 3,78 (s, 3H); 3,99 (s, 2H); 4,33 (s, 1H); 6,74-6,89 (m, 1H); 7,09-7,49 (m, 10H); 7,56 (d, 2H, $J = 7,8\text{Hz}$).

4-[(3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide (28a). E' stata ripetuta la procedura per l'ottenimento del composto **12**, ma utilizzando il composto **27a** al posto del composto preparato **11**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 96%; IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1641 (C=O), 3220 (NH). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,12-2,11 (m, 12H); 2,69-2,82 (m, 2H); 2,95 (bs, 1H); 2,98-3,24 (m, 6H); 3,79 (s, 3H); 4,35 (s, 1H); 6,72-6,91 (m, 1H); 7,05-7,48 (m, 5H); 7,60 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz).

4-[(3-allil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil) metil]-N,N-dietilbenzamide (238DBO). E' stata ripetuta la procedura adottata per la sintesi del composto **1 (101DBE)**, ma utilizzando il composto **28a** invece del composto **12**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3-allil-3,8-diazabicyclo[3.2.1]ott-8-il)-(3-metossifenil)metil]-N,N-dietilbenzamide. Resa: 89%. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1643 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,10-

2,20 (m, 12H); 2,66-2,80 (m, 2H); 2,96-3,22 (m, 8H); 3,79 (s, 3H); 4,34 (s, 1H); 4,98-5,21 (m, 2H); 5,75-5,99 (m, 1H); 6,70-6,90 (m, 1H); 7,03-7,47 (m, 5H); 7,58 (d, 2H, $J = 8,0\text{Hz}$).

7.2.6 Sintesi del composto 4-[(3-Allil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethylbenzamide (300DBN):

3-Benzil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonano (26b). Il composto **26b** è stato preparato seguendo la metodica riportata in letteratura.⁵ $R_f = 0,27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1); b.p. 170-178°C/0,8 mmHg; IR (film, cm^{-1}) ν : 3340 (NH); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,56-1,95 (m, 6H); 2,25-2,43 (m, 2H); 2,75-2,95 (m, 3H); 2,97-3,08 (br s, 2H); 3,37 (s, 2H); 7,20-7,40 (m, 5H).

4-[(3-Benzil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethylbenzamide (27b). E' stata ripetuta la stessa procedura riportata per la preparazione del composto **11**, ma utilizzando il composto **27a** al posto di 9-benzil-9,10-diazabicyclo[4.2.1.1^{2,5}]decano **9**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto **27b** come olio chiaro. Resa: 82%. $R_f = 0,44$ (etere di petrolio/AcOEt 7:3); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1642 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,05-1,30 (m, 6H); 1,35-1,42 (m, 2H); 1,55-1,70 (m, 1H); 1,90-2,10 (m, 2H); 2,50-2,58 (m, 2H); 2,65-2,70 (m, 2H); 2,75-2,95 (m, 3H); 3,18-3,35 (m, 2H); 3,43 (s, 2H); 3,45-3,65 (m, 2H); 3,81 (s, 3H); 5,15 (s, 1H); 6,72-6,74 (m, 1H); 7,07-7,13 (m, 2H); 7,18 (d, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$); 7,21-7,37 (m, 7H); 7,53 (d, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 20,6; 25,5; 48,9; 55,2; 56,7; 63,9; 68,1; 112,0; 113,4; 120,2; 126,7; 127,7; 128,7; 129,5; 135,7; 139,3; 144,7; 144,9; 159,8.

4-[(3,9-Diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethylbenzamide (28b). E' stata ripetuta la procedura per l'ottenimento del composto **12**, ma utilizzando il composto **27b** al posto del composto preparato **11**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto **28b** come solido bianco. Resa: 73%. $R_f = 0,38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1640 (C=O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,05-1,32 (m, 7H); 1,40-1,50 (m, 2H); 1,70-1,80 (m, 1H); 1,95-2,15 (m, 3H); 2,30-2,50 (m, 2H); 2,70-2,80 (m, 2H); 2,90-3,00 (m, 2H); 3,15-3,40 (m, 4H); 3,45-3,60 (m, 2H); 3,78 (s, 3H); 5,13 (s, 1H); 6,70-6,75 (m, 1H); 7,05-7,10 (m, 2H); 7,16-7,21 (m, 1H); 7,28 (d, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$); 7,50 (d, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 20,3; 23,4; 24,0; 26,4; 29,7; 46,5; 47,3; 48,2; 55,2; 68,5; 112,4; 113,3; 120,0; 125,0; 126,9; 127,6; 129,7; 136,1; 143,9; 144,1; 145,0; 159,9; 171,1.

4-[(3-Allil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethylbenzamide (300DBN). E' stata ripetuta la procedura adottata per la sintesi del composto **1 (101DBE)**, ma utilizzando il composto **28b** invece del composto **12**. Al termine della sintesi è stato ottenuto il composto 4-[(3-Allil-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-il)-(3-metossifenil)metil]-*N,N*-diethyl-benzamide (**300DBN**) come olio incolore. Resa: 67%. $R_f = 0,34$ (etere di petrolio/AcOEt 1:1); IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1644 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,03-1,25 (m, 6H); 1,32-1,40 (m, 2H); 1,51-1,60 (m, 1H); 1,87-2,04 (m, 2H); 2,42-2,48 (m, 2H); 2,62-2,79 (m, 5H); 2,86 (d, 2H, $J = 6,3$ Hz); 3,17-3,29 (m, 2H); 3,42-3,60 (m, 2H); 3,78 (s, 3H); 5,05-5,20 (m, 3H); 5,76-5,88 (m, 1H); 6,68-6,73 (m, 1H); 7,04-7,08 (m, 2H); 7,13-7,19 (m, 1H); 7,25 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz); 7,49 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 12,9; 14,2; 20,5; 25,6; 39,1; 43,3; 49,0; 55,2; 56,7; 62,3; 68,1; 112,1; 113,4; 116,5; 120,2; 126,7; 127,7; 129,4; 135,7; 136,4; 144,7; 145,0; 159,8; 171,3.

7.3 NESS002ie: UN NUOVO TIOLO FLUORURATO INIBITORE DELLE ENDOPEPTIDASI

7.3.1 Sintesi dell'Acido 3-(4-idrossi-fenil)-2-(4,4,4-trifluoro-3-mercapto-butirilamino)-propionico (NESS002ie):

Per la sintesi dell'Acido 3-(4-idrossi-fenil)-2-(4,4,4-trifluoro-3-mercapto-butirilamino)-propionico (**NESS002ie**) è stata ripetuta la procedura descritta da Olimpieri *et al.*⁶

Acido 4,4,4-trifluorobut-2-enoico (2). Il composto è stato sintetizzato a partire dal composto commerciale (Sigma Aldrich) etil 4,4,4-trifluoro-3-ossobutanoato **1**, secondo il metodo descritto da Jagodzinska *et al.*⁷ In particolare, il β -chetoestere è stato ridotto tramite NaBH_4 in soluzione di toluene al corrispondente carbinolo. Quest'ultimo è stato trasformato nell'estere etilico del composto **2** per trattamento a caldo con P_2O_5 e successiva distillazione. Infine, l'idrolisi dell'estere ha permesso l'ottenimento del composto **2**.

Metil 2-(4,4,4-trifluorobut-2-enamido)-3-(4-metossifenil) propanoato (3). (c) 1 equivalente dell'acido **2** è stato disperso in 2,5 equivalenti di ftaloil dicloruro e la miscela risultante è stata riscaldata a riflusso a 180°C . La distillazione della miscela ha dato il fluorocrotonoil cloruro dell'acido **2** che è stato utilizzato direttamente senza ulteriori purificazioni nello stadio successivo della reazione. (d) E' stata preparata una soluzione in

diclorometano anidro del cloridrato di H-*tert*-BuO-Tyr-OMe (1,1 eq) e di 2,4,6-trimetilpiridina (2,0 eq). La soluzione è stata aggiunta goccia a goccia a 0°C in atmosfera di azoto ad una soluzione 0,25 M del fluorocrotonoil cloruro dell'acido **2**. La miscela così ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a 0°C per 15 minuti, quindi a temperatura ambiente per 3 ore. Successivamente è stata aggiunta una soluzione acquosa satura di NH₄Cl e si è estratto con diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state lavate con HCl 1M e con una soluzione satura di NaCl, quindi disidratate su Na₂SO₄ ed infine concentrate. Il residuo è stato purificato tramite cromatografia flash ottenendo il composto **3**.

Metil 2-(4,4,4-trifluoro-3-(acetiltio)butanamido)-3-(4-metossifenil)propanoato (4). 2,0 equivalenti di trietilamina e 2,4 equivalenti di acido tioacetico sono stati aggiunti a 0°C in atmosfera di azoto ad una soluzione 0,25 M in etanolo dell'accettore di Michael **3**. La miscela è stata quindi riscaldata a riflusso per 14 ore. Il solvente è stato successivamente rimosso al rotavapor, il residuo ottenuto è stato ripreso con acqua ed estratto con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state disidratate su solfato di sodio, quindi concentrate e purificate tramite cromatografia flash per ottenere il composto **4**.

Acido 3-(4-idrossi-fenil)-2-(4,4,4-trifluoro-3-mercapto-butirilamino)-propionico (NESS002ie). 6 equivalenti di una soluzione acquosa 2M di NaOH preventivamente degasata sono stati aggiunti a 0°C in atmosfera di azoto ad una soluzione metanolica degasata 0,1M del composto **4**. La miscela così ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a 0°C per 10 minuti, quindi a temperatura ambiente per un'ora. Il metanolo è stato allontanato a pressione ridotta, ed è stata successivamente aggiunta una soluzione acquosa al 5% di NaHCO₃. La miscela è stata quindi estratta con AcOEt. La fase acquosa è stata acidificata a pH 2 con una soluzione 1N di HCl e quindi estratta con AcOEt. La fase organica raccolta è stata lavata con acqua e con una soluzione satura di NaCl, quindi disidratata su Na₂SO₄ e concentrata per ottenere il composto **NESS002ie**. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7,06 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz); 7,02 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz); 6,69 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz); 6,68 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz); 4,64 (m, 2H); 3,76 (m, 2H); 3,11 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz); 3,08 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz); 2,87 (m, 2H); 2,77 (m, 2H); 2,45 (dd, 1H, *J* = 14,8 and 10,0 Hz); 2,46 (dd, 1H, *J* = 12,4 and 10,0 Hz). ¹⁹F-NMR (235,3 MHz, CD₃OD) δ: -70,06 (d, *J* = 4,2 Hz); -72,02 (d, *J* = 3,4 Hz). ESI (*m/z*) 360,0 [M⁺+Na, (100)], 338,1 [M⁺+1, (25)].

7.3.2 Sintesi di *N*-(3-mercapto-5-metil-1-ossoesil)-*L*-fenilalanina (C20):

E' stata ripetuta la procedura descritta da Gomez-Monterrey et al.⁸

Etil 5-metil-2-esanoato (6). 1 equivalente di NaH è stato aggiunto sotto agitazione a 0°C ad una soluzione di trietil fosfonoacetato **5** in 1,2-dimetossietano anidro. Dopo 15 minuti di agitazione, alla miscela è stata aggiunta l'aldeide 3-metilbutanale (3 eq). La reazione è stata riscaldata a riflusso per 3 ore, quindi il solvente è stato eliminato per ottenere un residuo grezzo che è stato successivamente dissolto in esano. La fase organica è stata lavata con acqua e con una soluzione satura di NaCl, quindi disidratata su Na₂SO₄. Il solvente è stato evaporato ed il residuo, ripreso in esano, è stato purificato tramite cromatografia flash (EtOAc/Esano 1:9) per ottenere il composto etil 5-metil-2-esanoato come olio incolore. Resa: 85%.

Acido 3-(acetiltio)-5-metil esanoico (7). Ad una soluzione etanolica contenente 1 equivalente dell'estere α,β -insaturo **6** è stata aggiunta una soluzione di NaOH 1 N (2 eq). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso per 14 ore. L'etanolo è stato evaporato e la fase acquosa rimasta è stata diluita con acqua, acidificata a pH 3 con HCl 1N, quindi estratta con EtOAc. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate su solfato di sodio. Il solvente è stato eliminato al rotavapor ed il residuo è stato dissolto in 10 equivalenti di acido tioacetico. La miscela di reazione è stata mantenuta a riflusso per 36 ore, quindi evaporata al rotavapor per ottenere un residuo che è stato purificato per cromatografia flash (EtOAc/esano 1:1) per dare l'acido **7** come olio incolore. Resa: 50%.

***N*-(3-mercapto-5-metil-1-ossoesil)-*L*-fenilalanina (C20).** 1 equivalente dell'acido **7** è stato solubilizzato in THF anidro a 0°C. Alla soluzione sono stati aggiunti HOBt (1 eq), DCC (1,1 eq), metil 2-amino-3-fenilpropanoato (1 eq) e trietilamina (1 eq). La miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 30 minuti a 0°C, quindi a temperatura ambiente per 14 ore. Dopo filtrazione della dicitcloesilurea e l'evaporazione del solvente, è stato ottenuto un residuo che è stato dissolto in EtOAc. La fase organica è stata lavata in sequenza con: acqua, soluzione 10% di acido citrico, soluzione 10% di NaHCO₃, acqua, soluzione satura di NaCl. Dopo disidratazione per passaggio su Na₂SO₄, il solvente è stato evaporato al rotavapor ottenendo l'estere metilico dell'addotto di coupling. Ad una soluzione metanolica degasata dell'estere metilico ottenuto nello step precedente (1 eq), a 0°C e tenuta in atmosfera di argon, è stata aggiunta una soluzione 1N di NaOH (3 eq). La miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 15 minuti a 0°C, quindi per 6 ore a temperatura ambiente. Il solvente è stato evaporato ed il residuo dissolto in acqua. La soluzione acquosa è stata lavata con EtOAc, acidificata a pH 3 con HCl 1N, quindi estratta con EtOAc. La fase organica è stata lavata con acqua e con una

soluzione satura di NaCl. Infine è stata anidrificata su Na₂SO₄ ed evaporata per ottenere il composto *N*-(3-mercapto-5-metil-1-ossoesil)-L-fenilalanina (**C20**) puro. M.p. 145-146°C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) in accordo con lo spettro riportato in letteratura.⁸

7.4 AGONISTI DEI RECETTORI DEGLI OPIOIDI CON ATTIVITA' ANALGESICA

I composti 10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (**NESS50oDBN**) e (*E*)-10-[3'-(3,4-diclorofenil)but-2-en-1-il]-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (**NESS51oDBN**) sono stati sintetizzati secondo le procedure descritte nella domanda di brevetto US2010/0029622.⁹

7.4.1 Sintesi del composto 10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (**NESS50ODBN**):

9-benzil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (4). Il composto è stato sintetizzato in accordo con quanto riportato per il composto **16b** al paragrafo 7.2.4.

10-Benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1] decan-4-one (5). Il composto è stato sintetizzato in accordo con quanto riportato per il composto **17b** al paragrafo 7.2.4.

10-Benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1] decano (6). Il composto è stato sintetizzato in accordo con quanto riportato per il composto **18b** al paragrafo 7.2.4.

10-benzil-3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano (7). Ad una soluzione di 10-benzil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano **6** (0,63 g) in diclorometano anidro (18 mL), raffreddata a 0°C, è stata aggiunta anidride propionica (1,27 mL) disciolta in diclorometano anidro (5 mL). La miscela è stata scaldata a riflusso per un'ora, quindi riportata a temperatura ambiente, alcalinizzata con una soluzione acquosa di NaOH al 40% e lasciata in agitazione per 16 ore. La miscela è stata quindi estratta con diclorometano. La fase organica è stata separata, anidrificata su solfato di sodio ed evaporata. Sono stati ottenuti 0,73 g del composto 10-Benzil-3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano **7** sotto forma di un olio giallo chiaro. Resa: 94%. *R*_f = 0,55 (AcOEt/etere di petrolio 6:4). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,05-1,30 (m, 3H); 1,38-2,13 (m, 8H); 2,20-2,46 (m, 2H); 2,82-3,18 (m, 2H); 3,38-3,65 (m, 3H); 3,72-4,00 (m, 3H); 7,15-7,40 (m, 5H).

3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano (8). Una soluzione di 10-benzil-3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1] decano **7** (2,40 g) in EtOH (39 mL) è stata idrogenata a 45 psi e a temperatura ambiente per 19 ore in presenza di Pd/C 10% (0,89 g). La miscela è stata quindi filtrata su celite ed il catalizzatore lavato con EtOH. La soluzione è stata concentrata per ottenere 1,60 g di un olio chiaro corrispondente al composto 3-Propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano **8**. Resa: 97%. $R_f = 0,15$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,16 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz); 1,35-2,09 (m, 8H); 2,38 (q, 2H, $J = 7,4$ Hz); 2,68-2,83 (m, 2H); 3,06-3,96 (m, 5H).

10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicyclo [4.3.1]decano (NESS50ODBN). Una miscela costituita dal composto 3-propionil-3,10-diazabicyclo[4.3.1]decano **8** (0,6 mmoli), K₂CO₃ (0,72 mmoli), acetone (7 mL) e da (3-cloroprop-1-en-1,1-diil)dibenzene **9a** (0,72 mmol) è stata scaldata a riflusso per 24 ore. La miscela è stata quindi riportata a temperatura ambiente, il solido filtrato e l'acetone evaporato. Il residuo è stato successivamente purificato per cromatografia flash (CH₂Cl₂/acetone 8:2) con l'ottenimento del composto 10-(3-3'-difenil-prop-2-en-1-il)-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (NESS50ODBN) sotto forma di olio incolore. Resa: 70%. P.f. 137-139°C. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1660 (C=O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,15 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz); 1,20-2,49 (m, 10H); 2,87-4,06 (m, 8H); 6,05-6,23 (m, 1H); 7,08-7,44 (m, 10H).

7.4.2 Sintesi del composto (E)-10-[3'-(3,4-diclorofenil)but-2-en-1-il]-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (NESS51ODBN):

E' stata ripetuta la procedura preparativa per l'ottenimento di NESS50oDBN, ma utilizzando il composto (E)-1,2-dicloro-4-(4-clorobut-2en-2il)benzene **9b** al posto del cloruro **9a**. E' stato così ottenuto il composto (E)-10-[3'-(3,4-diclorofenil)but-2-en-1-il]-3-propionil-3,10-diazobicyclo[4.3.1]decano (NESS51ODBN) sotto forma di olio incolore. Resa: 65%. P.f. 184-185°C. IR (nujol) ($\lambda = \text{cm}^{-1}$) 1655 (C=O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,19 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz); 1,20-2,53 (m, 10H); 2,84-4,10 (m, 8H); 5,70-6,03 (m, 1H); 7,15-7,50 (m, 3H).

7.5 NUOVI DERIVATI DELLE TUBULISINE

Etil-2-acetiltiazol-4-carbossilato (4). Il composto è stato sintetizzato secondo il metodo descritto da R.A.Hughes *et al.*¹⁰ Il cloridrato dell'etil estere della L-cisteina **2** (15 g, 80,79 mmoli) è stato solubilizzato in una soluzione etanolo/acqua 1:1. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti sotto agitazione a temperatura ambiente NaHCO₃ (6,786 g, 80,79 mmoli) e aldeide piruvica (35% peso in acqua, 17,5 mL, 114 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. Il volume della miscela è stato quindi dimezzato mediante concentrazione sottovuoto alla temperatura di 30°C. La fase acquosa concentrata è stata saturata con NaCl e successivamente estratta con CHCl₃ (2 x 300 mL). Le fasi organiche sono state ricombinate, anidrificate su Na₂SO₄ e concentrate sottovuoto. Il prodotto grezzo così ottenuto, corrispondente alla tiazolina **3**, è stato utilizzato per la fase successiva prevista per la sintesi del composto **4**.

Il composto **3** (16,31 g, 80,74 mmoli) è stato solubilizzato in acetonitrile (500 mL). Alla soluzione è stato aggiunto MnO₂ (140 g, 1,615 moli). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 65 °C overnight, quindi filtrata su celite. Il residuo è stato lavato con acetato di etile (2 x 200 mL). Il filtrato è stato quindi concentrato sottovuoto. Il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (AcOEt/esano 1:3) ottenendo l'acil tiazolo **4** (8,321 g, resa 52% sui due step) come solido giallo. M.p. 68-69°C; *R_f* = 0,33 (esano/AcOEt 3:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,40 (s, 1H); 4,43 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 2,75 (s, 3H); 1,41 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 191,6; 167,5; 160,8; 148,7; 133,4; 61,9; 26,1; 14,3. Massa (ESI): *m/z* 199,8 [M + H]⁺; 221,8 [M + Na]⁺.

2-(4-metilpent-2-enoil)tiazol-4-carbossilato di etile (5). Il composto è stato sintetizzato secondo il metodo precedentemente descritto.¹¹ L'estere tiazolico **4** (1,6 g, 8,04 mmoli) è stato solubilizzato sotto azoto in 25 mL di THF anidro. Alla miscela di reazione, raffreddata a 0 °C con bagno di ghiaccio, è stata aggiunta successivamente una soluzione 1N di TiCl₄ in toluene (17,7 mL, 17,7 mmoli, 2,0 eq). La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione per 30 minuti a 0 °C e successivamente raffreddata - 78 °C con bagno di ghiaccio secco e acetone. Alla miscela di reazione mantenuta sotto agitazione è stata quindi aggiunta trietilammina (2,47 mL, 17,7 mmoli, 2,0 eq) e, dopo 10 minuti, isobutirraldeide (0,88 mL, 9,65 mmoli, 1,2 eq).

La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 1h a -78 °C e, una volta riportata a temperatura ambiente, è stata trattata con una soluzione satura di NH₄Cl. La fase acquosa è stata successivamente estratta con AcOEt (2 x 30 mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate sottovuoto. Sono stati ottenuti 2,7 g di prodotto grezzo (olio rosso-bruno) che sono stati purificati per cromatografia flash impiegando una miscela etere di petrolio/AcOEt (95:5). Alla fine del processo sono stati ottenuti 0,9 g di enone **5** puro come olio giallo con una resa del 70%. *R_f* = 0,50 (esano/AcOEt 8:2). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8,42 (s, 1H); 7,35-7,30 (m, 2H); 4,45 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 2,62 (m, 1H); 1,43 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 1,14 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 181,7; 167,5; 168,8; 160,9; 158,7; 148,7; 130,0; 121,4; 61,7; 31,8; 21,2; 14,3. Massa (ESI): *m/z* 254,1 [M + H]⁺; 276,1 [M + Na]⁺.

Procedura generale per la sintesi dei composti **8a-h**

Ad una soluzione dell'opportuna ammina **6** (19,0 mmoli) in diclorometano (20 mL), mantenuta ad una temperatura di 0 °C, sono stati aggiunti difenilettilammina (15,9 mmoli, 2,7 mL) e una soluzione in diclorometano (5 mL) dell'azide della L-isoleucina **7**.¹²

La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 30 minuti. Successivamente si è aggiunta una soluzione acquosa satura di NH₄Cl (30 mL) e si è estratta la fase organica con diclorometano (3 x 10 mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate con Na₂SO₄, filtrate e concentrate sottovuoto. Sono stati così ottenuti i composti puri **8a-h** con rese comprese tra 80 e 99%.

(2S,3S)-2-azido-N-benzil-3-metilpentanammid (**8a**). Olio incolore. Resa 80%. *R_f* = 0,36 (esano/AcOEt 8:2). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40-7,19 (m, 5H); 6,62 (br s, 1H); 4,45 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H); 1,51-1,41 (m, 1H); 1,33-1,17 (m, 1H); 1,04 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 0,91 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 168,7; 137,7; 128,7; 127,8; 127,6; 69,9; 43,5; 38,3; 24,3; 16,0; 11,5. Massa (ESI) *m/z*: 269,0 [M + Na]⁺.

(2S,3S)-2-azido-N-(4-metil-benzil)-3-metilpentanammid (**8b**). Olio giallino. Resa: 84%. *R_f* = 0,39 (esano/dietil etere 1:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,19-7,14 (m, 4H); 6,58 (br s, 1H); 4,42 (d, *J* = 5,64 Hz, 2H); 3,93 (d, *J* = 4,16 Hz, 1H); 2,35 (s, 3H); 2,15-2,11 (m, 1H); 1,49-1,41 (m, 1H); 1,29-1,20 (m, 1H); 1,05 (d, *J* = 7,08 Hz, 3H); 0,91 (t, *J* = 7,32 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃) δ: 168,6; 137,4; 134,6; 129,4; 127,8; 70,1; 43,2; 38,3; 24,2; 21,0; 16,1; 11,5. Massa (ESI) *m/z*: 261,2 [M + H]⁺; 283,2 [M + Na]⁺.

(2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanammide (8c). Olio incolore. Resa: 96%. $R_f = 0,5$ (esano/AcOEt 7:3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,40 (br s, 1H); 3,84 (d, 1H), 3,14-3,09 (m, 2H); 2,10-2,06 (m, 1H); 1,45-1,39 (m, 1H); 1,27-1,18 (m, 1H); 1,03 (d, 3H); 0,99-0,95 (m, 1H); 0,89 (t, 3H); 0,53-0,49 (m, 2H); 0,25-0,17 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 168,80; 70,19; 44,34; 38,27; 24,26; 16,12; 11,58; 10,66; 3,55. Massa (ESI) m/z : 233,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamide (8d). Olio giallino. Resa: 99%. $R_f = 0,56$ (esano/AcOEt 7/3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,24 (dd, $J = 5,6$ Hz, $J = 1,3$ Hz, 1H); 6,99-6,95 (m, 2H); 6,69 (br s, 1H); 4,64 (dd, $J = 9,7$ Hz, $J = 5,9$ Hz, 2H); 3,92 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H); 2,16-2,09 (m, 1H); 1,49-1,42 (m, 1H); 1,29-1,20 (m, 1H); 1,05 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 168,57; 140,26; 126,89; 126,22; 125,42; 69,94; 38,41; 38,11; 24,22; 16,04; 11,57. Massa (ESI) m/z : 253,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 275,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,3S)-2-azido-N-(((R)-tetraidrofuran-2-il)metil)-3-metilpentanamide (8e). Olio incolore. Resa: 90%. $R_f = 0,55$ (etil acetato). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,64 (br s, 1H); 4,00-3,94 (m, 1H); 3,89-3,84 (m, 2H); 3,79-3,73 (m, 1H); 3,60-3,54 (m, 1H); 3,22-3,16 (m, 1H); 2,19-1,86 (m, 4H); 1,57-1,39 (m, 2H); 1,33-1,21 (m, 1H); 1,04 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 0,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 168,94; 77,42; 70,09; 68,18; 42,96; 38,18; 28,60; 25,83; 24,17; 16,05; 11,53. Massa (ESI) m/z : 241,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 263,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,3S)-2-azido-3-metil-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil) pentanamide (8f). Olio incolore. Resa: 94%. $R_f = 0,12$ (esano/AcOEt 8/2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,45 (br s, 1H); 4,00-3,96 (m, 2H); 3,90 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H); 3,37 (t, $J = 11,7$ Hz, 2H); 3,25-3,13 (m, 2H); 2,14-2,05 (m, 1H); 1,83-1,70 (m, 2H); 1,63-1,53 (m, 4H); 1,48-1,19 (m, 6H); 1,05 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H); 0,91 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 168,92; 70,14; 67,51; 45,05; 38,27; 35,14; 30,60; 24,20; 16,05; 11,58. Massa (ESI) m/z : 255,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 277,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,3S)-2-azido-3-metil-N-fenilpentanamide (8g). Olio giallino. Resa: 96%. $R_f = 0,54$ (esano/AcOEt 1/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,07 (br s, 1H); 7,56-7,53 (m, 2H); 7,34 (t, $J = 8$ Hz, 2H); 7,14 (t, $J = 8$ Hz, 1H); 4,04 (d, $J = 4$ Hz, 1H); 2,25-2,16 (m, 1H); 1,56-1,47 (m, 1H); 1,38-1,26 (m, 1H); 1,11 (d, $J = 8$ Hz, 3H); 0,93 (t, $J = 8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 169,99; 136,88; 129,07; 124,86; 120,00; 70,35; 38,77; 24,22; 16,15; 11,62. Massa (ESI) m/z : 255,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,3S)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metil-pentanammide (8h). Olio incolore. Resa: 94%. $R_f = 0,27$ (esano/AcOEt 7/3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,62 (br s, 1H); 3,81 (d, $J =$

4,5 Hz, 1H); 3,54-3,36 (m, 4H); 3,29 (d, $J = 30,7$ Hz, 3H); 2,15-1,95 (m, 1H); 1,50-1,34 (m, 1H); 1,32-1,13 (m, 1H); 1,00 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 168,89; 70,91; 69,92; 58,66; 39,05; 38,13; 24,25; 15,94; 11,40. Massa (ESI) m/z : 237,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Procedura generale per la sintesi dei composti 9a-h

Ad una soluzione dei composti **8a-h** (4,9 mmoli) in THF anidro (40 mL), mantenuta a -78°C , è stata aggiunta una soluzione di KHMDS (potassio bis(trimetilsilil)amide) 0,5N in toluene (4,9 mmoli, 9,8 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 15 minuti. In seguito è stata aggiunta una soluzione in THF anidro dell'enone **5** (3,3 mmoli in 10 mL di THF). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per un'ora a -78°C . E' stata quindi aggiunta una soluzione acquosa satura di NH_4Cl (30 mL) e successivamente la fase organica è stata estratta con AcOEt (3 x 10 mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate su Na_2SO_4 , filtrate e concentrate sottovuoto. Il residuo così ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash impiegando una miscela etere di petrolio/AcOEt (85:15). Al termine del processo sono stati ottenuti i composti puri **9a-h**. Sono state determinate rese comprese tra 15 e 54%.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-N-benzil-3-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9a). Olio giallo. Resa 46%. $R_f = 0,39$ (AcOEt/esano 1:4). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,32 (s, 1H); 7,29-6,90 (m, 5H); 4,74 (td, $J = 9,3, 3,6$ Hz, 1H); 4,62 (d, $J = 17,6$ Hz, 1H); 4,50-4,36 (m, 4H); 3,52 (dd, $J = 17,9$ Hz, 3,8 Hz, 1H); 3,39 (dd, $J = 18,0$ Hz, 8,9 Hz, 1H); 3,25 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H); 2,28-2,05 (m, 4H); 1,74-1,62 (m, 1H); 1,41 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,18-1,07 (m, 1H); 1,05-0,77 (m, 12 H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 191,06; 169,71; 166,61; 160,43; 148,14; 136,58; 132,89; 128,41; 127,24; 126,24; 63,41; 61,44; 48,30; 39,34; 34,67; 30,33; 24,70; 20,12; 19,96; 19,20; 15,74; 14,06; 10,26. Massa (ESI) m/z : 522,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-N-(4-metilbenzil)-3-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9b). Olio giallo. Resa: 33%. $R_f = 0,16$ (esano/diisopropil etere 35/65). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,33 (s, 1H); 7,10-6,83 (m, 4H); 4,93-4,75 (m, 1H); 4,59 (d, $J = 17,6$ Hz, 1H); 4,47-4,35 (m, 4H); 3,42 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H); 3,28-3,23 (m, 1H); 2,27-2,18 (m, 1H); 2,15 (s, 3H); 1,73-1,64 (m, 2H); 1,46-1,33 (m, 5H); 1,12 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H); 1,01-0,84 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 191,19; 169,82; 160,62; 148,30; 137,01; 133,60;

132,73; 129,23; 126,40; 63,66; 61,64; 57,24; 50,91; 39,48; 34,88; 30,46; 24,92; 22,78; 20,13; 19,35; 15,97; 14,25; 10,49. Massa (ESI) m/z: 514,2 [M + H]⁺; 536,2 [M + Na]⁺.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9c). Olio giallo. Resa: 32%. $R_f = 0,17$ (esano/AcOEt 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,42 (s, 1H); 4,45 (m, 2H); 4,36-4,26 (m, 1H); 3,85 (dd, 1H); 3,56-3,46 (m, 2H); 3,19-3,17 (m, 2H); 2,34-2,05 (m, 3H); 1,80-1,60 (m, 4H); 1,41 (t, 3H); 1,10-0,81 (m, 16H); 0,61-0,55 (m, 2H); 0,26-0,22 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 192,08; 170,01; 167,17; 161,05; 148,81; 133,22; 63,39; 61,84; 60,80; 51,78; 40,86; 36,15; 35,35; 30,67; 25,34; 20,46; 19,98; 15,62; 14,28; 11,52; 10,63; 5,24. Massa (ESI) m/z: 486,2 [M + Na]⁺.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9d). Olio giallo. Resa: 54%. $R_f = 0,19$ (esano/dietil etere 6/4). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,39 (s, 1H); 8,36 (s, 1H); 7,07-7,03 (m, 2H); 6,95-6,94 (m, 1H); 6,91-6,90 (m, 1H); 6,75 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H); 6,70-6,68 (m, 1H); 4,78-4,57 (m, 4H); 4,50-4,41 (m, 4H); 3,60-3,56 (m, 4H); 3,44 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H); 2,24-2,09 (m, 2H); 1,78-1,68 (m, 2H); 1,50-1,41 (m, 6H); 1,31-1,15 (m, 2H); 1,01 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H); 0,96-0,80 (m, 22H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 191,31; 170,32; 169,56; 166,87; 160,63; 148,51; 140,25; 133,56; 133,01; 127,23; 127,00; 126,74; 126,30; 126,08; 125,48; 125,18; 63,85; 63,20; 61,81; 61,75; 58,25; 44,72; 40,08; 36,21; 35,52; 34,97; 30,51; 25,00; 24,67; 20,43; 20,28; 20,11; 19,46; 16,22; 15,86; 14,29; 10,88; 10,43. Massa (ESI) m/z: 506,1 [M + H]⁺; 528,2 [M + Na]⁺.

2-((R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9e). Olio giallo. Resa: 25%. $R_f = 0,24$ (esano/dietil etere 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,40 (s, 1H); 4,46-4,37 (m, 3H); 4,03-3,92 (m, 1H); 3,79-3,58 (m, 4H); 3,45-3,24 (m, 2H); 2,50-2,38 (m, 1H); 2,15-1,98 (m, 2H); 1,88-1,82 (m, 3H); 1,70-1,59 (m, 1H); 1,53-1,37 (m, 5H); 1,01-0,84 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 192,07; 181,43; 169,80; 160,82; 148,53; 122,28; 82,17; 67,72; 62,62; 61,87; 40,78; 36,23; 35,97; 34,69; 29,97; 29,55; 25,55; 25,04; 24,11; 20,52; 19,94; 15,27; 14,20; 10,27. Massa (ESI) m/z: 494,3 (M⁺+H⁺), 516,3 (M⁺+Na).

2-(3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)-4-metilpentanoil)tiazol-4-carbossilato di etile (9f). Olio giallo. Resa: 16%. $R_f = 0,23$ (esano/AcOEt 7/3); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,44 (s, 1H); 4,49-4,18 (m, 3H); 4,11-3,68 (m, 3H); 3,56-3,07 (m, 4H); 2,64-2,51 (m, 1H); 2,18-2,09 (m, 1H); 1,99-1,51 (m, 4H); 1,45-1,14 (m, 9H); 1,02-0,86 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 192,06; 170,15; 160,84;

148,87; 121,30; 67,63; 62,80; 61,81; 56,20; 41,76; 35,63; 35,02; 31,13; 30,89; 30,53; 25,08; 20,43; 15,76; 14,26; 10,55. Massa (ESI) m/z : 508,3 $[M + H]^+$, 530,3 $[M + Na]^+$.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-fenilpentanamido)-4-metilpentanoil)tiangolo-4-carbossilato di etile (9g). Olio giallo. Resa: 15%. $R_f = 0,21$ (esano/AcOEt 9/1). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,45 (s, 1H); 7,45-7,25 (m, 5H); 5,08-4,96 (m, 1H); 4,67-4,42 (m, 2H); 3,72-3,66 (m, 1H); 3,16-3,07 (m, 1H); 2,86 (dd, $J = 9,8, 12,2$ Hz, 1H); 2,03-1,91 (m, 2H); 1,62-1,50 (m, 1H); 1,43 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H); 1,18 (dd, $J = 6,8, 12,2$ Hz, 3H); 1,02 (t, $J = 5,4$ Hz, 3H); 0,99-0,90 (m, 1H); 0,82-0,74 (m, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 191,76; 169,93; 166,95; 160,71; 148,51; 138,32; 133,27; 130,70; 129,51; 128,83; 63,82; 61,64; 59,12; 38,68; 35,23; 30,26; 24,79; 19,62; 15,39; 14,19; 10,42. Massa (ESI) m/z : 508,2 $[M + Na]^+$.

2-(3-((2S,3S)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)tiangolo-4-carbossilato (9h). Olio giallo. Resa: 41%. $R_f = 0,45$ (esano/AcOEt 7/3). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,40 (s, 1H); 4,45 (m, 2H); 4,27-4,20 (m, 1H); 3,78 (dd, $J = 17,0, 4,2$ Hz, 1H); 3,67-3,36 (m, 6H); 3,26 (s, 3H); 2,34-2,18 (m, 1H); 2,15-2,05 (m, 1H); 1,80-1,65 (m, 2H); 1,43 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); 1,02-0,81 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 191,60; 170,04; 166,88; 160,66; 148,54; 133,24; 122,09; 71,08; 65,63; 63,07; 61,55; 58,48; 46,55; 40,27; 35,09; 30,30; 24,85; 20,23; 19,48; 15,32; 15,05; 14,08; 10,39. Massa (ESI) m/z : 490,1 $[M + Na]^+$.

Procedura generale per la sintesi dei composti 10a-h

Ad una soluzione di catalizzatore chirale (S)-CBS (0,38 mmoli, 105 mg) in THF anidro (10 mL) è stata aggiunta una soluzione 10 M di $BH_3 \cdot Me_2S$ (2,3 mmoli, 230 μL). Alla miscela, portata alla temperatura di 0 °C, è stata aggiunta sotto agitazione una soluzione dei composti **9a-h** (1,9 mmoli) in THF anidro (5 mL). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per un'ora alla stessa temperatura e successivamente per 4h a temperatura ambiente. Si è aggiunto quindi metanolo (1 mL). Il solvente è stato allontanato sottovuoto ed il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash impiegando una miscela etere di esano/AcOEt (75:25). Sono stati così ottenuti i composti puri **10a-h**. Sono state determinate rese comprese tra 32 e 80%.

2-((1R, 3R)-3-((2S, 3S)-2-azido-N-benzil-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiangolo-4-carbossilato di etile (10a). Olio incolore. Resa: 60%. $R_f = 0,42$ (esano/AcOEt 7:3). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,08 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H); 7,50-7,10 (m, 5H); 4,87 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H); 4,77 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H); 4,55 (s, 2H); 4,42-4,30 (m, 3H); 3,45 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H); 2,40-2,27 (m, 2H); 2,20-1,90 (m, 1H); 1,89-1,70 (m, 1H); 1,69-1,55 (m, 1H);

1,43-1,33 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,23-1,03 (m, 1H); 1,02-0,87 (m, 6H); 0,86-0,71 (m, 3H); 0,65 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 175,61; 173,01; 161,37; 161,25; 146,85; 138,38; 136,83; 129,04; 127,27; 127,12; 68,93; 63,67; 61,63; 61,08; 37,82; 34,78; 29,87; 24,82; 20,58; 20,07; 15,62; 14,22; 10,19. Massa (ESI) m/z : 524,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(4-metilbenzil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato di etile (10b). Schiuma bianca. Resa: 70%. $R_f = 0,20$ (esano/dietil etere 1/1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,12 (s, 1H); 7,27-7,19 (m, 4H); 4,85 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 4,58-4,51 (m, 2H); 4,44-4,37 (m, 2H); 3,50 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H); 2,41-2,38 (m, 1H); 2,35 (s, 3H); 2,18-2,10 (m, 1H); 2,09-1,90 (m, 2H); 1,89-1,64 (m, 3H); 1,43-1,39 (m, 3H); 1,30-1,12 (m, 1H); 1,01-0,91 (m, 6H); 0,84 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 0,70 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 175,52; 173,45; 161,49; 146,92; 137,79; 136,62; 129,73; 129,19; 127,06; 68,91; 63,73; 61,53; 61,25; 45,33; 37,66; 34,99; 29,78; 24,93; 21,00; 20,89; 20,09; 15,73; 14,33; 10,40. Massa (ESI) m/z : 516,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 538,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato di etile (10c). Olio giallo. Resa: 48%. $R_f = 0,68$ (esano/AcOEt 7/3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,10 (s, 1H); 4,79-4,73 (m, 2H); 4,49-4,33 (m, 3H); 3,69 (d, 1H); 3,40-3,00 (m, 2H); 2,39-2,20 (m, 2H); 2,07-1,76 (m, 2H); 1,43-1,19 (m, 6H); 1,03-0,77 (m, 12H); 0,76-0,50 (m, 2H); 0,36-0,25 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 175,54; 172,39; 161,60; 146,85; 127,43; 68,91; 67,75; 63,52; 61,27; 47,97; 46,78; 38,71; 38,50; 35,03; 29,87; 25,15; 20,73; 20,61; 15,82; 15,58; 12,30; 11,30; 6,60; 5,00. Massa (ESI) m/z : 488,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato di etile (10d). Schiuma gialla. Resa: 80%. $R_f = 0,20$ (esano/dietil etere 1/1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,06 (s, 1H); 7,16 (dd, $J = 5,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1H); 7,07-7,06 (m, 1H); 6,84 (dd, $J = 5,2$ Hz, $J = 3,4$ Hz, 1H); 4,85-4,67 (m, 2H); 4,61-4,57 (m, 1H); 4,46-4,34 (m, 3H); 3,79-3,73 (m, 1H); 3,66 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H); 2,49-2,29 (m, 2H); 2,08-1,94 (m, 2H); 1,79-1,66 (m, 1H); 1,40-1,35 (m, 3H); 0,98-0,95 (m, 6H); 0,92-0,82 (m, 6H); 0,74-0,70 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 175,63; 170,53; 161,30; 146,98; 139,85; 127,68; 126,91; 126,38; 125,68; 67,46; 61,70; 61,20; 61,02; 40,83; 38,36; 34,68; 30,92; 25,14; 21,06; 20,22; 15,85; 14,23; 10,50. Massa (ESI) m/z : 508,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 530,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato di etile (10e). Olio giallo. Resa: 60%. $R_f = 0,18$ (esano/dietil etere 1/1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,08 (s, 1H); 4,99-4,98

(m, 1H); 4,94-4,90 (m, 1H); 4,40-4,29 (m, 3H); 3,97-3,87 (m, 1H); 3,82-3,67 (m, 2H); 3,54-3,48 (m, 1H); 3,30-3,26 (m, 1H); 2,37-1,68 (m, 9H); 1,47-1,14 (m, 5H); 1,02-0,89 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 175,82; 171,18; 161,46; 146,75; 127,29; 78,01; 77,27; 68,57; 67,91; 62,91; 61,04; 47,93; 39,17; 34,11; 30,05; 29,57; 25,52; 25,09; 20,40; 15,55; 14,22; 10,26. Massa (ESI) m/z: 496,6 [M + H]⁺, 518,6 [M + Na]⁺.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato di etile (10f). Olio giallo. Resa: 54%. *R_f* = 0,36 (esano/AcOEt 7/3). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,10 (s, 1H); 4,84-4,32 (m, 4H); 4,04-3,91 (m, 2H); 3,72-3,64 (m, 1H); 3,49-3,11 (m, 4H); 2,40-2,20 (m, 2H); 2,07-1,62 (m, 6H); 1,55-1,25 (m, 7H); 1,03-0,83 (m, 13H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,03; 171,42; 161,36; 147,22; 127,43; 67,82; 67,76; 61,50; 61,31; 48,44; 38,87; 35,37; 34,69; 32,11; 30,68; 25,17; 20,21; 16,05; 14,25; 10,51. Massa (ESI) m/z: 510,3 [M + H]⁺, 532,3 [M + Na]⁺.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-fenilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiangolo-4-carbossilato di etile (10g). Olio giallo. Resa: 32%. *R_f* = 0,62 (esano/AcOEt 7/3). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,15 (s, 1H); 7,57-7,28 (m, 5H); 5,19-5,08 (m, 2H); 4,84-4,78 (m, 1H); 4,41 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H); 3,03 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H); 2,37-2,29 (m, 1H); 2,15-2,05 (m, 1H); 1,96-1,89 (m, 1H); 1,65-1,56 (m, 2H); 1,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); 1,10 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H); 1,06-0,92 (m, 1H); 0,80-0,71 (m, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 175,73; 171,91; 161,52; 146,90; 136,90; 130,15; 129,77; 129,66; 129,54; 129,25; 127,51; 68,96; 63,78; 61,27; 58,84; 37,78; 35,01; 29,11; 24,77; 21,53; 19,13; 15,83; 14,30; 10,39. Massa (ESI) m/z: 510,2 [M + Na]⁺.

2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiangolo-4-carbossilato di etile (10h). Olio incolore. Resa: 77%. *R_f* = 0,42 (esano/AcOEt 7/3). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,06 (s, 1H); 4,78-4,69 (m, 2H); 4,46-4,18 (m, 3H); 3,83 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H); 3,77-3,50 (m, 4H); 3,39-3,33 (m, 1H); 3,31 (s, 3H); 2,39-2,07 (m, 2H); 2,07-1,79 (m, 2H); 1,75-1,69 (m, 1H); 1,41-1,29 (m, 3H); 1,29-1,18 (m, 2H); 1,03-0,77 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 175,61; 172,48; 161,35; 146,79; 127,23; 127,15; 71,33; 68,76; 63,29; 60,99; 58,59; 39,03; 34,57; 29,60; 24,99; 20,28; 19,74; 15,67; 14,16; 10,37. Massa (ESI) m/z: 492,2 [M + Na]⁺.

Procedura generale per la sintesi degli acidi carbossilici 11a-h

I composti **10a-h** sono stati dispersi in 10 mL di una miscela THF/acqua 4:1. Successivamente è stato aggiunto LiOH (1,64 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 12 ore. Successivamente è stata aggiunta acqua (5 mL) e la fase organica è stata estratta con AcOEt (1 x 10 mL). La fase acquosa è stata recuperata ed è stata successivamente acidificata con una soluzione di HCl 1N fino a pH = 2. È stata effettuata quindi un'estrazione con AcOEt (3 x 10 mL). Gli estratti organici sono stati riuniti, disidratati con Na₂SO₄, filtrati e concentrati sottovuoto. Sono stati così ottenuti gli acidi **11a-h**. Sono state determinate rese comprese tra 60 e 98%.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-benzil-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11a). Schiuma bianca. Resa 60%. $R_f = 0,42$ (diclorometano/MeOH 9:1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,25 (s, 1H); 7,52-7,01 (m, 10H); 4,91 (dd, $J = 10,0, 2,5$ Hz, 1H); 4,69-4,49 (m, 3H); 3,54 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H); 2,36-2,02 (m, 3H); 1,91 (m, 1H); 1,63 (m, 1H); 1,13 (m, 1H); 0,97 (m, 6H); 0,86-0,69 (m, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 178,88; 173,36; 169,71; 163,9; 148,13; 138,86; 129,90; 129,36; 128,28; 69,98; 64,80; 60,06; 46,97; 39,05; 36,41; 31,88; 25,79; 20,54; 20,48; 16,01; 10,57. Massa (ESI) m/z : 496,1 [M + Na]⁺, 518,1 [M + K]⁺.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(4-metilbenzil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11b). Schiuma bianca. Resa: 98%. $R_f = 0,24$ (diclorometano/metanolo 90:10). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,22 (s, 1H); 7,23-7,18 (m, 4H); 4,90-4,81 (m, 1H); 4,68-4,35 (m, 2H); 3,82-3,74 (m, 1H); 3,53-3,47 (m, 1H); 2,35 (s, 3H); 2,24-2,17 (m, 2H); 2,05-1,68 (m, 2H); 1,34-1,14 (m, 2H); 1,03-0,91 (m, 6H); 0,88-0,84 (m, 3H); 0,76 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 176,15; 172,93; 163,40; 145,84; 138,02; 133,62; 129,75; 129,27; 128,79; 68,81; 63,85; 61,60; 45,22; 37,81; 34,79; 29,79; 24,93; 20,98; 20,50; 15,89; 10,40. Massa (ESI) m/z : 488,3 [M + H]⁺, 510,3 [M + Na]⁺.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11c). Schiuma bianca. Resa: 88%. $R_f = 0,15$ (diclorometano/metanolo 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,27 (s, 1H); 4,88-4,72 (m, 1H); 4,16 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 3,92-3,61 (m, 4H); 3,37-3,19 (m, 2H); 2,53-1,70 (m, 13H); 1,40-1,18 (m, 1H); 1,10-0,93 (m, 14H); 0,76-0,48 (m, 2H); 0,40-0,29 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 179,60; 173,26; 164,30; 148,48; 129,08; 70,40; 69,85; 64,31; 58,93; 51,78; 48,07; 39,41; 37,68; 36,71; 28,75; 26,34; 23,22; 20,82; 16,11; 11,15; 6,26; 5,76. Massa (ESI) m/z : 438,5 (M⁺+H), 461,5 (M⁺+Na).

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11d). Schiuma gialla. Resa: 91%. $R_f = 0,18$ (diclorometano/metanolo 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,17 (s, 1H); 7,23 (dd, $J = 5,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1H); 7,08 (m, 1H); 6,91 (dd, $J = 5,3$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H); 4,95 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H); 4,63-4,57 (m, 3H); 3,81-3,75 (m, 1H); 3,66 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H), 2,47-2,43 (m, 1H); 2,42-2,32 (m, 1H); 2,25-2,15 (m, 1H); 2,01-1,90 (m, 1H); 1,82-1,73 (m, 1H); 1,35-1,30 (m, 1H); 1,03 (m, 6H); 0,99-0,88 (m, 3H); 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 176,24; 175,56; 170,60; 145,94; 140,31; 127,57; 127,23; 126,84; 125,75; 67,58; 61,77; 61,08; 40,94; 38,74; 34,50; 30,73; 25,27; 21,03; 20,40; 15,99; 10,58. Massa (ESI) m/z : 480,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 502,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11e). Schiuma gialla. Resa quantitativa. $R_f = 0,18$ (diclorometano/MeOH 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,22 (s, 1H); 4,96 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H); 4,15-4,12 (m, 1H); 3,90-3,70 (m, 3H); 3,50-3,45 (m, 1H); 2,38-2,25 (m, 1H); 2,15-1,87 (m, 6H); 1,82-1,73 (m, 1H); 1,52-1,43 (m, 1H); 1,35-1,26 (m, 2H); 1,03-0,93 (m, 12H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 176,96; 176,42; 171,37; 145,78; 128,07; 80,38; 68,59; 68,30; 63,24; 61,21; 47,80; 39,36; 34,38; 30,11; 29,90; 25,57; 25,23; 20,52; 15,72; 10,44. Massa (ESI) m/z : 468,6 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 490,6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11f). Schiuma bianca. Resa: 92%. $R_f = 0,19$ (diclorometano/MeOH 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,25 (s, 1H); 4,85 – 4,75 (m, 1H); 4,07 – 3,96 (m, 2H); 3,74 – 3,66 (m, 1H); 3,52 – 3,14 (m, 5H); 2,45 – 2,19 (m, 2H); 2,11 – 1,95 (m, 3H); 1,90 – 1,63 (m, 3H); 1,52 – 1,19 (m, 5H); 1,05 – 0,87 (m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 176,54; 175,90; 171,62; 146,48; 128,98; 67,78; 67,75; 61,56; 48,56; 38,68; 35,20; 34,74; 32,03; 30,73; 25,21; 20,21; 16,07; 10,54. Massa (ESI) m/z : 482,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 504,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 426,2 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-fenilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11g). Schiuma bianca. Resa: 85%. $R_f = 0,33$ (diclorometano/metanolo 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,29 (s, 1H); 7,57 – 7,28 (m, 5H); 5,10 (dd, $J = 10,8, 2,0$ Hz, 1H); 4,88 – 4,81 (m, 1H); 3,03 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H); 2,35 – 2,27 (m, 1H); 2,11 – 2,04 (m, 1H); 1,99 – 1,92 (m, 1H); 1,68 – 1,55 (m, 2H); 1,11 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 1,06 – 0,92 (m, 1H); 0,80 – 0,74 (m, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 176,48;

171,95; 165,04; 145,96; 136,82; 130,13; 129,84; 129,63; 129,40; 129,31; 68,82; 63,81; 58,90; 37,61; 34,96; 29,17; 24,78; 21,45; 15,80; 10,34. Massa (ESI) m/z: 482,2 [M + Na]⁺.

Acido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilico (11h). Schiuma bianca. Resa: 74%. $R_f = 0,35$ (diclorometano/metanolo 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,28 (s, 1H); 4,80 – 4,72 (m, 1H); 4,05 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H); 3,81 – 3,45 (m, 5H); 3,35 (s, 3H); 2,47 – 2,24 (m, 1H); 2,19 – 1,89 (m, 3H); 1,81 – 1,67 (m, 1H); 1,38 – 1,23 (m, 1H); 1,08 – 0,86 (m, 12H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 179,27; 172,98; 164,15; 148,33; 129,03; 69,63; 64,56; 58,93; 49,21; 49,00; 48,79; 39,38; 36,30; 31,35; 26,04; 20,88; 15,95; 10,82. Massa (ESI) m/z: 464,1 [M + Na]⁺, 486,1 [M + K]⁺.

2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido bromo acetico (12). Ad una soluzione di (-) Mentolo (2,75 mmoli) in THF anidro (5 mL) è stata aggiunta, sotto agitazione, Et₃N (2,75 mmoli). Dopo aver portato la temperatura a 0 °C, è stato aggiunto bromo-acetilbromuro (2,5 mmoli). La temperatura della soluzione è stata fatta risalire a temperatura ambiente e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 2 ore. Successivamente è stata aggiunta una soluzione acquosa di HCl 1N (2 mL) e la fase organica è stata estratta con AcOEt (3 x 5 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 x 15 mL), disidratate con Na₂SO₄ e filtrate. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ed il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash in esano/AcOEt 97:33, ottenendo 388 mg di 2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido bromo acetico (resa: 51 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,78 – 4,60 (m, 1H); 3,86 – 3,69 (m, 2H); 2,09 – 1,96 (m, 1H); 1,95 – 1,83 (m, 1H); 1,74 – 1,59 (m, 2H); 1,55 – 1,29 (m, 2H); 1,16 – 0,95 (m, 2H); 0,87 (m, 6H); 0,77 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H). Massa (ESI): 299,0 [M + Na]⁺.

2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido (Trifenil- λ^5 -fosfaniliden)-acetico (13). Ad una soluzione del composto **12** (0,36 mmoli) in THF anidro (3 mL) è stata aggiunta trifenilfosfina PPh₃ (0,37 mmoli). La miscela di reazione è stata scaldata a riflusso per 2 ore. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il solido risultante è stato lavato con esano (10 mL) e filtrato. Il solido ottenuto è stato solubilizzato in toluene (3,5 mL). Alla soluzione ottenuta si è aggiunta una soluzione acquosa 0,38 N di Na(OH) (1,26 mmoli, 3,3 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per un'ora. La fase organica è stata separata, disidratata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ottenendo 185

mg di 2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido (Trifenil- λ^5 -fosfaniliden)-acetico. La resa è quantitativa. Massa (ESI) m/z: 459,2 [M + H]⁺, 481,2 [M + Na]⁺, lo spettro é in accordo con quanto riportato in letteratura.¹³

2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido 2-(Trifenil- λ^5 -fosfaniliden)-propionico (14). 0,36 mmoli di 2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido (Trifenil- λ^5 -fosfaniliden)-acetico sono state solubilizzate in 2 mL di diclorometano, sotto agitazione. Alla soluzione ottenuta, raffreddata a 0 °C, è stato aggiunto metil ioduro (0,54 mmoli). Dopo aver lasciato risalire la temperatura della miscela di reazione a temperatura ambiente, si è proseguita l'agitazione per 12 ore. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta e il grezzo ottenuto è stato ripreso con toluene (5 mL). Si è quindi aggiunta una soluzione acquosa 0,38 N di Na(OH) (1,26 mmoli) e si è proseguita l'agitazione per 2 ore. La fase organica è stata separata, disidratata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ottenendo 160 mg di 2-isopropil-5-metil-cicloesil estere dell'acido 2-(Trifenil- λ^5 -fosfaniliden)-pro-prionico (resa 94%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7,97 – 7,14 (m, 16H); 4,72 – 4,32 (m, 1H); 2,33 – 1,90 (m, 1H); 1,74 – 1,10 (m, 5H); 1,08 – 0,19 (m, 12H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 133,50; 133,41; 131,27; 128,20; 128,08; 70,83; 46,76; 40,99; 34,14; 30,94; 24,66; 22,41; 21,78; 20,95; 15,37. Massa (ESI) m/z: 473,2 [M + H]⁺.

(S) *ter*-butil-1-idrossi-3-(4-fluorofenil)-propan-2-il-carbamato (15b). La Boc-4-fluoro-L-fenilalanina (10,58 mmol) è stata solubilizzata in 35 mL di THF a 0 °C. Alla soluzione sono stati aggiunti etil cloro formiato (12,7 mmol, 1,21 mL) e trietilammina (12,7 mmol, 1,77 mL). La soluzione è stata mantenuta sotto agitazione a 0 °C per un'ora, quindi filtrata. Il filtrato è stato aggiunto ad una soluzione di NaBH₄ (15,8 mmol, 0,60 g) in 15 mL di acqua. La miscela di reazione è stata agitata per due ore a temperatura ambiente. E' stata quindi aggiunta una soluzione di HCl 1N (25 mL) e si è estratto con AcOEt (3 x 20 mL). Le fasi organiche riunite sono state disidratate con Na₂SO₄, quindi concentrate a pressione ridotta. Il residuo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (esano/AcOEt 1/1) ottenendo (S) *ter*-butil-1-idrossi-3-(4-fluorofenil)-propan-2-il-carbamato come polvere bianca.

Resa: 61%. *R*_f = 0,51 (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7,17 (q, 2H); 6,99 (t, 2H); 4,77 (*br s*, 1H); 3,83 (*br s*, 1H); 3,66 (dd, 2H); 3,54 (dd, 2H);

2,81 (d, 2H); 1,41 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 162,89; 160,46; 156,10; 130,72; 130,64; 115,41; 115,20; 64,13; 53,69; 36,60; 28,30.

(S) *ter*-butil-1-osso-3-fenil propan-2-il-carbamato (16a). Ad una soluzione di Boc-fenilalaninolo **15a** (0,6 mmoli) in diclorometano (6 mL) sono stati aggiunti NaHCO₃ (12,0 mmoli) e Dess-Martin periodinane (0,9 mmoli). La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione per 2 ore. E' stato quindi aggiunto Et₂O (10 mL) e si è proseguita l'agitazione per 15 minuti. La miscela di reazione è stata versata in una soluzione acquosa satura di NaHCO₃/Na₂S₂O₃ (20 mL). Si è quindi aggiunto diclorometano (20 mL) e si sono separate le fasi. La fase organica è stata disidratata con Na₂SO₄ e filtrata. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ottenendo 163 mg del composto (S)terbutil-1-osso-3-fenil propan-2-il-carbamato (resa 98%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9,68 (s, 1H), 7,53 – 6,89 (m, dH); 5,11 – 5,03 (m, 1H); 4,50 – 4,42 (m, 1H); 3,16 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H); 1,48 (s, 9H).

(S) *ter*-butil-1-osso-3-(4-fluorofenil) propan-2-il-carbamato (16b). Si è proceduto secondo quanto riportato per la sintesi del composto **16a**, ma utilizzando Boc-(4-fluorofenil)alaninolo **15b** al posto di Boc-fenilalaninolo **15a**.

Resa: 80%. *R*_f = 0,81 (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7,14 (q, 2H); 7,01 (t, 2H); 5,05 (m, 1H); 4,42 (m, 1H); 3,11 (m, 2H); 1,44 (s, 9H).

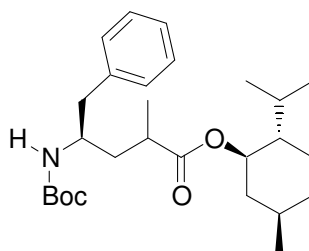
(S,E)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil)4-(*ter*-butossicarbonilamino)-2-metil-5-fenilpent-2-enoato (17a). Ad una soluzione in diclorometano del 2-isopropil-5-metilcicloesil estere dell'acido 2-(Trifenil-λ⁵-fosfaniliden)-propionico (0,48 mmoli in 5 mL), raffreddata a 0 °C, sono state aggiunte sotto agitazione 0,32 mmoli dell'aldeide (S)terbutil-1-osso-3-fenil propan-2-il-carbamato. Dopo aver fatto risalire la temperatura fino a temperatura ambiente, si è proseguita l'agitazione per 2 ore. E' stata quindi aggiunta una soluzione acquosa 1 N di NaHSO₄ (10 mL) e la fase organica è stata estratta con diclorometano (2 x 10 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaCl (1 x 10 mL), disidratate con Na₂SO₄ e filtrate. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ed il grezzo ottenuto è stato purificato via cromatografia flash in esano/etile acetato 85/15 ottenendo 150 mg del composto (S,E)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil) 4-(*ter*-butossi carbonil amino)-2-metil-5-fenilpent-2-enoato. La resa è stata quantitativa.

Solido giallo. $R_f = 0,47$ (esano/etile acetato 97/3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,38 – 7,04 (m, 5H); 6,46 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H); 4,79 – 4,62 (m, 2H); 4,50 – 4,56 (m, 1H); 2,93 (dd, $J = 13,3, 5,6$ Hz, 1H); 2,84 – 2,74 (m, 1H); 2,08 – 1,98 (m, 1H); 1,93 – 1,74 (m, 1H); 1,76 – 1,65 (m, 4H); 1,61 – 1,45 (m, 2H); 1,45 (s, 10H); 0,97 – 0,81 (m, 6H); 0,77 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H). Massa (ESI) m/z : 444,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

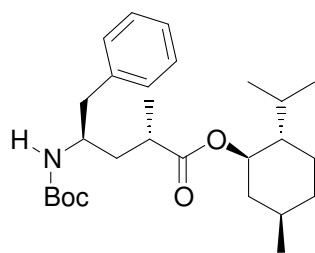
(S,E)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil)4-(*ter*-butossicarbonilamino)-2-metil-5-(4-fluorofenil)pent-2-enoato (17B). Si è proceduto secondo quanto riportato per la sintesi del composto **17a**, ma utilizzando il composto **16b** al posto dell'aldeide (S) *ter*-butil-1-osso-3-fenil propan-2-il-carbamato **16a**.

Solido giallo. Resa: 53%. $R_f = 0,65$ (esano/AcOEt 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,10 (q, 2H); 6,95 (t, 2H); 6,44 (d, 1H); 4,75 – 4,67 (m, 2H); 4,66 – 4,55 (m, 1H); 2,90 (dd, 1H); 2,76 (dd, 1H); 2,03 – 1,97 (m, 1H); 1,86 – 1,77 (m, 1H); 1,75 – 1,65 (m, 4H); 1,57 – 1,45 (m, 2H); 1,41 (s, 9H); 0,97 – 0,81 (m, 6H); 0,76 (d, 3H).

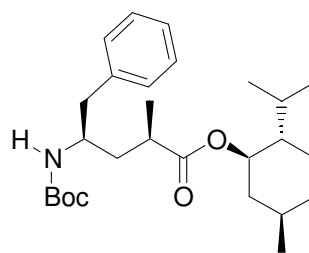
(2S,4R)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil)4-(*ter*-butossicarbonilamino)-2-metil-5-fenilpentanoato (18'a). Ad una soluzione del composto (S,E)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil) 4-(*ter*-butossi carbonil amino)-2-metil-5-fenilpent-2-enoato (0,32 mmoli) in acetato di etile (6 mL) si è aggiunta una quantità catalitica di Pd/C. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione in atmosfera di idrogeno per 2 ore ed è stata successivamente filtrata su celite. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta ottenendo il composto **18a** come miscela di due diastereoisomeri (**18'a**) e (**18''a**)



(18a)



(18'a)



(18''a)

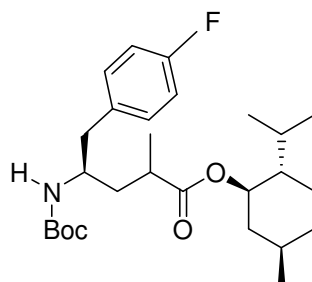
I due diastereoisomeri sono stati separati mediante cromatografia flash in esano/etile acetato 8/2 ottenendo 89 mg del composto (18'a) e 37 mg del composto (18''a) con una resa dell'88% ed un rapporto diastereoisomerico di 70:30;

18'a: Solido bianco. $R_f = 0,7$ (AcOEt/esano 1/4). $[\alpha]_D^{23} = -31,6$ ($c = 0,7$, CHCl_3); FT-IR (film) ν_{max} : 2957,9, 2929,2, 1870,8, 1715,6, 1496,8 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ : 7,30 – 7,26 (m, 2H); 7,22 – 7,15 (m, 3H); 4,64 (dt, $J = 10,8$ Hz, 4,3 Hz, 1H); 4,34 (br s, 1H); 3,95 – 3,80 (m, 1H); 2,83 – 2,73 (m, 2H); 2,50 – 2,41 (m, 1H); 1,98 – 1,92 (m, 1H); 1,86 – 1,60 (m, 4H); 1,54 – 1,31 (m, 4H); 1,39 (s, 9H); 1,13 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H); 1,10 – 1,00 (m, 1H); 0,92 – 0,80 (m, 1H); 0,89 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 0,88 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,74 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) 176,0; 155,3; 137,8; 129,4; 128,2; 126,2; 74,0; 49,7; 46,9; 42,0; 40,7; 37,2; 36,8; 34,1; 31,3; 29,6; 28,2; 26,1; 23,3; 21,9; 20,7; 16,7; 16,1. Massa (ESI) m/z : 446,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 468,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

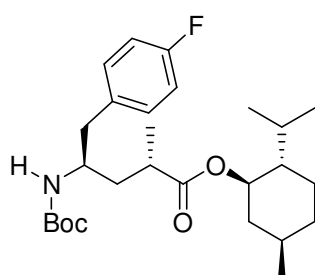
18''a: Solido giallino. $R_f = 0,62$ (AcOEt/esano 1/4). $[\alpha]_D^{23} = -17,1$ ($c = 1,4$, CHCl_3); m.p. = 87-88°C; FT-IR (film) ν_{max} = 2958, 2931, 2871, 1704, 1498, 1454, 1390, 1365, 1253, 1173 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ : 7,29 – 7,26 (m, 2H); 7,22 – 7,16 (m, 3H); 4,66 (dt, $J = 10,8$ Hz, 4,3 Hz, 1H); 4,34 (br s, 1H); 3,92 – 3,80 (m, 1H); 2,80 – 2,70 (m, 2H); 2,62 – 2,50 (m, 1H); 2,02 – 1,96 (m, 1H); 1,91 – 1,81 (m, 2H); 1,71 – 1,64 (m, 2H); 1,54 – 1,33 (m, 4H); 1,39 (s, 9H); 1,15 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H); 1,10 – 1,00 (m, 1H); 0,92-0,80 (m, 1H); 0,90 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,89 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 0,75 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 175,7; 155,1; 137,9; 129,5; 128,3; 126,3; 74,1; 49,9; 47,1; 41,2; 40,8; 37,7; 36,7; 34,3; 31,4; 29,7; 28,4; 26,2; 23,4; 22,0; 20,8; 17,7; 16,1. Massa (ESI) m/z : 446,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 468,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil)4-(*ter*-butossicarbonilamino)-2-metil-5-(4-fuoro)fenil pentanoato (18b). Si è proceduto secondo quanto riportato per la sintesi del composto **18a**, ma utilizzando il composto **17b** al posto di (S,E)-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilcicloesil) 4-(*ter*-butossi carbonil amino)-2-metil-5-fenilpent-2-enoato **17a**. Attraverso

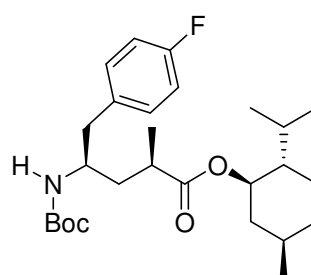
cromatografia flash in esano/etile acetato 8/2, sono stati ottenuti i due diastereoisomeri **18'b** e **18''b** con una resa del 95% ed un rapporto diastereoisomerico di 70:30.



(18b)



(18'b)



(18''b)

18'b: Solido bianco. $R_f = 0,38$ (esano/diisopropil etere 6/4). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ : 7,12 (q, 2H); 6,96 (t, 3H); 4,66 (dt, 1H); 4,35 (br s, 1H); 3,84 (br s, 1H); 2,83 – 2,67 (m, 2H); 2,56 (br s, 1H); 2,04 – 1,93 (m, 1H); 1,91 – 1,76 (m, 2H); 1,72 – 1,62 (m, 2H); 1,54 – 1,31 (m, 4H); 1,39 (s, 9H); 1,15 (d, 3H); 1,10 – 0,94 (m, 1H); 0,93 – 0,82 (m, 8H); 0,74 (d, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) 175,60; 162,80; 160,37; 155,08; 133,67; 130,86; 130,78; 115,14; 114,93; 74,06; 49,94; 47,04; 40,79; 40,55; 37,64; 36,60; 34,24; 31,34; 29,64; 28,31; 26,13; 23,24; 21,96; 20,77; 17,77; 16,07.

18''b: Solido giallino. $R_f = 0,45$ (esano/diisopropil etere 6/4). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ : 7,12 (q, 2H); 6,97 (t, 2H); 4,65 (m, 1H); 4,37 (m, 1H); 3,85 (br s, 1H); 2,80 – 2,70 (m, 2H); 2,55 – 2,40 (m, 1H); 2,00 – 1,92 (m, 1H); 1,90 – 1,64 (m, 4H); 1,54 – 1,43 (m, 2H); 1,39 (s, 10H); 1,14 (d, 3H); 1,10 – 1,00 (m, 2H); 0,89 (d, 3H); 0,88 (d, 3H); 0,74 (d, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 176,05; 162,84; 160,41; 155,37; 133,58; 130,88; 130,81; 115,18; 114,97; 74,15; 49,88; 46,94; 41,36; 40,74; 37,13; 36,92; 34,23; 31,34; 29,66; 28,31; 26,17; 23,29; 21,99; 20,76; 16,90; 16,15.

Cloridrato di (2S,4R)-metil 4-amino-2-metil-5-fenilpentanoato (19a). 2,28 mmoli del composto **18'a** sono state disperse in una soluzione acquosa di HCl 6N (25 mL); la dispersione ottenuta è stata scaldata a riflusso per un'ora. Dopo raffreddamento fino a temperature ambiente si è aggiunto acetato di etile (30 mL) e si è separata la fase acquosa da quella organica. La fase acquosa è stata successivamente concentrata a pressione ridotta ed il residuo ottenuto è stato sciolto in metanolo (10 mL). Sono stati quindi aggiunti 2,2-dimetossipropano (4,56 mmoli) e HCl concentrato (37%, 0,024 mmoli, 2 µl) e la miscela di reazione è stata scaldata a 50 °C per 12 ore. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ottenendo 580 mg del cloridrato di (2S,4R)-metil 4-amino-2-metil-5-fenilpentanoato (resa 99 %).

$R_f = 0,3$ (diclorometano/metanolo 9/1). $[\alpha]_D^{23} = -8.6$ ($c = 1.0$, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,46 – 7,15 (m, 5H); 3,63 (s, 3H); 3,59 – 3,47 (m, 1H); 2,57 – 2,50 (m, 1H); 3,04 (dd, $J = 19,9$ and $6,2$ Hz, 1H); 2,91 (dd, $J = 13,7$ and $7,7$ Hz, 1H); 2,79 – 2,65 (m, 1H); 2,08 – 1,95 (m, 1H); 1,75 – 1,63 (m, 1H); 1,16 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100,5 MHz, CD_3OD) δ : 178,1; 137,8; 131,3; 130,9; 129,3; 53,3; 41,1; 37,9; 18,7. LC/MS (ESI) m/z 221.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Cloridrato di (2S,4R)-metil 4-amino-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (19b). Si è proceduto secondo quanto riportato per la sintesi del composto **19a**, ma utilizzando il composto **18'b** al posto dell'analogo **18'a**.

Resa: quantitativa. $R_f = 0,3$ (diclorometano/metanolo 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,35 – 7,08 (m, 4H); 3,65 (s, 3H); 3,54 – 3,47 (m, 1H); 3,02 – 2,87 (m, 2H); 2,75 – 2,66 (m, 1H); 2,05 – 1,96 (m, 1H); 1,72 – 1,61 (m, 1H); 1,16 (d, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100,5 MHz, CD_3OD) δ : 177,32; 164,97; 162,54; 132,98; 132,94; 132,48; 132,40; 116,95; 116,74; 52,62; 39,50; 37,20; 37,06; 18,06.

Procedura generale per la sintesi dei composti 20a-k

Ad una soluzione del cloridrato di (2S,4R)-metil 4-amino-2-metil-5-fenilpentanoato **19a** (0,65 mmoli), o dell'analogo **19b**, in DMF (5 mL) sono stati aggiunti HOAt (0,715 mmol), HATU (0,715 mmoli), trietilammina (1.36 mmoli) e il composto **11a-h** (0,65 mmoli). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 2 ore. Alla miscela di reazione è stata quindi aggiunta acqua (10 mL). La fase organica è stata estratta con etere etilico (3 x 10 mL). La fase organica estratta è stata poi lavata, in successione, con soluzioni acquose di HCl 1N (1 x 10 mL), satura di NaHCO_3 (1 x 10 mL), satura di NaCl (1 x 10 mL). La fase organica è stata recuperata, disidratata con Na_2SO_4 e filtrata. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta per ottenere i

composti (2S,4R)-metil-4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-sostituito-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)thiazol-4-carbossi amido)-2-metil-5-(fenil o 4-fluorofenil) pentanoato. Sono state determinate rese comprese tra 18 e 98%.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-benzil-3-metil pentanamido)-1-idrossi-4-metil pentil)thiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenil pentanoato (20a). Schiuma giallina. Resa 74%. $R_f = 0,44$ (esano/etile acetato 1/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,96 (s, 1H); 7,34 – 7,08 (m, 10H); 6,98 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H); 4,94 – 4,75 (m, 2H); 4,63 (d, $J = 17,2$ Hz, 1H); 4,49 (d, $J = 17,2$ Hz, 1H); 4,40 – 4,26 (m, 2H); 3,88 – 3,75 (m, 1H); 3,63 (s, 3H); 3,46 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H); 3,02 – 2,74 (m, 2H); 2,67 – 2,53 (m, 1H); 2,45 – 2,25 (m, 1H); 2,23 – 1,87 (m, 4H); 1,61 (m, 2H); 1,22 – 1,07 (m, 4H); 1,06 – 0,90 (m, 6H); 0,81 (m, 3H); 0,74 – 0,61 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 176,39; 175,01; 171,90; 171,25; 160,68; 149,68; 137,51; 137,23; 128,90; 128,50; 128,41; 128,26; 127,92; 126,29; 122,85; 68,83; 63,68; 61,74; 59,32; 51,70; 48,32; 47,86; 45,22; 41,73; 37,95; 37,80; 36,43; 34,33; 30,15; 24,77; 20,42; 20,04; 17,73; 15,74; 10,14. Massa (ESI) m/z : 677,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 699,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(4-metilbenzil) pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)thiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (20b). Schiuma giallina. Resa: 70%. $R_f = 0,40$ (esano/AcOEt 1:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,01 (s, 1H); 7,33 – 7,03 (m, 9H); 4,80 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 4,68 – 4,46 (m, 2H); 4,41 – 4,30 (m, 2H); 3,83 – 3,75 (m, 1H); 3,63 (s, 3H); 3,48 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H); 2,97 – 2,82 (m, 3H); 2,65 – 2,60 (m, 1H); 2,33 (s, 3H); 2,22 – 1,96 (m, 4H); 1,90 – 1,75 (m, 1H); 1,69 – 1,54 (m, 2H); 1,36 – 1,24 (m, 2H); 1,22 – 1,11 (m, 3H); 1,05 – 0,97 (m, 6H); 0,85 – 0,82 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 176,57; 174,65; 171,33; 160,69; 137,92; 134,07; 129,67; 129,59; 129,44; 129,15; 128,72; 128,35; 128,27; 127,35; 126,40; 123,05; 68,84; 63,71; 61,71; 51,73; 48,38; 45,21; 41,06; 38,68; 38,02; 36,52; 34,53; 30,19; 24,88; 21,04; 20,49; 20,42; 17,79; 15,68; 10,30. Massa (ESI) m/z : 691,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 713,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)thiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (20c). Schiuma bianca. Resa: 83%. $R_f = 0,26$ (esano/AcOEt 1:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,06 (s, 1H); 7,35 – 7,25 (m, 5H); 4,83 – 4,77 (m, 1H); 4,47 – 4,38 (m, 2H); 3,75 – 3,73 (m, 1H); 3,65 (s, 3H); 3,62 – 3,57 (m, 1H); 3,01 – 2,87 (m, 4H); 2,66 – 2,60 (m, 1H); 2,44 – 1,83 (m, 6H); 1,64 – 1,55 (m, 1H); 1,41 – 1,28 (m, 3H); 1,20 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H); 1,12 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 1,07 – 0,98 (m, 12H); 0,77 – 0,70 (m, 2H); 0,61 – 0,55 (m, 1H); 0,41 – 0,30 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 176,47; 174,62; 170,69; 160,67; 149,62;

137,49; 129,59; 128,28; 126,39; 122,94; 68,96; 63,61; 60,79; 51,61; 48,22; 46,60; 41,01; 38,78; 37,80; 36,47; 34,61; 29,92; 25,11; 20,44; 20,04; 16,06; 11,92; 10,50; 6,53; 5,63, 4,53. Massa (ESI) m/z: 641,5 [M + H]⁺, 663,5 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-N-(ciclopropilmetil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (20d). Schiuma gialla. Resa: 18%. $R_f = 0,52$ (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,01 (s, 1H); 7,18 – 6,93 (m, 4H); 4,81 – 4,60 (m, 2H); 4,40 – 4,29 (m, 2H); 3,75 – 3,65 (m, 2H); 3,63 (s, 3H); 3,57 – 3,34 (m, 3H); 3,10 – 2,80 (m, 3H); 2,61 – 2,53 (m, 1H); 2,40 – 2,15 (m, 2H); 2,08 – 1,90 (m, 4H); 1,89 – 1,72 (m, 3H); 1,59 – 1,48 (m, 1H); 1,40 – 1,20 (m, 1H); 1,17 – 0,80 (m, 18H); 0,74 – 0,60 (m, 2H); 0,58 – 0,47 (m, 1H); 0,34 – 0,22 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,44; 174,67; 170,69; 160,68; 149,51; 133,15; 131,06; 130,98; 123,04; 115,19; 114,98; 68,97; 67,74; 63,59; 61,41; 51,69; 48,18; 40,16; 38,83; 37,73; 36,44; 34,57; 29,87; 25,11; 20,46; 17,72; 16,08; 11,91; 10,53; 5,68; 4,47.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (20e). Schiuma bianca. Resa: 70%. $R_f = 0,38$ (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,97 (s, 1H); 7,33 – 6,92 (m, 7H); 6,69 (dd, $J = 5,2$ Hz, $J = 3,4$ Hz, 1H); 4,90 – 4,85 (m, 2H); 4,61 – 4,50 (m, 2H); 4,40 – 4,33 (m, 2H); 3,82 – 3,76 (m, 1H); 3,67 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H); 3,65 (s, 3H); 3,02 – 2,84 (m, 2H); 2,69 – 2,60 (m, 1H); 2,44 – 2,40 (m, 1H); 2,25 – 2,19 (m, 1H); 2,13 – 1,97 (m, 4H); 1,81 – 1,59 (m, 2H); 1,21 – 1,17 (m, 3H); 1,09 – 0,85 (m, 12H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,55; 174,81; 170,72; 171,25; 160,68; 149,86; 140,07; 137,55; 129,72; 129,60; 128,41; 128,35; 127,40; 127,00; 126,55; 125,48; 122,99; 67,44; 61,76; 61,11; 51,78; 48,33; 41,00; 40,81; 37,93; 37,89; 36,54; 34,60; 30,91; 25,25; 21,12; 20,47; 17,90; 16,01; 10,58. Massa (ESI) m/z: 683,2 [M + H]⁺, 705,2 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (20f). Schiuma bianca. Resa: 90%. $R_f = 0,3$ (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,98 (s, 1H); 7,21 – 6,91 (m, 6H); 6,72 (dd, $J = 5,3$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H); 4,91 – 4,86 (m, 1H); 4,63 – 4,51 (m, 2H); 4,41 – 4,32 (m, 1H); 3,82 – 3,77 (m, 1H); 3,66 (s, 3H); 2,99 – 2,82 (m, 3H); 2,66 – 2,60 (m, 1H); 2,45 – 2,41 (m, 1H); 2,28 – 2,20 (m, 1H); 2,14 – 1,95 (m, 4H); 1,82 – 1,55 (m, 4H); 1,22 – 1,18 (m, 3H); 1,09 – 0,85 (m, 12H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,46; 176,44; 170,71; 162,90; 160,47; 140,12; 133,28; 133,26; 131,10; 131,02; 127,35; 126,99; 126,96; 126,69; 125,90; 125,45; 67,41; 63,93; 61,77; 61,10; 51,82; 40,82;

40,27; 38,92; 37,87; 36,51; 34,59; 30,86; 25,26; 21,12; 20,48; 17,94; 16,00; 10,59. Massa (ESI) m/z: 701,2 [M + H]⁺, 723,2 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-(((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (20g). Schiuma bianca. Resa: 98%. $R_f = 0,10$ (esano/dietil etere 3/7). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,98 (s, 1H); 7,20 – 7,13 (m, 2H); 6,96 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H); 4,93 (t, $J = 12,0$ Hz, 1H); 4,35 – 4,31 (m, 1H); 4,09 – 4,00 (m, 1H); 3,90 – 3,86 (m, 1H); 3,79 – 3,71 (m, 1H); 3,61 (s, 3H); 2,91 – 2,59 (m, 2H); 2,57 – 2,54 (m, 1H); 2,27 – 2,16 (m, 2H); 2,00 – 1,77 (m, 9H); 1,52 – 1,43 (m, 2H); 1,35 – 1,10 (m, 6H); 1,04 – 0,94 (m, 15H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,51; 171,57; 162,78; 160,82; 160,36; 149,60; 130,98; 130,91; 115,20; 114,99; 68,65; 67,88; 67,54; 63,29; 51,75; 51,68; 48,34; 39,67; 37,78; 36,41; 35,02; 30,69; 30,66; 30,27; 29,91; 25,51; 25,18; 20,56; 17,81; 15,66; 14,15; 10,45. Massa (ESI) m/z: 689,8 [M + H]⁺, 711,8 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (20h). Schiuma bianca. Resa: 96%. $R_f = 0,21$ (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,97 (s, 1H); 7,13 – 6,88 (m, 4H); 4,79 – 4,72 (m, 1H); 4,35 – 4,23 (m, 1H); 3,94 – 3,66 (m, 3H); 3,57 (s, 3H); 3,49 – 3,03 (m, 4H); 2,89 – 2,69 (m, 6H); 2,55 – 2,46 (m, 1H); 2,26 – 2,18 (m, 1H); 2,09 – 1,86 (m, 3H); 1,84 – 1,68 (m, 3H); 1,63 – 1,35 (m, 3H); 1,29 – 1,20 (m, 2H); 1,11 – 0,87 (m, 15H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,30; 175,91; 171,58; 160,50; 149,40; 133,05; 130,87; 130,60; 123,08; 115,03; 114,82; 68,80; 67,63; 63,18; 61,72; 51,53; 48,43; 40,26; 39,92; 37,25; 36,25; 36,16; 34,96; 31,81; 31,25; 31,21; 24,89; 20,20; 17,61; 15,99; 10,26. Massa (ESI) m/z: 703,4 [M + H]⁺, 725,4 [M + Na]⁺.

(2R,4S)-1-(4-fluorofenil)-5-metossi-4-metil-5-ossopentan-2-il 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-fenil)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossilato (20i). Schiuma bianca. Resa: 80%. $R_f = 0,58$ (esano/AcOEt 1:1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,05 (s, 1H); 7,57 – 7,11 (m, 8H); 6,87 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H); 5,04 – 4,96 (m, 2H); 4,84 – 4,78 (m, 1H); 4,42 – 4,33 (m, 1H); 3,60 (s, 3H); 3,01 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H); 2,94 – 2,82 (m, 2H); 2,70 – 2,61 (m, 1H); 2,24 – 2,17 (m, 1H); 2,14 – 2,06 (m, 1H); 2,05 – 1,93 (m, 2H); 1,74 – 1,56 (m, 3H); 1,20 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,15 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 1,07 – 0,97 (m, 1H); 0,84 – 0,77 (m, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,54; 174,71; 171,69; 160,66; 160,31; 149,62; 137,14; 133,12; 130,86; 130,78; 130,07; 129,88; 129,63; 129,31; 123,27; 115,21; 115,00; 68,84; 63,80;

58,96; 51,66; 48,17; 40,17; 37,65; 37,39; 36,38; 34,89; 29,25; 21,41; 19,30; 17,38; 15,79; 10,36. Massa (ESI) m/z: 703,4 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3R)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-

fenilpentanoato (20j). Schiuma bianca. Resa: 72%. *R_f* = 0,31 (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,89 (s, 1H), 7,31 – 6,92 (m, 6H); 4,82-4,67 (m, 2H); 4,47 – 4,21 (m, 2H); 3,82 – 3,63 (m, 2H); 3,57 (s, 3H); 3,52 – 3,28 (m, 3H); 3,21 (s, 3H); 3,00 – 2,70 (m, 2H); 2,65 – 2,43 (m, 1H); 2,40 – 2,10 (m, 2H); 2,10 – 1,84 (m, 3H); 1,82 – 1,65 (m, 1H); 1,63 – 1,37 (m, 1H); 1,37 – 1,19 (m, 1H); 1,17 – 0,66 (m, 15H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,38; 175,04; 170,80; 160,64; 149,55; 137,45; 129,50; 128,23; 126,33; 122,85; 71,34; 68,63; 63,24; 58,49; 51,55; 48,23; 40,94; 39,18; 37,72; 36,39; 34,46; 29,76; 25,00; 20,41; 17,63; 15,66; 10,39. Massa (ESI) m/z: 651,3 [M + H]⁺, 673,3 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil4 -(2-((1R,3R)-3-((2S,3R)-2-azido-N-(2-metossietil)-3-metilpentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-

metilpentanoato (20k). Schiuma bianca. Resa 84%. *R_f* = 0,4 (esano/AcOEt 1/1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,02 (s, 1H); 7,20 – 7,15 (m, 2H); 6,96 (t, 2H); 4,82-4,67 (m, 2H); 4,40 – 4,27 (m, 2H); 3,82 – 3,65 (m, 2H); 3,62 (s, 3H); 3,54 – 3,35 (m, 3H); 3,25 (s, 3H); 3,00 – 2,80 (m, 2H); 2,65 – 2,50 (m, 1H); 2,40 – 2,15 (m, 2H); 2,10 – 1,88 (m, 3H); 1,82 – 1,72 (m, 1H); 1,63 – 1,46 (m, 1H); 1,35 – 1,19 (m, 1H); 1,17 – 0,66 (m, 15H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 176,46; 175,02; 170,85; 160,42; 149,39; 133,21; 131,01; 130,89; 126,33; 123,12; 115,23; 71,48; 68,67; 63,34; 58,61; 51,76; 48,29; 40,17; 39,37; 37,78; 36,46; 34,52; 29,81; 25,09; 20,50; 17,82; 15,79; 10,52. Massa (ESI) m/z: 663,3 [M + H]⁺, 685,4 [M + Na]⁺.

Procedura generale per la sintesi dei composti 22a-k

I composti **20a-k** (0,44 mmoli) sono stati solubilizzati in metanolo (10 mL). Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una quantità catalitica di Pd/C 10%. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione in atmosfera di idrogeno per 12 ore, per essere poi filtrata su celite. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ed il residuo è stato solubilizzato in diclorometano (10 mL). Dopo un lavaggio con acqua (1 x 10 mL), la fase organica è stata disidratata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata a pressione ridotta per ottenere i composti **21a-k** che sono stati direttamente sottoposti ad uno stadio successivo di reazione. In particolare, i composti **21a-k** (0,46 mmoli) sono stati aggiunti sotto agitazione ad una sospensione di acido N-metil pipercolinico (0,69 mmoli) in diclorometano (10 mL) contenente HOAt (0,73 mmoli), HATU

(0,73 mmoli) e trietilammina (0,73 mmoli). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 4 ore. E' stata quindi aggiunta acqua (10 mL) e la fase organica è stata estratta con diclorometano (3 x 10 mL). Gli estratti organici sono stati riuniti, disidratati con solfato di sodio e filtrati. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta ottenendo un grezzo che è stato successivamente purificato tramite cromatografia flash in diclorometano/metanolo 95/5. Sono stati ottenuti i composti **22a-k** con rese comprese tra 73% e 100%.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N-benzil-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (22a). Schiuma arancio. Resa quantitativa. $R_f = 0,30$ (diclorometano/metanolo 95/5). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,05 (s, 1H); 7,60 – 7,02 (m, 5H); 5,14 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H); 4,87 (m, 1H); 4,80 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H); 4,32 (m, 3H); 3,96 (m, 1H); 3,61 (s, 3H); 2,97 – 2,76 (m, 3H); 2,71 (dd, $J = 11,0, 2,8$ Hz, 1H); 2,67 – 2,55 (m, 2H); 2,48 – 2,42 (m, 2H); 2,21 (s, 3H); 2,18 – 1,95 (m, 5H); 1,94 – 1,39 (m, 8H); 1,37 – 1,21 (m, 2H); 1,20 – 1,13 (m, 3H); 1,12 – 1,04 (m, 3H); 1,03 – 0,90 (m, 4H); 0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 0,71 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 178,85; 177,90; 175,23; 174,75; 162,81; 150,62; 140,03; 139,15; 139,01; 130,39; 130,30; 129,64; 129,25; 127,41; 70,47; 69,87; 62,27; 56,48; 55,57; 52,17; 50,09; 46,52; 44,91; 42,08; 39,29, 39,11; 38,13; 37,65; 32,34; 31,42; 26,10, 25;27, 24;24, 24;14, 21;11, 21;02, 20,92; 18,26; 16,83; 10,66. Massa (ESI) m/z : 776,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 798,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-N-(4-metilbenzil)-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (22b). Schiuma gialla. Resa: 95%. $R_f = 0,41$ (diclorometano/metanolo 90/10). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,95 (s, 1H); 7,44 – 6,98 (m, 9H); 5,20 – 5,17 (m, 1H); 4,58 – 4,37 (m, 4H); 3,88 – 3,84 (m, 1H); 3,64 (s, 3H); 2,97 – 2,85 (m, 3H); 2,63 – 2,34 (m, 5H); 2,25 (s, 3H); 2,23 (s, 3H); 2,13 – 1,85 (m, 5H); 1,75 – 1,46 (m, 8H); 1,44 – 1,37 (m, 2H); 1,35 – 1,21 (m, 3H); 1,18 -1,11 (m, 3H); 1,07 – 0,98 (m, 6H); 0,97 – 0,78 (m, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 178,51; 176,47; 174,85; 171,37; 160,51; 150,42; 141,03; 129,77; 129,25; 128,62; 128,25; 128,17; 127,25; 126,43; 123,15; 71,37; 69,77; 62,38; 56,45; 55,47; 52,21; 50,05; 48,52; 45,91; 41,08; 39,89; 39,21; 38,15; 37,25; 33,34; 31,98; 27,10; 25,27; 24,88; 24,74; 24,14; 21,24; 20,50; 20,62; 17,83; 15,78; 10,33. Massa (ESI) m/z : 791,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 813,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidine-2-carbossamido)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazole-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (22c). Schiuma arancio. Resa: 94%. $R_f = 0,20$

(diclorometano/metanolo 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,02 (s, 1H); 7,27 – 7,15 (m, 5H); 4,82 – 4,74 (m, 1H); 4,35 – 4,27 (m, 1H); 3,86 – 3,72 (m, 1H); 3,58 (s, 3H); 3,22 – 3,12 (m, 1H); 3,01 – 2,87 (m, 4H); 2,69 – 2,52 (m, 2H); 2,27 – 1,95 (m, 9H); 1,75 – 1,53 (m, 8H); 1,32 – 1,25 (m, 3H); 1,15 – 1,10 (m, 3H); 1,05 – 1,00 (m, 6H); 0,95 – 0,91 (m, 6H); 0,70 – 0,36 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 178,51; 174,68; 163,43; 151,05; 139,67; 139,59; 130,87; 129,54; 127,87; 70,61; 70,18; 56,89; 52,57; 50,30; 44,95; 42,69; 39,39; 38,13; 31,84; 26,13; 24,41; 18,57; 16,99; 16,78; 12,40; 11,91; 11,42; 9,64; 6,65; 5,21. Massa (ESI) m/z : 740,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 762,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3R)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoato (22d). Schiuma bianca. Resa: quantitativa. $R_f = 0,31$ (diclorometano/metanolo 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,03 (s, 1H), 7,25 – 7,20 (m, 2H); 7,00 – 6,95 (m, 2H); 4,82 – 4,72 (m, 1H); 4,56 (br s, 2H); 4,33 – 4,25 (m, 2H); 3,92 – 3,74 (m, 1H); 3,57 (s, 3H); 3,15 (dd, 1H); 3,00 – 2,84 (m, 4H); 2,71 – 2,47 (m, 3H); 2,12 (s, 3H); 2,05 – 1,93 (m, 5H); 1,80 – 1,39 (m, 8H); 1,39 – 1,26 (m, 2H); 1,21 – 1,09 (m, 12H); 0,97 – 0,84 (m, 6H); 0,73 – 0,56 (m, 1H); 0,51 – 0,42 (m, 1H); 0,42 – 0,29 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 179,37; 178,31; 175,60; 174,55; 163,22; 150,77; 135,43; 133,26; 132,34; 124,72; 116,21; 116,00; 70,72; 68,93; 68,73; 61,81; 55,69; 55,94; 55,39; 52,40; 47,90; 44,96; 41,56; 40,61; 39,14; 39,04; 38,34; 37,89; 26,34; 25,94; 24,42; 21,47; 21,23; 21,09; 18,38; 16,57; 12,17; 11,19; 6,46; 5,32.

(2S,4R)-metil 4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (22e). Schiuma Arancio. Resa quantitativa. $R_f = 0,44$ (diclorometano/metanolo 90/10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,99 (s, 1H); 7,38 – 6,98 (m, 7H); 6,77 (dd, $J = 5,1$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H); 5,51 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H); 5,18 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H); 4,92 – 4,90 (m, 1H); 4,66 – 4,57 (m, 3H); 4,37 – 4,31 (m, 1H); 3,91 – 3,86 (m, 1H); 3,62 (s, 3H); 2,96 – 2,85 (m, 3H); 2,79 – 2,76 (m, 1H); 2,66 – 2,59 (m, 2H); 2,36 – 2,30 (m, 1H); 2,24 (s, 3H); 2,21 – 1,96 (m, 5H); 1,81 – 1,55 (m, 4H); 1,37 – 1,25 (m, 1H); 1,19 – 1,13 (m, 6H); 1,07 – 1,03 (m, 3H); 0,96 – 0,90 (m, 6H); 0,84 – 0,77 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 178,62; 178,31; 174,50; 163,21; 150,79; 142,48; 139,51; 139,38; 130,69; 130,62; 129,55; 129,51; 128,65; 127,99; 127,66; 126,75; 124,60; 70,37; 68,45; 62,90; 56,69; 55,71; 52,39; 45,03; 42,45; 42,23; 40,07; 39,15; 39,02; 38,20; 37,95; 32,44; 26,19; 25,67; 24,38; 24,21; 21,35; 21,10; 18,40; 16,81; 12,12. Massa (ESI) m/z : 782,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 804,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoato (22f). Schiuma bianca. Resa: 88%. $R_f = 0,52$ (diclorometano/metanolo 90/10). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,98 (s, 1H); 7,28 – 7,17 (m, 5H); 6,78 (dd, $J = 5,1$ Hz, $J = 3,4$ Hz, 1H); 5,18 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H); 4,91 – 4,82 (m, 1H); 4,66 – 4,57 (m, 2H); 4,32 – 4,27 (m, 1H); 3,90 – 3,85 (m, 1H); 3,61 (s, 3H); 2,93 – 2,87 (m, 3H); 2,82 (s, 3H); 2,73 – 2,55 (m, 3H); 2,21 (s, 3H); 2,09 – 1,99 (m, 6H); 1,80 – 1,54 (m, 8H); 1,33 – 1,25 (m, 3H); 1,12 – 0,89 (m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 178,63; 178,27; 164,45; 163,24; 150,74; 142,51; 135,57; 135,54; 132,35; 132,27; 128,63; 127,99; 127,30; 127,99; 126,75; 116,21; 116,00; 70,73; 70,44; 69,84; 68,46; 62,95; 56,71; 45,08; 42,23; 41,65; 40,07; 39,12; 39,03; 38,23; 37,94; 32,03; 26,27; 25,68; 24,46; 24,21; 21,36; 21,10; 18,42; 16,82; 12,13; 10,84. Massa (ESI) m/z : 799,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 821,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoato (22g). Schiuma bianca. Resa: 99%. $R_f = 0,42$ (diclorometano/metanolo 90/10). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,03 (s, 1H); 7,25 (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 5,4$ Hz, 2H); 6,99 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H); 5,20 – 4,80 (m, 1H); 4,79 – 4,77 (m, 1H); 4,34 – 4,28 (m, 2H); 4,02 – 3,97 (m, 2H); 3,80 – 3,78 (m, 1H); 3,61 (s, 3H); 2,88 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 2,82 (s, 3H); 2,65 – 2,58 (m, 1H); 2,57 – 2,49 (m, 1H); 2,24 – 1,90 (m, 11H); 1,68 – 1,47 (m, 9H); 1,30 – 1,15 (m, 5H); 1,03 – 0,87 (m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 179,05; 178,24; 167,45; 164,45; 163,29; 162,03; 150,84; 135,50; 132,36; 132,29; 124,74; 116,21; 116,00; 70,75; 69,82; 69,32; 56,71; 52,39; 50,36; 45,03; 41,58; 39,22; 39,03; 38,35; 37,93; 31,83; 31,46; 26,81; 25,37; 26,00; 24,44; 21,19; 18,52; 16,16; 11,15. Massa (ESI) m/z : 782,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 804,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(2S,4R)-metil 5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoato (22h). Schiuma bianca. Resa: 74%. $R_f = 0,57$ (diclorometano/metanolo 95/5). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) (1:1 miscela di rotameri) δ : 8,02 (s, 1H); 8,00 (s, 1H); 7,21 – 7,12 (m, 4H); 6,96 – 6,91 (m, 4H); 5,02 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H); 4,91 (dd, $J = 11,0$, 1,5 Hz, 1H); 4,70 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 4,63 (dd, $J = 10,5$; 2,2 Hz, 1H); 4,36 – 4,24 (m, 2H); 4,04 – 3,72 (m, 6H); 3,63 – 3,43 (m, 10H); 3,37 – 3,12 (m, 6H); 2,93 – 2,79 (m, 8H); 2,71 – 2,44 (m, 6H); 2,10 (s, 3H); 2,08 (s, 3H); 2,06 – 1,89 (m, 12H); 1,75 – 1,16 (m, 26H); 1,12 – 0,86 (m, 32H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 179,68; 178,19; 176,90; 175,37;

163,05; 150,92; 135,24; 132,42; 132,16; 124,78; 116,23; 116,02; 70,27; 69,10; 68,87; 62,00; 56,62; 56,16; 52,37; 50,03; 44,77; 41,52; 40,53; 39,24; 39,03; 39,01; 38,20; 37,91; 36,72; 33,23; 32,84; 32,44; 26,19; 25,47; 24,38; 21,20; 18,38; 16,89; 11,33. Massa (ESI) m/z: 802,5 [M + H]⁺, 824,4 [M + Na]⁺.

(2R,4S)-1-(4-fluorofenil)-5-metossi-4-metil-5-ossopentan-2-il 2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-fenilpentanamido)pentil)tiazol-4-carbossilato (22i). Schiuma bianca. Resa: 95%. $R_f = 0,62$ (diclorometano/metanolo 95/5). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,04 (s, 1H); 7,51 – 7,44 (m, 5H); 7,18 (dd, $J = 8,7; 5,4$ Hz, 2H); 6,88 (t, $J = 8,7$ Hz, 2H); 5,02 (dd, $J = 10,3, 2,0$ Hz, 1H); 4,76 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H); 4,35 – 4,27 (m, 2H); 3,59 (s, 3H); 2,94 – 2,83 (m, 3H); 2,70 – 2,61 (m, 1H); 2,56 (dd, $J = 11,0; 3,7$ Hz, 1H); 2,21 (s, 3H); 2,12 – 2,00 (m, 2H); 1,96 – 1,89 (m, 1H); 1,83 – 1,70 (m, 5H); 1,67 – 1,23 (m, 8H); 1,19 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 1,09 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 1,05 – 0,96 (m, 1H); 0,93 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,82 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 0,77 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 179,17; 178,08; 174,76; 164,16; 163,00; 161,74; 150,63; 135,14; 135,11; 132,09; 132,01; 131,91; 130,87; 130,00; 129,93; 124,51; 115,98; 115,76; 70,45; 69,89; 56,54; 56,12; 52,18; 50,08; 44,73; 41,33; 38,88; 38,83; 38,34; 37,66; 31,46; 31,50; 26,11; 25,03; 24,22; 21,61; 20,15; 17,99; 16,65; 11,34.

(2S,4R)-metil-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-3-((2S,3R)-N-(2-metossietil)-3-metil-2-(1-metilpiperidina-2-carbossamido) pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoato (22j). Schiuma gialla. Resa: 77%. $R_f = 0,32$ (diclorometano/metanolo 95/5). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,02 (s, 1H); 7,33 – 7,02 (m, 5H); 4,89 – 4,74 (m, 2H); 4,42 – 4,29 (m, 2H); 3,80 – 3,65 (m, 3H); 3,58 (s, 3H); 3,54 – 3,31 (m, 3H); 3,22 (s, 3H); 2,71 – 2,55 (m, 3H); 2,49 – 2,42 (m, 2H); 2,23 (s, 3H); 2,20 – 1,94 (m, 5H); 1,95 – 1,39 (m, 8H); 1,39 – 1,24 (m, 2H); 1,21 – 1,13 (m, 3H); 1,12 – 1,04 (m, 3H); 1,02 – 0,93 (m, 4H); 0,83 – 0,70 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 176,80; 174,30; 172,45; 169,54; 160,88; 150,29; 138,39; 129,26; 128,97; 126,91; 126,13; 71,55; 66,81; 62,88; 57,81; 55,73; 55,21; 54,39; 53,30; 52,17; 43,21; 42,53; 39,37; 38,44; 37,98; 37,14; 35,53; 31,70; 27,31; 24,95; 24,81; 22,14; 18,60; 17,86; 16,28; 11,56. Massa (ESI) m/z: 744,4 [M + H]⁺, 766,4 [M + Na]⁺.

(2S,4R)-metil 5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-3-((2S,3R)-N-(2-metossietil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoato (22k). Schiuma gialla. Resa: 73%. $R_f = 0,18$ (diclorometano/metanolo 98/2). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,03 (s, 1H); 7,26 – 7,22 (m, 2H); 7,01 – 6,95 (m, 2H); 4,87 – 4,81 (m, 1H); 4,69 (dd, 1H); 4,34 – 4,23 (m, 2H); 3,83 – 3,65

(m, 3H); 3,62 (s, 3H); 3,57 – 3,40 (m, 3H); 3,35 (s, 3H); 2,95 – 2,84 (m, 4H); 2,71 – 2,50 (m, 3H); 2,13 (s, 3H); 2,05 – 1,94 (m, 5H); 1,80 – 1,39 (m, 8H); 1,39 – 1,24 (m, 2H); 1,21 – 1,09 (m, 3H); 1,08 – 0,85 (m, 13H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 177,64; 176,72; 174,04; 173,09; 161,73; 149,29; 133,98; 130,79; 130,71; 123,15; 114,65; 114,44; 69,52; 69,19; 68,29; 67,04; 57,69; 57,53; 55,17; 54,32; 53,66; 50,83; 43,46; 42,37; 40,03; 37,67; 36,85; 36,59; 36,39; 30,30; 30,11; 24,83; 24,36; 22,91; 19,61; 16,96; 14,81; 10,58.

Procedura generale per la sintesi dei sali 2,2,2-trifluoroacetici 23a-k

I composti **22a-k** (0,26 mmoli) sono stati solubilizzati in THF (5 mL). Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta una soluzione acquosa 1N di Li(OH) (0,773 mmoli). La reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 48 ore. Si sono quindi aggiunti acqua (2 mL) e acido trifluoroacetico fino a pH = 2. La fase organica è stata estratta con etile acetato (3 x 5 ml) e gli estratti organici riuniti sono stati disidratati con Na₂SO₄ e poi filtrati. Il solvente è stato quindi evaporato a pressione ridotta ottenendo i sali 2,2,2-trifluoroacetici degli acidi **23 a-k**.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N-benzil-3-metil-2-(1-metilpiperidin-2-carbossamido) pentanamido)-1-idrossi-4-metil pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (23a). Schiuma bianca. Resa: 90%. *R_f* = 0,15 (diclorometano/metanolo 95/5). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,06 (s, 1H); 7,36 – 7,03 (m, 10H); 5,15 (d, *J* = 10,3 Hz, 2H); 5,03 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H); 4,94 – 4,82 (m, 2H); 4,74 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 4,59 (d, *J* = 16,7 Hz, 1H); 4,51 – 4,26 (m, 4H); 3,96 (dd, *J* = 20,8, 10,9 Hz, 2H); 3,86 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H); 3,50 (t, *J* = 12,7 Hz, 2H); 3,08 (dd, *J* = 27,4, 13,7 Hz, 2H); 2,94 – 2,68 (m, 11H); 2,48 (dd, *J* = 34,9; 15,4; 5,6 Hz, 3H); 2,30 – 1,74 (m, 22H); 1,72 – 1,46 (m, 6H); 1,34 (dd, *J* = 19,4; 13,6 Hz, 2H); 1,26 – 1,15 (m, 8H); 1,09 (dd, *J* = 18,7; 5,1 Hz, 7H); 0,97 (dd, *J* = 21,5; 12,9; 7,1 Hz, 11H); 0,85 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 0,71 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); 0,57 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 180,62; 179,68; 175,12; 171,62; 169,86; 163,96; 161,94 (q, *J* = 38,4 Hz); 151,55; 140,80; 140,07; 131,31; 130,66; 130,14; 129,87; 128,31; 117,96 (q, *J* = 287,3 Hz); 70,97; 69,51; 62,88; 58,81; 57,20; 51,58; 47,90; 44,05; 42,88; 40,74; 40,21; 38,74; 38,49; 33,34; 31,20; 28,78; 25,90; 24,61; 23,10; 21,82; 21,69; 19,43; 17,38; 16,96; 12,96; 11,52. Massa (ESI) *m/z*: 762,4 [M + H]⁺, 784,4 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-N-(4-metilbenzil)-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido) pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (23b). Schiuma giallina. Resa quantitativa. *R_f* = 0,27 (diclorometano/metanolo 90/10). ¹H NMR (400 MHz,

CD₃OD) δ : 8,10 (s, 1H); 7,34 – 7,01 (m, 10H); 5,12 (d, $J = 10,3$ Hz, 2H); 5,05 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H); 4,90 – 4,85 (m, 2H); 4,74 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 4,58 (d, $J = 16,7$ Hz, 1H); 4,53 – 4,24 (m, 4H); 3,96 (dd, $J = 20,8, 10,9$ Hz, 2H); 3,86 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H); 3,52 (t, $J = 12,7$ Hz, 2H); 3,08 (dd, $J = 27,4, 13,7$ Hz, 2H); 2,92 – 2,67 (m, 11H); 2,46 (dd, $J = 15,4; 5,6$ Hz, 3H); 2,25 (s, 3H); 2,23 (s, 3H); 2,20 – 1,74 (m, 16H); 1,72 – 1,46 (m, 6H); 1,34 (dd, $J = 19,4, 13,6$ Hz, 2H); 1,26 – 1,15 (m, 8H); 1,09 (dd, $J = 18,7; 5,1$ Hz, 7H); 0,97 (dd, $J = 21,5; 12,9; 7,1$ Hz, 11H); 0,85 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 0,71 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 0,57 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 180,62; 179,68; 175,12; 171,62; 169,86; 163,96; 161,94 (q; $J = 38,4$ Hz); 151,55; 140,80; 140,07; 131,31; 130,66; 130,14; 129,87; 128,31; 117,96 (q, $J = 287,3$ Hz); 70,97; 69,51; 62,88; 58,81; 57,20; 51,58; 47,90; 44,05; 42,88; 40,74; 40,21; 38,74; 38,49; 33,34; 31,20; 28,78; 25,90; 24,61; 23,10; 21,82; 21,69; 19,43; 17,38; 16,96; 12,96, 11,52. Massa (ESI) m/z: 763,4 [M + H]⁺, 785,4 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidine-2-carbossamido)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (23c). Schiuma bianca. Resa quantitativa. $R_f = 0,25$ (Diclorometano/Metanolo 90:10). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7,83 (s, 1H); 7,05 – 6,95 (m, 5H); 4,59 – 4,56 (m, 1H); 4,19 – 4,12 (m, 1H); 3,74 – 3,53 (m, 4H); 3,30 – 3,21 (m, 1H); 2,85 – 2,68 (m, 3H); 2,61 – 2,26 (m, 7H); 2,03 – 1,32 (m, 12H); 0,98 – 0,91 (m, 3H); 0,86 – 0,81 (m, 6H); 0,75 – 0,67 (m, 6H); 0,48 – 0,18 (m, 5H). Massa (ESI) m/z: 726,4 [M + H]⁺, 748,4 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-1-idrossi-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (23d). Schiuma bianca. Resa quantitativa. $R_f : 0,12$ (diclorometano/metanolo 95/5). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8,03 (s, 1H); 7,25 – 7,21 (m, 2H); 6,98 – 6,94 (m, 2H); 5,16 – 5,00 (m, 1H); 4,82 (m, 1H); 4,80 – 4,76 (m, 1H); 4,39 – 4,30 (m, 1H); 3,93 – 3,60 (m, 2H); 3,48 – 3,36 (m, 1H); 3,23 – 2,98 (m, 2H); 2,88 (d, 2H); 2,81 (s, 3H); 2,74 – 2,45 (m, 2H); 2,22 – 1,80 (m, 7H); 1,80 – 1,52 (m, 6H); 1,29 (d, 3H); 1,21 – 1,14 (m, 4H); 1,14 – 1,00 (m, 8H); 0,97 -0,84 (m, 6H); 0,73 – 0,27 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ : 180,19; 174,22; 171,12; 169,38; 162,21; 151,04; 135,65; 133,49; 132,57; 124,71; 116,39; 116,17; 70,29; 68,52; 61,82; 58,05; 56,63; 55,23; 54,96; 50,84; 43,33; 41,72; 40,71; 39,52; 39,24; 38,38; 38,06; 32,11; 25,54; 24,34; 22,71; 21,65; 21,41; 21,22; 18,96; 16,69; 12,42; 11,53; 6,56; 5,73.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (23e). Schiuma bianca. Resa: quantitativa. $R_f = 0,27$ (diclorometano/metanolo 90/10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,99 (s, 1H); 7,39 – 6,98 (m, 7H); 6,74 (dd, $J = 5,1$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H); 5,18 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H); 4,92 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H); 4,67 – 4,58 (m, 2H); 4,38 – 4,33 (m, 1H); 3,88 (t, $J = 9,4$ Hz, 1H); 3,15 – 3,11 (m, 2H); 2,98 – 2,92 (m, 3H); 2,62 – 2,54 (m, 1H); 2,42 (s, 3H); 2,36 – 1,62 (m, 12H); 1,44 – 1,28 (m, 3H); 1,21 – 1,14 (m, 6H); 1,07 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 0,97 – 0,92 (m, 6H); 0,77 – 0,75 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 181,57; 178,53; 175,19; 174,34; 163,18; 150,95; 142,40; 140,07; 139,73; 130,79; 130,69; 129,50; 128,73; 127,99; 127,56; 127,24; 126,82; 124,39; 69,74; 68,58; 62,85; 56,59; 56,22; 51,22; 44,54; 42,27; 41,96; 40,08; 39,52; 39,12; 38,02; 32,42; 31,23; 25,56; 24,16; 23,80; 21,12; 18,97; 16,75; 12,14; 10,87. Massa (ESI) m/z : 882,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 905,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoico (23f). Schiuma giallina. Resa: quantitativa. $R_f = 0,16$ (diclorometano/metanolo 90/10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,98 (s, 1H); 7,27 – 7,10 (m, 4H); 6,99 – 6,91 (m, 2H); 6,79 – 6,76 (m, 1H); 5,13 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H); 4,81 – 4,78 (m, 1H); 4,67 – 4,62 (m, 1H); 4,36 – 4,29 (m, 1H); 3,94 – 3,76 (m, 2H); 3,50 – 3,45 (m, 1H); 3,14 – 3,05 (m, 1H); 2,92 – 2,90 (m, 2H); 2,88 – 2,86 (m, 1H); 2,82 (s, 3H); 2,60 – 2,54 (m, 1H); 2,41 – 2,35 (m, 1H); 2,25 – 1,92 (m, 9H); 1,88 – 1,59 (m, 6H); 1,35 – 1,29 (m, 2H); 1,21 – 1,06 (m, 12H); 0,96 – 0,87 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 179,87; 178,59; 173,98; 171,02; 167,09; 163,27; 150,85; 142,30; 135,62; 132,40; 132,32; 128,87; 128,08; 127,29; 126,87; 116,21; 115,99; 68,79; 68,37; 62,64; 57,77; 56,45; 43,53; 42,38; 41,44; 40,08; 39,31; 39,04; 38,06; 32,50; 30,32; 24,18; 23,88; 22,51; 21,19; 21,10; 18,80; 16,58; 12,23; Massa (ESI) m/z : 828,4 ($\text{M}^+ + \text{H}^+$), 850,4 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(((R)-tetraidrofuranyl-2)metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoico (23g). Schiuma giallina. Resa: quantitativa. $R_f = 0,30$ (diclorometano/metanolo 90/10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,01 (s, 1H); 7,24 – 7,20 (m, 2H); 6,95 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H); 4,83 – 4,74 (m, 1H); 4,33 – 4,31 (m, 2H); 3,82 – 3,70 (m, 2H); 3,50 – 3,33 (m, 2H); 3,24 – 3,21 (m, 1H); 2,89 – 2,86 (m, 3H); 2,72 – 2,25 (m, 6H); 2,14 – 1,20 (m, 18H); 1,18 – 1,09 (m, 3H); 1,07 –

0,84 (m, 12H). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 179,05; 174,68; 164,40; 163,39; 161,98; 150,91; 135,91; 132,37; 132,29; 124,54; 116,17; 115,96; 78,90; 70,02; 69,32; 69,00; 68,85; 56,31; 50,69; 50,00; 49,79; 43,63; 41,31; 39,81; 37,99; 31,55; 30,74; 26,77; 25,74; 24,81; 22,99; 21,18; 16,65; 16,15; 12,12; 11,17. Massa (ESI) m/z: 889,02 [M + H]⁺, 911,02 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoico (23h). Schiuma bianca. Resa: 72%. *R_f* = 0,48 (diclorometano/metanolo 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,05 (s, 1H); 7,22 – 7,16 (m, 2H); 6,94 – 6,90 (m, 2H); 5,09 (d, *J* = 10 Hz, 1H); 4,98 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,68 – 4,64 (m, 1H); 4,35 (br s, 1H); 3,95 – 3,71 (m, 3H); 3,61 – 3,13 (m, 7H); 2,96 – 2,70 (m, 4H); 2,64 – 2,19 (m, 6H); 2,05 – 1,45 (m, 16H); 1,45 – 1,22 (m, 4H); 1,13 – 0,86 (m, 16H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 179,67; 174,96; 172,53; 171,36; 164,37; 161,96; 150,95; 135,39; 132,47; 124,88; 116,18; 115,97; 70,16; 69,16; 61,81; 57,74; 56,41; 50,58; 43,62; 41,49; 40,56; 39,75; 38,12; 37,69; 36,73; 32,87; 32,41; 25,21; 24,73; 23,87; 23,00; 21,19; 19,06; 16,68; 11,34. Massa (ESI) m/z: 788,5 [M + H]⁺, 810,4 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidine-2-carbossamido)-N-fenilpentanamido)pentil)tiazolo-4-carbossamido)-2-metilpentanoico (23i). Schiuma bianca. Resa: 99%. *R_f* = 0,25 (diclorometano/metanolo 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,09 (s, 1H); 7,61 – 7,44 (m, 5H); 7,17 (dd, *J* = 8,7; 5,4 Hz, 2H); 6,85 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H); 5,04 (dd, *J* = 10,0; 1,7 Hz, 1H); 4,72 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H); 4,39 – 4,32 (m, 1H); 4,29 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H); 3,84 (dd, *J* = 12,0; 3,2 Hz, 1H); 3,53 – 3,45 (m, 1H); 3,10 – 2,99 (m, 1H); 2,94 – 2,82 (m, 2H); 2,80 (s, 3H); 2,62 – 2,54 (m, 1H); 2,24 (t, *J* = 13,0 Hz, 1H); 2,10 – 1,65 (m, 10H); 1,62 – 1,46 (m, 2H); 1,20 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H); 1,09 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H); 1,07 – 0,99 (m, 1H); 0,90 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 0,80 – 0,75 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 179,26; 174,35; 169,28; 164,28; 163,35; 161,85; 150,71; 135,31; 135,28; 132,26; 132,18; 132,04; 131,93; 131,00; 130,24; 124,80; 116,10; 115,89; 70,13; 68,05; 57,61; 56,27; 50,66; 43,09; 41,38; 39,54; 38,90; 38,27; 37,85; 31,56; 30,13; 24,82; 24,07; 22,30; 21,79; 20,29; 18,66; 16,75; 11,69. Massa (ESI) m/z: 766,8 [M + H]⁺, 788,8 [M + Na]⁺.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-3-((2S,3S)-N-(2-metossietil)-3-metil-2-(1-metilpiperidina-2-carbossamido)pentanamide)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (23j). Schiuma bianca. Resa:

87%. $R_f = 0,17$ (diclorometano/metanolo 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,07 (s, 1H); 7,32 – 7,04 (m, 5H); 4,82 (m, 1H); 4,73 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H); 4,39 (m, 1H); 4,24 – 4,04 (m, 1H); 3,89 – 3,40 (m, 4H); 3,37 (s, 3H); 3,21 (s, 3H); 3,16 – 2,99 (m, 1H); 2,98 – 2,87 (m, 2H); 2,80 (s, 3H); 2,69 – 2,50 (m, 2H); 2,44 – 2,25 (m, 1H); 2,28 – 1,50 (m, 12H); 1,24 – 0,70 (m, 15H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 179,61; 174,30; 172,45; 169,54; 160,88; 160,60 (q, $J = 38,4$ Hz); 150,29; 138,39; 129,26; 128,97; 126,91; 126,13; 118,96 (q; $J = 38,4$ Hz); 71,55; 66,81; 62,88; 57,81; 55,73; 55,21; 54,39; 53,30; 43,21; 42,53; 39,37; 37,98; 37,50; 37,06; 35,53; 31,70; 27,31; 24,95; 24,81; 22,14; 18,60; 18,28; 16,28; 11,56. Massa (ESI) m/z : 731,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 753,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Sale 2,2,2-trifluoroacetico dell'acido (2S,4R)-5-(4-fluorofenil)-4-(2-((1R,3R)-1-idrossi-3-((2S,3S)-N-(2-metossietil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metilpentanoico (23k). Schiuma bianca. Resa: quantitativa. $R_f = 0,15$ (diclorometano/metanolo 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,06 (s, 1H); 7,24 – 7,20 (m, 2H); 6,96 – 6,90 (m, 2H); 4,82 (d, 1H); 4,68 (dd, 1H); 4,41 (m, 1H); 4,27 – 4,19 (m, 1H); 3,81 – 3,40 (m, 4H); 3,33 (s, 3H); 3,21 (s, 1H); 3,10 – 2,99 (m, 1H); 2,93 – 2,80 (m, 3H); 2,44 – 2,35 (m, 2H); 2,27 (s, 3H); 2,10 – 1,50 (m, 11H); 1,45 – 1,25 (m, 3H); 1,12 (t, 4H); 1,05 – 0,95 (m, 7H); 0,95 – 0,85 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 183,53; 177,72; 174,45; 169,77; 161,97; 160,73; 150,64; 135,85; 132,35; 125,13; 116,13; 115,92; 71,12; 69,87; 59,24; 59,09; 56,60; 56,51; 55,50; 51,04; 44,48; 41,79; 39,41; 38,26; 37,91; 37,06; 35,25; 31,69; 27,96; 25,81; 23,92; 21,14; 19,45; 16,72; 16,35; 11,15. Massa (ESI) m/z : 748,5 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 770,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Procedura generale per la sintesi dei derivati delle tubulisine 24a-k

Ad una soluzione dei composti **23a-k** (0,27 mmoli) in piridina (4 mL), è stata aggiunta anidride acetica (2 mL). La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione per 12 ore. Successivamente è stato evaporato il solvente a pressione ridotta ed il grezzo ottenuto è stato purificato tramite due stadi di cromatografia flash, rispettivamente in diclorometano/metanolo 98/2 e in diclorometano/metanolo 9:1. Sono stati così ottenuti gli acidi **24a-k**.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-3-((2S, 3S)-N-benzil-3-metil-2-(1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (24a). Schiuma bianca. Resa: 76%. $R_f = 0,25$ (DCM/MeOH 95/5). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,07 (s, 1H); 7,57 – 7,01 (m, 10H); 5,95 – 5,85 (m, 1H); 5,06 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H); 4,74 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 4,45 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H); 4,41 – 4,30 (m, 2H); 3,18

– 3,09 (m, 1H); 2,99 (dd, $J = 11,1; 2,6$ Hz, 1H); 2,96 – 2,80 (m, 2H); 2,60 – 2,51 (m, 1H); 2,49 – 2,27 (m, 6H); 2,16 (s, 3H); 2,11 – 1,86 (m, 4H); 1,85 – 1,56 (m, 5H); 1,56 – 1,25 (m, 2H); 1,19 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 1,13 – 0,98 (m, 4H); 0,99 – 0,95 (m, 1H); 0,86 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,76 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); 0,70 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 175,79; 173,33; 171,70; 171,15; 162,54; 150,88; 139,45; 139,41; 130,43; 129,90; 129,26; 128,94; 127,34; 71,28; 69,68; 59,54; 56,34; 55,37; 50,96; 44,32; 41,88; 39,42; 37,83; 36,29; 31,88; 31,16; 25,45; 25,22; 23,60; 20,93; 20,81; 20,62; 18,78; 16,29; 10,80. Massa (ESI) m/z : 804,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 826,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-N-(4-metilbenzil)-2-((R)-1-metilpiperidine-2-carbossamido)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (24b). Schiuma gialla. Resa: 81%. $R_f = 0,15$ (diclorometano/metanolo 90/10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,15 (s, 1H); 7,39 – 7,08 (m, 9H); 5,86 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H); 5,00 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H); 4,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 4,56 – 4,38 (m, 3H); 3,20 – 3,10 (m, 1H); 3,07 – 2,96 (m, 1H); 2,95 – 2,77 (m, 2H); 2,54 – 2,37 (m, 6H); 2,35 – 2,26 (m, 4H); 2,17 (s, 3H); 2,06 – 1,25 (m, 13H); 1,20 – 1,12 (m, 3H); 1,11 – 1,03 (m, 3H); 0,99 – 0,85 (m, 6H); 0,84 – 0,75 (m, 3H); 0,73 – 0,63 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 182,15; 176,15; 173,46; 171,94; 171,37; 164,37; 162,92; 150,58; 139,45; 139,00; 136,64; 130,70; 130,53; 129,40; 129,37; 127,54; 125,43; 71,22; 69,91; 67,84; 64,79; 56,61; 55,62; 44,49; 42,65; 38,04; 36,33; 32,07; 31,43; 31,04; 30,88; 25,63; 25,38; 23,82; 21,37; 21,08; 20,94; 20,77; 19,41; 16,42; 10,98. Massa (ESI) m/z : 818,5 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 840,5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-3-((2S,3S)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidine-2-carbossamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (24c). Schiuma bianca. Resa: 87%. $R_f = 0,27$ (Diclorometano/Metanolo 90:10). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,09 (s, 1H); 7,26 – 7,15 (m, 5H); 5,90 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H); 4,90 – 4,83 (m, 1H); 4,39 – 4,35 (m, 1H); 3,86 – 3,80 (m, 1H); 3,15 – 2,91 (m, 4H); 2,58 – 2,30 (m, 6H); 2,17 (s, 3H); 2,04 – 1,89 (m, 4H); 1,77 – 1,60 (m, 5H); 1,45 – 1,41 (m, 1H); 1,30 – 1,14 (m, 11H); 0,94 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H); 0,86 – 0,84 (m, 2H); 0,71 – 0,63 (m, 2H); 0,74 – 0,43 (m, 1H); 0,35 – 0,31 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 181,36; 172,06; 171,76; 162,87; 151,04; 139,75; 130,67; 129,47; 127,54; 125,16; 71,63; 69,69; 56,50; 55,55; 51,08; 44,27; 42,15; 39,83; 39,35; 38,71; 38,12; 36,68; 31,86; 31,22; 25,64; 25,47; 23,63; 21,11; 21,00; 20,74; 18,83; 16,69; 13,22; 11,20; 6,58; 6,42. Massa (ESI) m/z : 768,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 790,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-3-((2S,3S)-N-(ciclopropilmetil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossammido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24d). Schiuma bianca. Resa: 95 %. $R_f = 0,36$ (diclorometano/metanolo 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,16 (s, 1H); 7,26 – 7,23 (m, 2H); 6,97 – 6,93 (m, 2H); 6,04 – 5,87 (m, 1H); 5,56 – 5,46 (m, 1H); 4,46 – 4,26 (m, 2H); 3,88 (dd, 1H); 3,12 (m, 1H); 3,05 – 2,85 (m, 4H); 2,52 – 2,34 (m, 7H); 2,19 (s, 3H); 2,09 – 1,87 (m, 5H); 1,84 – 1,58 (m, 7H); 1,50 – 1,30 (m, 3H); 1,28 – 1,13 (m, 4H); 1,12 – 1,01 (m, 7H); 1,00 – 0,90 (m, 5H); 0,85 (m, 3H); 0,78 – 0,59 (m, 2H); 0,53 – 0,29 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 172,26; 171,97; 162,12; 151,07; 135,97; 132,53; 126,37; 122,50; 116,29; 116,07; 71,68; 70,11; 56,78; 55,69; 51,42; 44,62; 41,66; 40,64; 38,32; 36,86; 32,03; 31,56; 31,10; 25,85; 24,02; 21,76; 21,22; 20,86; 19,57; 18,37; 16,93; 13,54; 11,42; 6,95; 6,68. Massa (ESI) m/z : 786,5 (M^+H^+), 808,4 (M^+Na^+).

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (24e). Schiuma bianca. Resa: 77%. $R_f = 0,28$ (diclorometano/metanolo 90/10). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,10 (s, 1H); 7,35 – 7,34 (m, 1H); 7,26 – 7,11 (m, 6H); 6,96 (dd, $J = 5,1$ Hz, $J = 3,4$ Hz, 1H); 5,97 – 5,93 (m, 1H); 5,42 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H); 4,90 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H); 4,54 – 4,33 (m, 3H); 3,12 – 3,09 (m, 1H); 2,94 – 2,92 (m, 3H); 2,63 – 2,43 (m, 4H); 2,38 (s, 3H); 2,36 – 2,34 (m, 1H); 2,17 (s, 3H); 2,02 – 2,00 (m, 3H); 1,95 – 1,89 (m, 2H); 1,80 – 1,75 (m, 1H); 1,73 – 1,55 (m, 5H); 1,54 – 1,50 (m, 1H); 1,38 – 1,30 (m, 2H); 1,21 – 1,17 (m, 3H); 1,09 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,82 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H); 0,64 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 181,88; 176,24; 173,94; 172,06; 170,78; 162,91; 150,88; 143,09; 139,71; 130,67; 129,46; 129,10; 128,06; 127,52; 127,21; 125,53; 71,04; 70,07; 67,04; 56,64; 55,33; 51,19; 44,56; 42,16; 39,61; 39,06; 37,75; 36,17; 31,85; 31,48; 25,77; 25,56; 23,96; 21,21; 20,98; 20,65; 18,96; 16,07; 10,87. Massa (ESI) m/z : 810,4 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 832,4 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-(tiofenil-2-metil)pentanamido)pentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24f). Schiuma bianca. Resa: 83%. $R_f = 0,21$ (diclorometano/metanolo 9/1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,08 (s, 1H); 7,33 (dd, 1H); 7,24 – 7,16 (m, 3H); 6,94 – 6,88 (m, 3H); 5,94 – 5,91 (m, 1H); 5,39 (d, 1H); 4,51 – 4,28 (m, 3H); 3,11 (m, 1H); 2,98 (m, 1H); 2,90 – 2,86 (m, 2H); 2,54 – 2,36 (m, 8H); 2,14 (s, 3H); 2,03 – 1,27 (m, 15H); 1,19 – 1,14 (m, 6H); 1,12 – 0,99 (m, 5H); 0,89 – 0,85 (m, 1H); 0,81 – 0,72

(m, 7H); 0,58 (d, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 173,82; 173,46; 172,03; 170,77; 164,32; 161,92; 150,88; 135,71; 132,35; 132,27; 129,80; 128,05; 127,22; 125,52; 116,10; 115,89; 70,98; 69,81; 67,04; 56,56; 55,32; 51,16; 44,39; 41,25; 39,42; 39,00; 37,67; 36,13; 31,82; 31,36; 25,60; 25,53; 23,80; 21,22; 20,99; 20,64; 18,99; 16,01; 15,59; 10,86. Massa (ESI) m/z: 828,4 [M + H]⁺, 850,4 [M + Na]⁺.

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-((R)-tetraidrofuranil-2)metil)pentanamido)pentil) tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24g). Schiuma giallina. Resa: 63%. *R_f* = 0,31 (diclorometano/metanolo 90/10). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,07 (s, 1H); 7,25 – 7,21 (m, 2H); 6,99 6,93 (m, 2H); 5,90 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H); 5,02 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H); 4,34 – 4,30 (m, 1H); 4,12 – 3,95 (m, 3H); 3,77 – 3,71 (m, 1H); 3,10 -3,07 (m, 2H); 2,91 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H); 2,56 – 2,33 (m, 7H); 2,16 (s, 3H); 2,05 - 1,85 (m, 8H); 1,80 – 1,48 (m, 8H); 1,45 - 1,24 (m, 2H); 1,19 – 1,13 (m, 3H); 1,04 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); 1,00– 0,95 (m, 3H); 0,92 – 0,86 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 177,83; 176,74; 172,02; 170,38; 169,31; 164,38; 162,92; 161,97; 151,10; 135,85; 132,33; 132,26; 116,14; 115,92; 77,90; 69,36; 69,18; 67,79; 56,47; 55,22; 53,36; 51,17; 44,35; 43,52; 41,20; 38,89; 38,03; 37,05; 35,00; 33,88; 31,30; 31,14; 29,72; 26,84; 25,84; 25,49; 21,15; 21,00; 18,85; 16,21; 11,06; 9,64; Massa (ESI) m/z: 816,8 (M⁺+H⁺), 838,8 (M⁺+Na).

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)pentanamido)pentil) tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24h). Schiuma bianca. Resa: quantitativa. *R_f* = 0,52 (diclorometano/metanolo 9/1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,14 (s, 1H); 7,26 – 7,22 (m, 2H); 6,98 – 6,93 (m, 2H); 5,81 (dd, *J* = 11,0; 2,4 Hz, 1H); 4,74 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 4,40 – 4,33 (m, 1H); 3,99 – 3,88 (m, 2H); 3,65 (dd, *J* = 15,2; 7,1 Hz, 2H); 3,37 – 3,35 (m, 2H); 3,23 - 3,19 (m, 2H); 2,96 (dd, *J* = 15,2; 6,4 Hz, 1H); 2,91 – 2,89 (m, 2H); 2,64 – 2,57 (m, 2H); 2,51 (s, 3H); 2,43 – 2,36 (m, 2H); 2,18 (s, 3H); 2,02 – 1,97 (m, 3H); 1,79 – 1,73 (m, 4H); 1,70 – 1,61 (m, 4H); 1,60 – 1,39 (m, 3H); 1,38 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); 1,15 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H); 1,06 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 0,97 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); 0,94 – 0,90 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 172,04; 171,93; 164,35; 161,94; 151,04; 135,85; 132,30; 132,23; 125,39; 116,16; 115,95; 71,89; 69,25; 68,76; 56,36; 55,92; 55,62; 51,16; 44,09; 43,90; 41,41; 39,62; 38,19; 37,24; 32,73; 32,62; 32,07; 31,01; 25,33; 25,13; 23,25; 22,52; 21,16; 21,05; 19,05; 16,76; 11,19. Massa (ESI) m/z: 830.5 (M⁺+H⁺), 852.4 (M⁺+Na).

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-4-metil-3-((2S,3S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)-N-fenilpentanamido)pentil)tiazolo-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24i). Schiuma bianca. Resa: 75%. $R_f = 0,25$ (diclorometano/metanolo 95/5). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,16 (s, 1H); 7,60 – 7,37 (m, 5H); 7,19 (dd, $J = 8,6; 5,4$ Hz, 2H); 6,85 (t, $J = 8,7$ Hz, 2H); 6,13 (dd, $J = 11,2; 2,2$ Hz, 1H); 5,52 – 5,46 (m, 1H); 4,67 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H); 4,42 – 4,35 (m, 1H); 4,25 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H); 3,76 (dd, $J = 12,0; 3,2$ Hz, 1H); 3,50 – 3,45 (m, 1H); 3,08 – 3,01 (m, 1H); 2,93 – 2,81 (m, 2H); 2,79 (s, 3H); 2,55 – 2,41 (m, 2H); 2,35 – 2,27 (m, 1H); 2,10 – 2,00 (m, 2H); 1,98 (s, 3H); 1,95 – 1,47 (m, 10H); 1,16 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H); 1,12 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H); 1,09 – 0,99 (m, 1H); 0,94 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); 0,82 (t, $J = 7,7$ Hz, 3H); 0,78 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 174,27; 171,98; 171,90; 169,64; 164,26; 163,01; 161,85; 150,69; 135,52; 135,49; 132,23; 132,15; 131,93; 131,77; 131,11; 130,59; 130,39; 116,08; 115,86; 71,37; 68,17; 57,63; 56,30; 51,05; 43,21; 41,57; 40,51; 39,43; 37,85; 31,34; 30,27; 24,61; 24,20; 22,46; 21,75; 20,92; 20,34; 19,08; 16,81; 11,83. Massa (ESI) m/z : 809,3 (M^+H^+), 831,3 (M^+Na).

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-3-((2S, 3R) -N-(2-metossietil)-3-metil-2-(1-metilpiperidin-2-carbossamido) pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-2-metil-5-fenilpentanoico (24j). Schiuma bianca. Resa: 78%. $R_f = 0,28$ (diclorometano/metanolo 95/5). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,07 (s, 1H); 7,31 – 7,05 (m, 5H); 5,84 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H); 4,38 (m, 1H); 4,23 (m, 2H); 3,70 – 3,61 (m, 2H); 3,22 (s, 3H); 3,12 – 3,06 (m, 1H); 2,99 – 2,88 (m, 3H); 2,57 – 2,48 (m, 2H); 2,42 – 2,30 (m, 5H); 2,22 (s, 3H); 2,09 – 1,81 (m, 5H); 1,83 – 1,51 (m, 6H); 1,39 – 1,30 (m, 1H); 1,26 – 1,09 (m, 4H); 1,03 (d, $J = 17,3$, 3H); 1,01 – 0,87 (m, 6H); 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 171,97; 171,69; 162,78; 150,98; 139,68; 130,57; 129,38; 127,44; 73,08; 71,40; 69,83; 59,16; 56,44; 55,09; 51,05; 44,37; 41,99; 38,03; 36,27; 31,63; 31,24; 28,03; 25,62; 25,57; 23,69; 21,06; 20,92; 20,53; 18,78; 16,41; 11,03; 11,02. Massa (ESI) m/z : 772,4 (M^+H^+), 794,4 (M^+Na).

Acido (2S,4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetossi-3-((2S,3R)-N-(2-metossietil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carbossamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carbossamido)-5-(4-fluorofenil)-2-metilpentanoico (24k). Schiuma bianca. Resa: 95 %. $R_f = 0,28$ (diclorometano/metanolo 95/5). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,09 (s, 1H); 7,24 – 7,21 (m, 2H); 6,97 – 6,92 (m, 2H); 5,82 (d, 1H); 4,79 (d, 1H); 4,40 – 4,19 (m, 2H); 3,66 – 3,57 (m, 2H); 3,27 (s, 3H); 3,14 – 3,00 (m, 2H); 2,89 (m, 2H); 2,58 – 2,32 (m, 7H); 2,15 (s, 3H); 2,03 – 1,89 (m, 5H); 1,80 – 1,53 (m, 7H); 1,22 – 1,10 (m, 4H); 1,04 (d, 3H); 1,00 – 0,87 (m, 6H); 0,82 (d, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ : 172,10; 171,78; 164,36; 161,95; 150,96; 135,82; 132,31;

116,12; 115,91; 73,13; 71,44; 69,69; 59,22; 56,50; 55,23; 51,21; 44,30; 41,29; 38,04; 36,29; 31,69; 31,26; 25,69; 25,50; 23,65; 21,14; 21,01; 20,59; 18,99; 16,46; 11,09; Massa (ESI) m/z: 790,5 (M⁺+H⁺), 812,4 (M⁺+Na⁺).

7.6 REFERENZE

- 1 L Protiva M., Seidlová V., Svátek E., Hradil F. Benzocycloheptanes and heterocyclic analogues as potential drugs. II. Amines of 8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzoxepin series. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1972**, *37*, 868-886.
- 2 Loriga G., Manca I., Murineddu G., Chelucci G., Villa S., Gessi S., Toma L., Cignarella G., Pinna G.A Synthesis of 3,6-diazabicyclo[3.1.1]heptanes as novel ligands for the opioid receptors. *Bioorg.Med.Chem.* **2006**, *14*, 676-691.
- 3 Audouze K., Østergaard Nielsen E., Olsen G.M., Ahring P., Jorgensen T.D., Peters D., Liljefors T., Balle T. New ligands with affinity for the $\alpha_4\beta_2$ subtype of nicotinic acetylcholine receptors. Synthesis, receptor binding, and 3D-QSAR modeling. *J.Med.Chem.* **2006**, *49*, 3159-3171.
- 4 Filosa R., Peduto A., de Caprariis P., Saturnino C., Festa M., Petrella A., Pau A., Pinna G.A., La Colla P., Busonera B., Loddo R. Synthesis and antiproliferative properties of N_{3/8}-disubstituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane analogues of 3,8-bis[2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridin-4-yl]methyl-piperazine, *Eur.J.Med.Chem.* **2007**, *42*, 293-306.
- 5 Pinna G.A., Murineddu G., Curzu M.M., Villa S., Vianello P., Borea P.A., Gessi S., Toma L., Colombo D., Cignarella G. Synthesis, modelling, and μ -opioid receptor affinity of N-3(9)-arylpropenyl-N-9(3)-propionyl-3,9-diazabicyclo[3.3.1]nonanes. *Il Farmaco.* **2000**, *55*, 553-562.
- 6 Olimpieri F., Tambaro S., Fustero S., Lazzari P., Sanchez-Roselló M., Pani L., et al. Synthesis and enzymatic evaluation of novel partially fluorinated thiol dual ACE/NEP inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2009**, *19*, 4715-4719.
- 7 Jagodzinska M., Huguenot F., Zanda M. Studies on a three-step preparation of β -fluoroalkyl acrylates from fluoroacetic esters. *Tetrahedron.* **2007**, *63*, 2042-2046.
- 8 Gomez-Monterrey I., Turcaud S., Lucas E., Bruetschy L., Roques B.P., Fournié-Zaluski M.C. Exploration of neutral endopeptidase active site by a series of new thiol-containing inhibitors. *J.Med.Chem.* **1993**, *36*, 87-94.

- 9 Lazzari P., Loriga G., Ruiu S., Manca I., Pani L., Pinna G.A. Diazabicyclic compound as opioid receptor agonists. EP2,149,575. **2009**.
- 10 Hughes R.A., Thompson S.R., Alcaraz L., Moody C.J. Total synthesis of the thiopeptide antibiotic Amythiamicin D. JACS. **2005**, *127*, 15644-15651.
- 11 Sani M., Fossati G., Huguenot F., Zanda M. Total synthesis of tubulysins U and V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2007**, *46*, 3526-352.
- 12 Peltier H.M., McMahon J.P., Patterson A.W., Ellman J.A. The total synthesis of Tubulysin D. JACS. **2006**, *128*, 16018-16019.
- 13 Grigg R., Markandu J., Perrio T., Sumndrakumar S., Wamock W.J. X=Y-ZH systems as potential 1,3-dipoles Part 35. Generation of nitrones from oximes. Class 3 Processes. Tandem intramolecular Michael Addition (1,3-azaprotio cyclotransfer) -intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Tetrahedron.* **1992**, *48*, 6929-6952.

RINGRAZIAMENTI

Questa ricerca è il risultato di una proficua collaborazione tra il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari e le società PharmaNess Sca rl e KemoTech Srl. Intendo quindi ringraziare il management di entrambe le società per aver messo a disposizione parte del know-how aziendale e le proprie strutture di ricerca per la realizzazione di questo lavoro di tesi.

Voglio soprattutto ringraziare il Professor Gérard Aimè Pinna per avermi dato la possibilità di affrontare tematiche di ricerca di particolare interesse, con un approccio multidisciplinare, contribuendo ad accrescere significativamente le mie competenze nel settore della medicinal chemistry e della tecnologia farmaceutica. Questi ringraziamenti vanno non solo al Professore, ma all'amico che mi ha seguito nell'ambito di questo lavoro di tesi oltre che nella mia crescita scientifica e professionale di questi ultimi dieci anni.

Ringrazio inoltre tutti i colleghi e amici che mi hanno supportato a vario titolo nella realizzazione di questa ricerca, con particolare riferimento a:

Gabriele Murineddu e la Professoressa M. Michela Curzu, relativamente alla sintesi dei composti cannabinoidegici;

Giovanni Loriga e Ilaria Manca, per la sintesi di nuovi oppioidi;

Matteo Falzoi, Stefania Ruiu, Simone Tambaro e Giorgio Marchese, per la valutazione delle proprietà farmacologiche dei nuovi analgesici e delle corrispondenti formulazioni;

Paolo Fadda, relativamente alla caratterizzazione delle microemulsioni;

Matteo Zanda, Monica Sani, Marco Spiga e Igor Usai, per la sintesi dei derivati delle tubulisine;

Nadia Zaffaroni e Marco Folini per la valutazione dell'attività delle tubulisine.

Intendo inoltre esprimere la mia gratitudine a tutti quelli che non ho citato, ma che mi hanno comunque supportato a vari livelli sul lavoro e nella vita in genere in questi tre anni, dandomi la possibilità di realizzare anche questo lavoro di tesi.