



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari – XXXIII CICLO
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
SSD CHIM/06

1,2,4-OSSADIAZOLI: UTILI SCAFFOLD NEL DESIGN DI NUOVI FARMACI

IL DOTTORE
Dott.ssa PAOLA MARZULLO

IL COORDINATORE
Prof.ssa PATRIZIA DIANA

IL TUTOR
Prof. ANTONIO PALUMBO PICCIONELLO

IL CO TUTOR
Prof.ssa SONYA VASTO

CICLO XXXIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2021

Acknowledgements

Grazie al Professore Antonio Palumbo Piccionello, tutor e guida durante questo meraviglioso percorso, che ha creduto in me, motivandomi ed insegnandomi ad amare il mondo della ricerca, attraverso la sua costante presenza e la semplicità nei rapporti umani.

Grazie alla Professoressa Sonya Vasto, co-tutor di questo progetto, per aver reso ancor più interessante la materia del mio studio, attraverso le sue conoscenze e la sua costante disponibilità.

Grazie al Professore Rakez Kayed, mio mentore durante il periodo di studi a Galveston, che ha creduto tanto in me, consentendomi ed onorandomi di collaborare con lui nello studio dei complessi meccanismi delle patologie neurodegenerative.

Grazie al Professore Andrea Pace, punto di riferimento per i suoi preziosi consigli professionali e i suoi insegnamenti di vita.

Grazie alla Dottoressa Filippa Lo Cascio e al Dottore Mauro Montalbano, che mi hanno supportata fin dall'inizio con la loro amicizia e la loro complicità durante un percorso che, senza di loro, non sarebbe stato così interessante.

Ringrazio Michela e il piccolo Manfredi, Anna, Salvo, Pietro, Michela e Tommaso, per aver condiviso ogni istante della mia esperienza a Galveston, divenendo essenziali nella mia quotidianità, arricchita dai loro sorrisi e da tutti i bei momenti che porterò sempre con me.

Grazie a tutti i colleghi di laboratorio presso l'Università di Palermo, che hanno condiviso con me ogni giorno di questo triennio, rendendolo piacevole e ricco di amicizia.

Grazie a Luca che mi sprona sempre a volare in alto non facendomi mai mancare la sua presenza, il suo supporto e il suo amore.

Grazie alla mia famiglia che mi è sempre stata vicina, senza il loro sostegno e i loro incoraggiamenti non sarei mai potuta arrivare fin qui.

INDICE

PREMESSA	6
CAPITOLO I - 1,2,4-OSSADIAZOLO: SINTESI, REATTIVITÀ ED APPLICAZIONI BIOLOGICHE	7
1.1 INTRODUZIONE	7
1.2 SINTESI DEGLI 1,2,4-OSSADIAZOLI	8
1.3 REATTIVITÀ DEGLI 1,2,4-OSSADIAZOLI	10
1.3.1 Reazioni di riarrangiamento termico	11
1.3.2 Riarrangiamenti fotochimici	11
1.3.3 Sostituzioni nucleofile aromatiche (S _N Ar) e riarrangiamento ANRORC	12
1.4 APPLICAZIONI BIOLOGICHE DEGLI 1,2,4-OSSADIAZOLI	13
1.4.1 Agenti antimicrobici	14
1.4.2 Agenti antitumorali	15
1.4.3 Agenti analgesici ed antiinfiammatori	17
1.4.4 Agenti neuroprotettivi	18
1.4.5 Agenti antidiabetici	19
1.4.6 Promoters del read-through	20
1.5 BIBLIOGRAFIA	22
CAPITOLO II – SINTESI DI DERIVATI CHINAZOLINONICI E (DI)-ACILGUANIDINICI TRAMITE REAZIONE DI RIDUZIONE DI 1,2,4-OSSADIAZOLI	26
2.1 INTRODUZIONE	26
2.1.1 Il nucleo chinazolinonico	26
2.1.2 Metodi di sintesi di derivati chinazolinonici	27
2.1.2.1 Sintesi di chinazolinonici da 2-ammino benzammide e 2-alo-benzammide	27
2.1.2.2 Sintesi di chinazolinoni da acido-2-alo-benzoico	29
2.1.2.3 Sintesi di chinazolinonici dall'anidride isatoica	29
2.1.2.4 Sintesi di chinazolinoni da orto-ammino benzonitrile	30
2.1.2.5 Sintesi di chinazolinoni da indoli e loro derivati	31
2.1.3 Applicazioni farmacologiche dei chinazolinoni	31
2.1.3.1 Agenti antitumorali	31
2.1.3.2 Agenti antibatterici	32
2.1.3.3 Agenti antimalarici ed antitubercolari	34
2.1.3.4 Agenti anticonvulsivanti e sedativo ipnotici	35
2.1.3.5 Agenti antiinfiammatori, analgesici ed antiossidanti	35
2.1.3.6 Agenti neuroprotettivi	36
2.1.3.7 Agenti antiiperlipidemici	37
2.1.3.8 Agenti antidiabetici	38
2.1.4 Il gruppo guanidinico	40
2.1.5 Metodi di sintesi di (di)-acilguanidine	41
2.1.6 Applicazioni farmacologiche delle (di)-acilguanidine	42
2.1.6.1 Agenti neuroprotettivi – Inibitori di BACE 1	42
2.1.6.2 Agenti Antiipertensivi – Inibitori dei canali del sodio	43
2.1.6.3 Agenti antivirali	44
2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	45
2.2.1 Ottimizzazione del nuovo metodo di riduzione degli 1,2,4-ossadiazoli	45
2.2.2 Sintesi dei substrati 1,2,4-ossadiazoli e riduzione a 4-(1H)-chinazolinoni	46
2.2.3 Riduzione degli 1,2,4-ossadiazoli a (di)-acilguanidine	49

2.2.4 Valutazione biologica dei precursori 1,2,4-ossadiazolici e dei prodotti di riduzione	50
2.2.4.1 Valutazione della citossicità	51
2.2.4.2 Valutazione dello stato redox intracellulare	52
2.2.4.3 Valutazione dell'attività enzimatica della dipeptidil-peptidasi IV	53
2.2.4.4 Valutazione dell'attività enzimatica dell' α -glucosidasi	55
2.3 CONCLUSIONI	56
2.4 MATERIALI E METODI	57
2.4.1 Chimica	57
2.4.2 Biologia	67
2.5 BIBLIOGRAFIA	69
CAPITOLO III – SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI 1,2,4-OSSADIAZOLI POTENZIALI MODULATORI DEGLI CHAPERONI MOLECOLARI	75
3.1 INTRODUZIONE	76
3.1.1 Gli chaperoni molecolari e la patologia diabetica	76
3.1.2 Gli chaperoni molecolari e i disordini neurodegenerativi	77
3.1.2.1 Hsp70 e Hsp90 e il loro ruolo biologico nella malattia di Alzheimer	77
3.1.2.2 Hsp60 e la malattia di Alzheimer	81
3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	83
3.2.1 Sintesi di derivati 1,2,4-ossadiazolici di tipo fenossiacetanilidico	83
3.2.2 Valutazione biologica	85
3.2.2.1 Valutazione della vitalità cellulare	85
3.2.2.2 Valutazione dell'espressione intracellulare di Hsp70, Hsp60 e Tau	87
3.2.2.3 Valutazione della colocalizzazione Hsp60-Tau e Hsp70-Tau	89
3.2.2.4 Saggio di legatura di prossimità (PLA)	93
3.2.2.5 Saggio di refolding della luciferasi	95
3.3 CONCLUSIONI	96
3.4 MATERIALI E METODI	97
3.4.1 Chimica	97
3.4.2 Biologia	102
3.5 BIBLIOGRAFIA	107
CAPITOLO IV – PROTEASI DI SARS-CoV-2 E DESIGN DI NUOVI INIBITORI	110
4.1 INTRODUZIONE	110
4.1.1 Struttura della proteasi di SARS-CoV-2	111
4.1.2 Inibitori della proteasi di SARS-CoV-2	112
4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	114
4.2.1 Sintesi dei composti 1,3,4,5 e 7	115
4.2.2 Saggio di inibizione in vitro della M ^{PRO} di SARS-CoV-2	116
4.2.3 Valutazione dell'equilibrio dimero-monomero di M ^{PRO} in presenza degli inibitori	118
4.3 CONCLUSIONI	121
4.4 MATERIALI E METODI	122
4.5 BIBLIOGRAFIA	124
CURRICULUM VITAE	125

PREMESSA

L'1,2,4-ossadiazolo è il principale protagonista di questo lavoro di tesi. Nell'ambito dell'attività di ricerca svolta durante il triennio di Dottorato la chimica dell'1,2,4-ossadiazolo è stata utilizzata sia per la sintesi di nuovi 1,2,4-ossadiazoli bioattivi che per la sintesi di molecole bioattive di cui l'1,2,4-ossadiazolo è il precursore.

La discussione inizia con un primo capitolo introduttivo sull'1,2,4-ossadiazolo. Nel capitolo successivo viene illustrata la possibilità di sfruttare l'1,2,4-ossadiazolo per la sintesi di altre molecole bioattive come i chinazolinoni e i composti (*di*)-acilguanidinici. Gli ultimi due capitoli vedono l'1,2,4-ossadiazolo come nucleo centrale di molecole di interesse biologico. In particolare, nel terzo capitolo vengono riportati derivati 1,2,4-ossadiazolici con potenziale attività neuroprotettiva. L'ultimo capitolo è incentrato sulla sintesi e la valutazione biologica di nuovi derivati 1,2,4-ossadiazolici ad attività antivirale contro il coronavirus SARS-CoV-2, responsabile dell'attuale epidemia COVID 19.

CAPITOLO I

1,2,4-ossadiazolo: sintesi, reattività e applicazioni biologiche

In questo capitolo introduttivo vengono riportati i principali metodi di sintesi dei derivati 1,2,4-ossadiazolici e i principali riarrangiamenti che li vedono coinvolti. Inoltre, sono discusse le recenti applicazioni biologiche del nucleo 1,2,4-ossadiazolico.

1.1 Introduzione

Gli ossadiazoli sono eterocicli aromatici pentatomici contenenti due atomi di azoto e uno di ossigeno. Questi atomi possono avere diversa distribuzione nell'anello per generare 1,2,4-ossadiazoli, 1,3,4-ossadiazoli, 1,2,5-ossadiazoli o 1,2,3-ossadiazoli. La maggior parte degli 1,2,4-ossadiazoli ha la struttura mostrata in **Figura 1**, in cui entrambe le posizioni C (3) e C (5) sono sostituite. Considerando il bioisosterismo di questo eterociclo con esteri e ammidi, esso viene ampiamente sfruttato in chimica farmaceutica. Lo ritroviamo, infatti, in numerosi composti dotati di svariate attività biologiche.

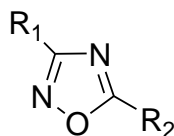
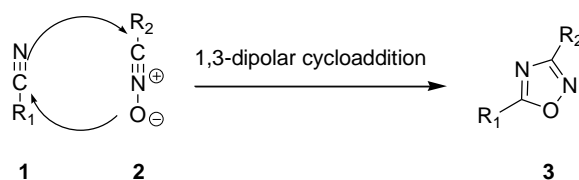


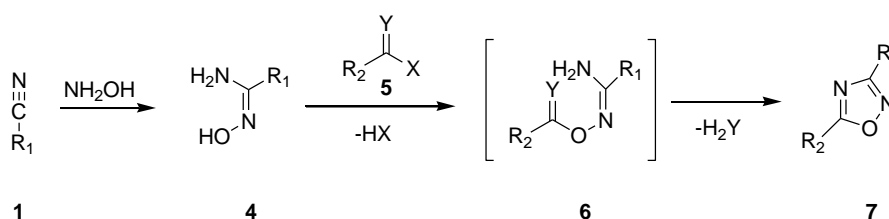
Figura 1

1.2 Sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli

Nel 1884, Tiemann e Krüger hanno sintetizzato, per la prima volta, il nucleo 1,2,4-ossadiazolico.¹ Nel classico approccio di sintesi, l'1,2,4-ossadiazolo disostituito è ottenuto attraverso una cicloaddizione dipolare 1-3 tra il nitrile **1** e l'ossido di nitrile **2** (**Schema 1**). Il metodo maggiormente usato per l'ottenimento di questi versatili eterocicli è l'eterociclizzazione tra l'ammidossima **4** e il derivato acido **5** (**Schema 2**). In alcuni casi, la *O*-acilammidossima **6** può essere isolata prima dello step finale di ciclizzazione.¹ Il sostituente R₁ del nitrile di partenza si trova in posizione C (5) quando l'anello ossadiazolico è ottenuto attraverso una cicloaddizione dipolare 1-3. Attraverso la via dell'ammidossima, dallo stesso nitrile **1**, può essere ottenuto l'ossadiazolo **7** con il gruppo R₁ in posizione C (3).



Schema 1

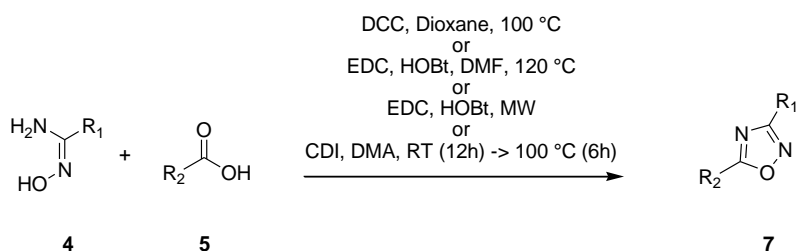


Schema 2

La cicloaddizione dipolare 1-3 è stata classificata come una reazione [3+2] ad indicare il numero di componenti necessari nei precursori per la formazione dell'1,2,4-ossadiazolo. Invece, la via dell'ammidossima può essere considerata un approccio [4+1]. Quattro atomi derivano dall'ammidossima **4**, mentre il derivato acido **5** costituisce la fonte dell'altro atomo.

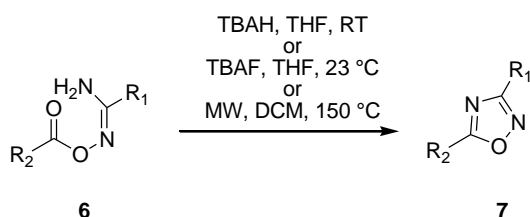
Nella via sintetica [4+1], l'ammidossima è fatta reagire con acidi carbossilici, o loro derivati, e la reazione procede senza isolamento dell'intermedio *O*-acilammidossima. Gli acidi carbossilici **5** (**Schema 3**) sono attivati *in situ* usando vari reagenti di accoppiamento come la dicicloesilcarbodiimmide (DCC)², 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide (EDC)³ o il carbonildiimidazolo (CDI).⁴ La reazione è condotta sotto varie condizioni, a temperatura

ambiente o ad alta temperatura, e usando differenti solventi. Le reazioni solvent-free⁵ e quelle catalizzate dalle microonde⁶ rappresentano una valida alternativa per condurre questa reazione.



Schema 3

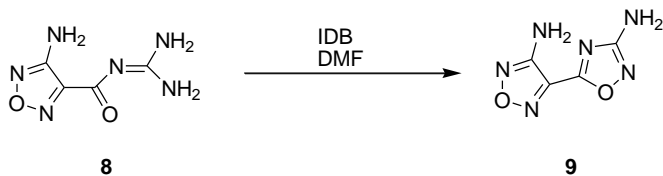
Gli 1,2,4-ossadiazoli possono essere sintetizzati partendo da un composto a cinque atomi tramite una reazione di ciclo deidratazione [5+0]. In questo approccio, l'anello ossadiazolico può essere ottenuto fondendo o riscaldando a refluxo il precursore *O*-acilamidossima **6** in differenti solventi di reazione come il toluene, la piridina o la DMF. Differenti catalizzatori sono stati usati nella ciclizzazione dei precursori a catena aperta per evitare l'uso di condizioni di reazione drastiche e la formazione di prodotti secondari (**Schema 4**). Il Tetrabutylammonio idrossido (TBAH) è un efficiente catalizzatore per la sintesi di 1,2,4-ossadiazoli 3-5 disostituiti partendo dalla *O*-acilamidossima. Esso permette di condurre la reazione a temperatura ambiente ed in THF.⁷ Il Tetrabutylammonio fluoruro (TBAF) è stato usato come catalizzatore ma, nella sintesi in larga scala, lo ione fluoruro può dare corrosione dei reattori.⁸ Anche l'applicazione dell'energia delle microonde è stata riportata come un metodo alternativo sfruttabile per la ciclizzazione dei derivati acilamidossima.⁹



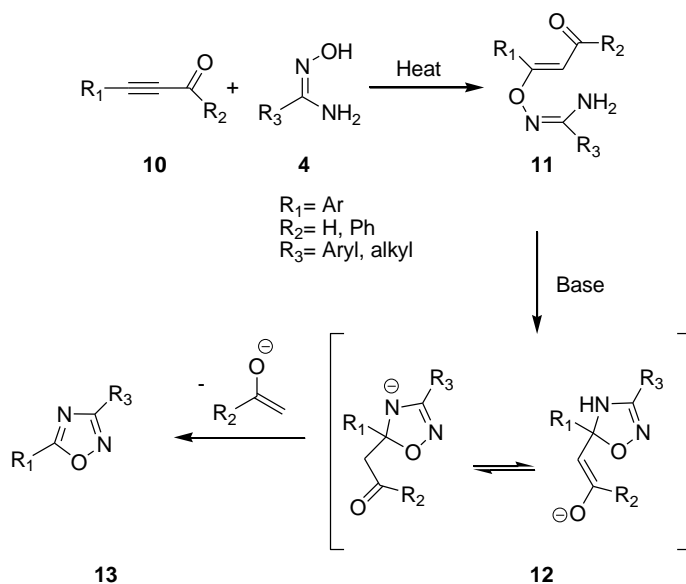
Schema 4

L'anello 1,2,4-ossadiazolico può essere ottenuto anche per ciclizzazione di altri precursori a catena aperta tra cui le acilguanidine¹⁰ e composti α - β alchidici.¹¹ L'acilguanidina **8** (**Schema 5**), in presenza di iodobenzene di-acetato (IBD), va incontro ad una ciclizzazione ossidativa per generare l'1,2,4-ossadiazolo **9**. Il composto α - β alchidico **10** (**Schema 6**) subisce,

in una reazione Micheal-like, attacco nucleofilo da parte dell'ammidossima **4** per dare l'intermedio **12**. Quest'ultimo, in condizioni basiche, elimina lo ione enolato formando il derivato 1,2,4-ossadiazolico **13**.



Schema 5



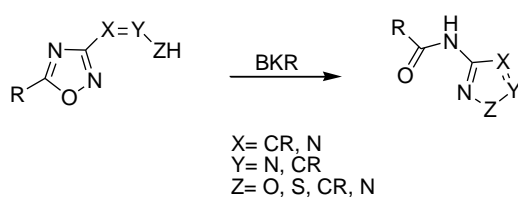
Schema 6

1.3 Reattività degli 1,2,4-ossadiazoli

Gli 1,2,4-ossadiazoli sono composti eterociclici multifunzionali, che possono dar luogo a differenti reazioni.¹²⁻¹⁴ L'atomo N (3) presenta caratteristiche nucleofile, mentre gli atomi di carbonio possiedono caratteristiche elettrofile. Inoltre, il nucleo 1,2,4-ossadiazolico possiede bassa aromaticità e il legame O-N può essere ridotto attraverso apertura dell'anello. Queste ultime due caratteristiche spiegano i riarrangiamenti termici e fotochimici che possono dare luogo ad altri sistemi eterociclici.

1.3.1 Reazioni di riarrangiamento termico

Il riarrangiamento termico di Boulton-Katritzky (BKR) costituisce una delle trasformazioni del nucleo 1,2,4-ossadiazolico maggiormente investigata (**Schema 7**).¹⁵ Questa reazione consiste in una sostituzione nucleofila intramolecolare. In questo riarrangiamento, sono coinvolti l'atomo nucleofilo Z, facente parte della catena laterale a tre atomi, e l'atomo elettrofilo N (2) dell'anello 1,2,4-ossadiazolico. L'alta elettrofilia dell'azoto in posizione 2 è dovuta all'alta polarizzabilità ed alla facile rottura del legame O-N. Quando l'atomo Z attacca l'N (2), l'ossigeno agisce da gruppo uscente. Il risultato finale è la rottura del legame debole O-N e la formazione di legami più stabili C-N, N-N o S-N.



Schema 7

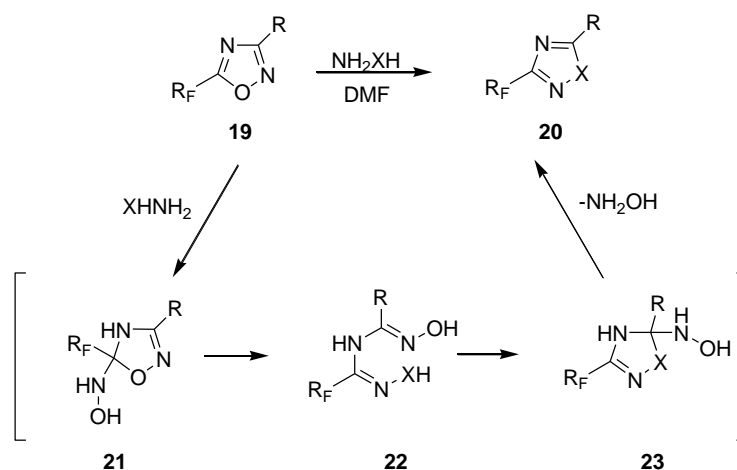
La reazione BKR può avvenire sotto diverse condizioni e con la partecipazione di differenti catene laterali. Il riarrangiamento Boulton-Katritzky di 1,2,4-ossadiazoli, recanti una sequenza CNN (di tipo idrazonico) nella catena laterale, può generare 1,2,3-triazoli.¹⁵ D'altra parte, gli 1,2,4-triazoli si ottengono da *N*-1,2,4-ossadiazol-3-il-idrazoni aventi una sequenza NNC o NCN nella catena laterale.¹⁶ La reazione BKR è stata studiata anche per la preparazione di imidazoli, a partire da 1,2,4-ossadiazoli, con differenti sequenze, NCC o CNC, nella catena laterale.^{17, 18} Anche sistemi eterociclici non aromatici, come pirazoline ed isossazoline, possono essere sintetizzati tramite BKR. I substrati di partenza sono 1,2,4-ossadiazoli sostituiti con una catena laterale satura.¹⁹

Tra i riarrangiamenti termici, vi è la trasformazione definita Migration-Nucleophilic-Attack-Cyclization (MNAC), il cui meccanismo è alla base della trasformazione dei 3-acilammino 1,2,4-ossadiazoli nei corrispondenti derivati 2-acilammino-1,3,4-ossadiazoli.²⁰

1.3.2 Riarrangiamenti fotochimici

Negli ultimi anni, le reazioni fotochimiche degli 1,2,4-ossadiazoli sono state oggetto di numerosi studi.²¹ Il legame labile O-N è coinvolto in rottura foto-indotta e da inizio a riarrangiamenti intramolecolari.²² La formazione di 1,3,4-ossadiazoli **15** da 3-ammino-1,2,4-

idrossilammina²⁸ attaccano il carbonio elettrofilo in posizione 5 producendo un intermedio a catena aperta **22**. Questo intermedio ciclizza per attacco sulla posizione C (3) dell'anello ossadiazolico. Quindi, l'1,2,4-ossadiazolo agisce come 1,3-dielettrofilo e il riarrangiamento ANRORC porta alla formazione dell'eterociclo a cinque membri **20** ([3+2] ANRORC). Il prodotto finale è un triazolo o il regioisomero dell'1,2,4-ossadiazolo quando sono usati rispettivamente idrazina o idrossilammina come agenti nucleofili.



Schema 10

Gli 1,2,4-ossadiazoli sostituiti con un carbonile in posizione C (3) possono essere considerati come 1,4-dielettrofilo e possono anch'essi dare reazione ANRORC, portando alla formazione di eterocicli a sei membri ([4+2] ANRORC).²⁹

1.4 Applicazioni biologiche degli 1,2,4-ossadiazoli

Fin dal 1950 è stato messo in evidenza il ruolo biologico dell'1,2,4-ossadiazolo e la sua importanza nel Drug Design.³⁰ L'1,2,4-ossadiazolo Oxolamina (**Figura 2**), riportato nel 1960, è il primo farmaco immesso sul mercato contenente un nucleo 1,2,4-ossadiazolico, esso possiede attività sedativa della tosse.³¹

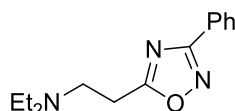


Figura 2

Negli ultimi anni, la chimica farmaceutica ha dato grande importanza al nucleo 1,2,4-ossadiazolico in quanto isostero di gruppi esterei e ammidici. Infatti, è stato considerato come componente farmacofora nello sviluppo di composti di interesse biologico. Le più recenti applicazioni degli 1,2,4-ossadiazoli sono discusse di seguito.

1.4.1 Agenti antimicrobici

Negli ultimi anni, il fenomeno della resistenza dei batteri e dei funghi agli agenti terapeutici in uso ha rappresentato una sfida in ambito clinico.³² Per superare questo problema, i chimici farmaceutici, hanno fatto numerosi studi per lo sviluppo di nuovi agenti antibatterici con un ampio spettro di azione, alta potenza e privi di effetti indesiderati sistemici. Gli 1,2,4-ossadiazoli hanno ricevuto particolare attenzione come agenti antibatterici (**Figura 3**).

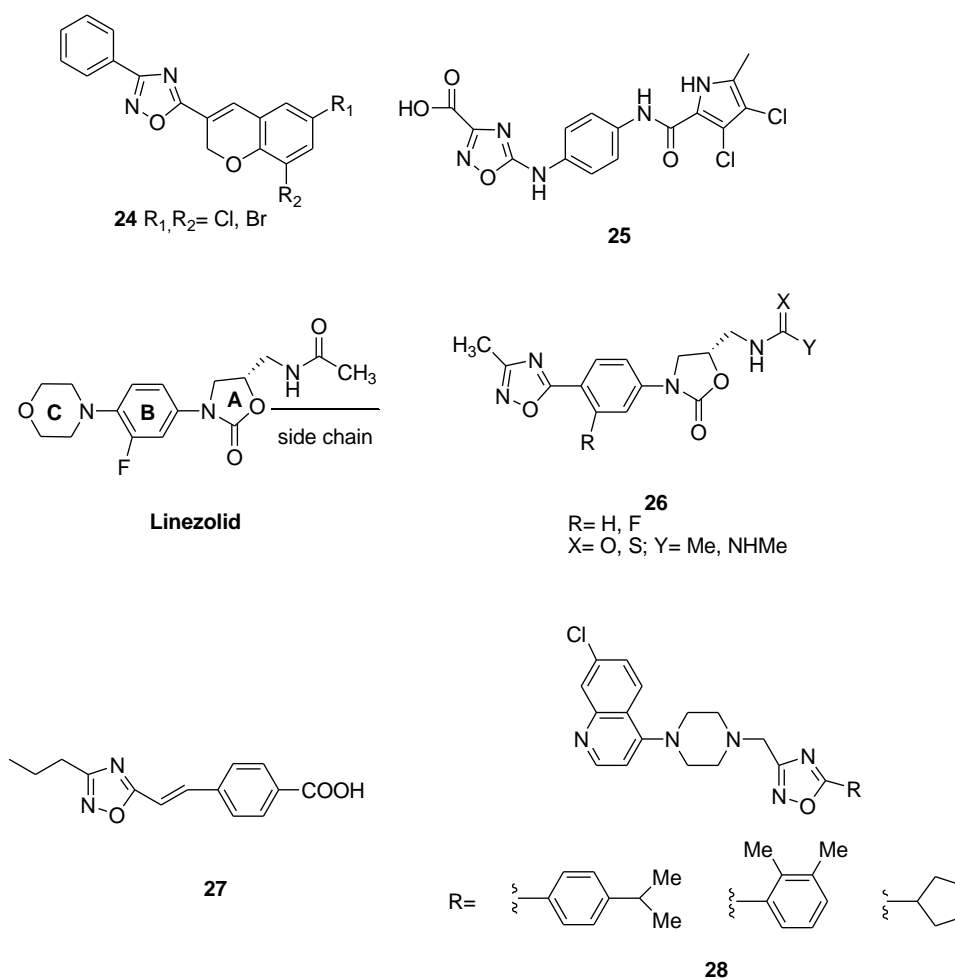


Figura 3

Il derivato **24** è un ibrido costituito da due entità attive: l'ossadiazolo e il cromene. Il cromene conferisce al composto la lipofilia necessaria per l'attraversamento della parete cellulare batterica. Studi in vitro indicano che il composto possiede una buona attività antibatterica su *Escherichia coli* (MTCC614) e *Klebsiella pneumoniae* (MTCC4031). Studi di docking molecolare mostrano che il composto è in grado di interagire con la DNA girasi di *E. Coli* tramite legami a idrogeno.³³ La DNA girasi così come la topoisomerasi IV sono enzimi essenziali per la replicazione del batterio. Anche il composto **25** ha mostrato attività inibitoria sulla DNA girasi di *E. Coli*.³⁴

Lo *Staphylococcus aureus* è un patogeno responsabile di differenti infezioni ma, sfortunatamente, sono stati riportati numerosi casi di resistenza alla meticillina (MRSA-Methicillin Resistant Staphylococcus aureus). Oltre alle infezioni da MRSA, esistono tante infezioni causate da patogeni Gram positivi multiresistenti come gli enterococchi Vancomicina-resistenti. Il *Linezolid*, appartenente alla classe degli ossazolidinoni, è attivo contro numerosi batteri resistenti ad altri farmaci. Per superare la nascente resistenza al *Linezolid*, la sua struttura è stata modificata al fine di ottenere composti con migliore attività. Potenti agenti antibatterici sono stati sintetizzati sostituendo la morfolina del *Linezolid* con un gruppo 3-metil-1,2,4-ossadiazolico (Composto **26**).^{35,36} La sostituzione dell'anello morfolinico con l'anello ossadiazolico ha dato derivati attivi contro *S. aureus* meticillina-sensibile e meticillina-resistente. Studi in silico, hanno mostrato che gli 1,2,4-ossadiazoli *Linezolid-like* legano la subunità ribosomiale U2585 così come fa l'anello morfolinico. La presenza del gruppo acetamidometil o tioacetamidometil nella catena in posizione C (5) è essenziale per l'attività. Al contrario, la presenza di atomi di fluoro sull'anello B non ha effetti sull'attività antibatterica ma riduce la citotossicità. La sostituzione dell'anello ossazolidinonico con un nucleo 1,2,4-ossadiazolico riduce la potenza.³⁷

Gli ossadiazoli **27**³⁸ e **28**³⁹ hanno mostrato potente attività antitubercolare e gli studi di docking molecolare hanno rivelato grande affinità del composto **28** per l'enzima Enoil-ACP reductasi essenziale per la costruzione della parete cellulare del micobatterio.

1.4.2 Agenti antitumorali

Differenti gruppi di ricerca hanno messo in evidenza l'attività citotossica degli 1,2,4-ossadiazoli contro varie linee cellulari (**Figura 4**).

I composti con la struttura generale **29** sono analoghi della Nortopsentina, un'alcaloide isolato dalla spugna marina *Spongosorites ruetzleri*, avente una significativa attività antiproliferativa.⁴⁰ Questi composti sono stati testati contro HCT-116 (linea cellulare di

carcinoma colon rettale) e successivamente contro MCF-7 (linea cellulare di cancro umano al seno), HeLa (linea cellulare di adenocarcinoma alla cervice uterina) e CaCo2 (linea cellulare carcinoma coloretale) mostrando effetto citotossico a concentrazione sub-micromolare. I composti causano arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 e apoptosi.

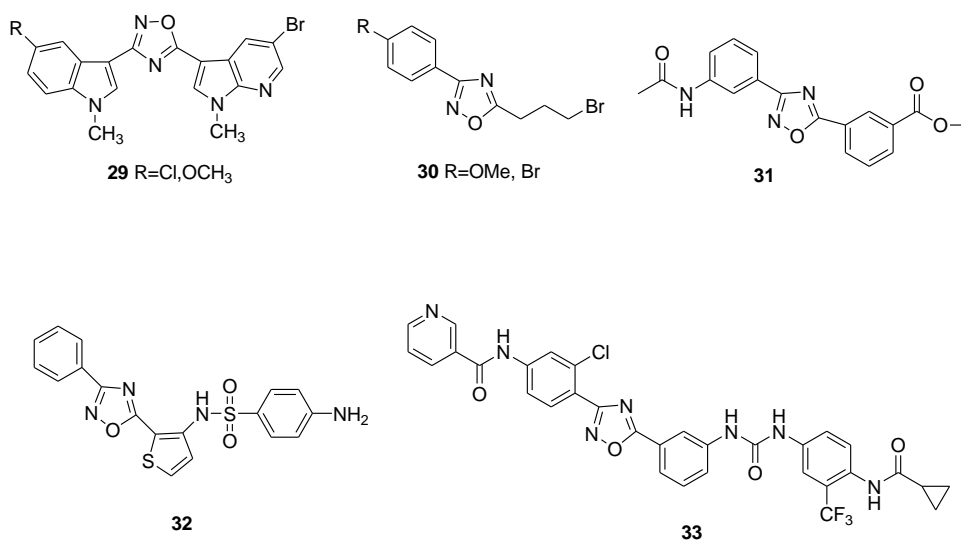


Figura 4

Gli 1,2,4-ossadiazoli **30** sono potenti inibitori della Sirtuina -2 (Sirt-2).⁴¹ Le sirtuine sono una famiglia di lisina deacilasi che agiscono su varie proteine coinvolte in differenti processi biologici, inclusi la sopravvivenza cellulare e il cancro. Il ruolo di Sirt-2 nella progressione tumorale è controverso ma la sua inibizione farmacologica porta ad un effetto antitumorale.

Gli enzimi DNA-topoisomerasi sono responsabili dei cambi topologici del DNA e sono uno dei principali target nella terapia antitumorale. Il composto **31** lega il dominio ATPasico della Topoisomerasi II ed ha dato ottimi risultati nei test di inibizione enzimatica. Inoltre, ha mostrato citotossicità sulle cellule tumorali MCF-7.⁴²

L'anidrasi carbonica (CA) è un enzima over-espresso nei tumori ipossici, come il cancro colon rettale, e la sua inibizione è stata valutata nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Il composto **32**, ottenuto coniugando il motivo solfonamidico con l'anello 1,2,4-ossadiazolico e con un gruppo tiofenico, esercita un'attività inibitrice su CA di cancri ipossici. Inoltre, ha affetto antiproliferativo contro la linea cellulare HCT116; induce l'apoptosi, l'attivazione della caspasi 3, l'over-espressione di ROS e l'inibizione del processo di metastatizzazione.

Il composto **33** sopprime l'espressione dei recettori ad attività Tirosin-chinasica EGFR (Epidermal Grow Factor Receptor) e di C-Met. Essi sono implicati nella oncogenesi e sono over-espressi in diversi tipi di tumori.⁴³

1.4.3 Agenti analgesici e antiinfiammatori

La risposta infiammatoria è un processo multifattoriale che coinvolge numerosi componenti del sistema immunitario.

L'attivazione del fattore nucleare NF- κ B, nelle cellule dell'immunità innata, media l'espressione di fattori pro-infiammatori. Quindi, inibitori del pathway di NF- κ B possono essere considerati potenziali agenti terapeutici nei disordini infiammatori. Il composto **34** (Figura 5), ottenuto coniugando il motivo indolico con il nucleo 1,2,4-ossadiazolico, ha mostrato attività inibitoria su Nf- κ B e ha provocato una riduzione del rilascio di ossido nitrico in cellule stimulate con LPS.⁴⁴

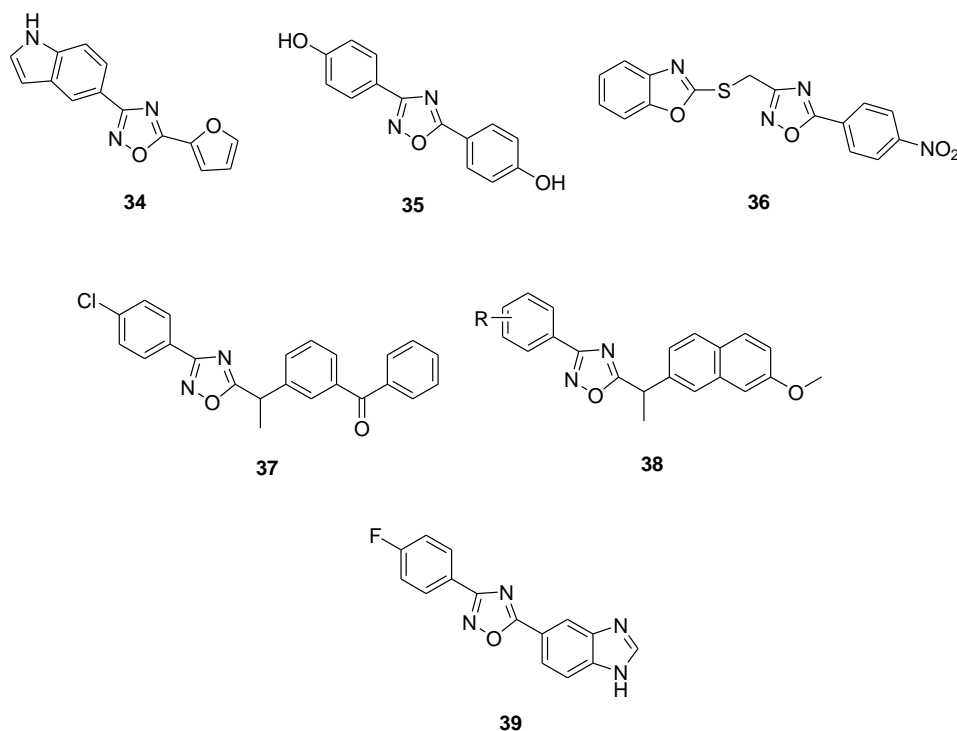


Figura 5

Il composto **35**, analogo del polifenolo ad attività antiossidante Resveratrolo, è stato ottenuto per sostituzione del ponte etilenico del polifenolo con il nucleo 1,2,4-ossadiazolico. Esso mostra un migliore potere antiossidante e antiinfiammatorio rispetto al Resveratrolo.

Possiede un'attività ROS scavenger, riduce il rilascio di fattori pro-infiammatori e inibisce il pathway di Nf-kB.⁴⁵

Lo sviluppo di nuovi agenti antiinfiammatori selettivi verso la isoforma COX2 delle ciclossigenasi rappresenta un'area di ricerca di grande interesse. Il sistema biciclico benzossazolo è stato identificato in differenti inibitori della COX 2. Il derivato **36** con un gruppo benzossazolo legato all'anello ossadiazolico ha mostrato al docking molecolare un ottimo grado di legame con la COX 2 ed è inoltre un potente agente antiossidante.⁴⁶ I derivati **37** e **38** sono analoghi degli inibitori COX 2 selettivi Ketoprofene e Naprossene.^{47,48} In questi derivati il gruppo carbossilato dei farmaci originali è stato modificato per migliorare il profilo di sicurezza e ridurre gli effetti indesiderati. Entrambi hanno mostrato attività antiinfiammatoria con selettività di azione sulla COX 2.

Il composto **39** è un attivatore del Fattore Nucleare Eritroide 2 (Nrf2). Nrf2 è un fattore di trascrizione che, in presenza di stimoli pro-infiammatori, trasloca nel nucleo e favorisce l'espressione di geni protettivi contro lo stress ossidativo.⁴⁹

1.4.4 Agenti neuroprotettivi

Lo scaffold 1,2,4-ossadiazolico è stato identificato anche in diversi composti con attività neuroprotettiva (**Figura 6**).

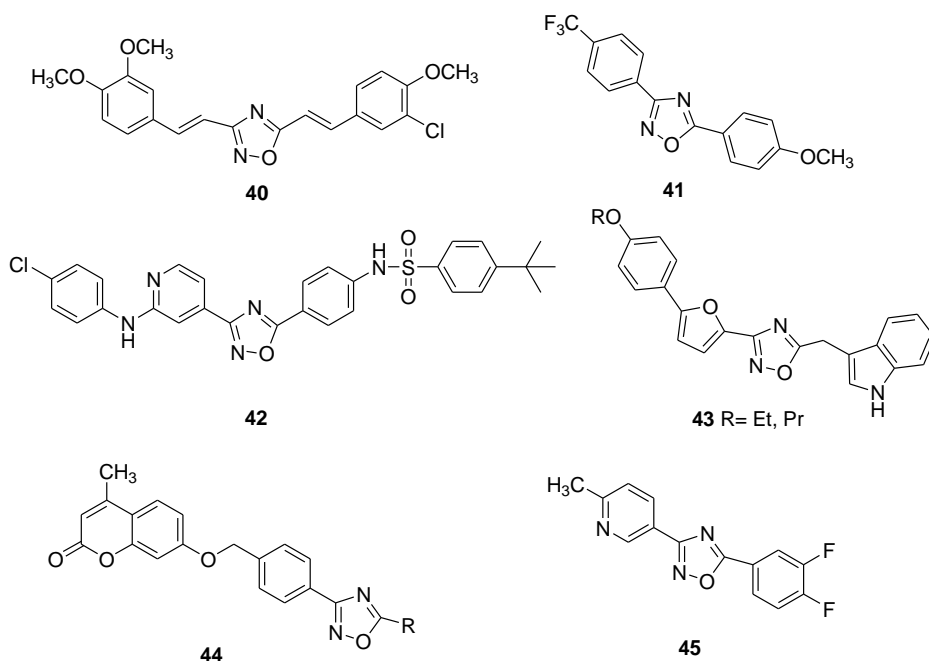


Figura 6

L'ossadiazolo **40** è un derivato curcumin-like ottenuto per sostituzione del gruppo β -dichetonico della curcumina con l'anello 1,2,4-ossadiazolico. Esso è stato identificato da una libreria di composti curcumin-like capaci di legare il peptide A β in simulazioni di docking molecolare. Tecniche di indagine biofisica hanno mostrato un'interferenza di questo composto sul pattern di aggregazione del peptide amiloide.⁵⁰

L'1,2,4 ossadiazolo fluorurato **41** quando irradiato interferisce con la fibrillazione di A β e riduce la citotossicità di A β su cellule LAN 5.

L'enzima Glicogenosintasi chinasi 3 (GSK3) è un enzima coinvolto nell'iperfosforilazione di Tau e quindi nella formazione degli ammassi neurofibrillari (NFTs). L'attività di GSK-3 è associata anche allo stress ossidativo, all'infiammazione e all'insulino resistenza osservata nei pazienti con Alzheimer. L'anello ossadiazolico e quello piridinico sono noti per la loro attività inibitoria su GSK-3 mentre il motivo benzensulfonammidico è presente in differenti composti con attività antiinfiammatoria e antiossidante. Il derivato **42** presenta tutte queste caratteristiche strutturali e oltre ad inibire GSK-3 esercita un effetto antiinfiammatorio e antiossidante. Inoltre, aumenta il consumo di glucosio nelle cellule.⁵¹

L'1,2,4-ossadiazolo **43** analogo dell'alcaloide marino *Phidianidine* ha esibito in vitro un effetto neuroprotettivo contro la tossicità indotta da A β ₂₅₋₃₅.⁵² Gli ibridi Cumarina/1,2,4-ossadiazolo **44** hanno esibito attività inibitoria verso l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BChE) e possono essere considerati come lead nello sviluppo di nuovi agenti terapeutici utili per il trattamento dei problemi cognitivi associati al declino della funzione colinergica.⁵³

L'ossadiazolo **45** ha esibito un effetto terapeutico in modelli animali di Parkinson. Esso è in grado di attenuare la perdita dei neuroni dopaminergici ed esercita un'attività antiossidante ed antiinfiammatoria. Inoltre, si distribuisce bene nel tessuto cerebrale.⁵⁴

1.4.5 Agenti antidiabetici

Gli 1,2,4-ossadiazoli **46** e **47** (**Figura 7**) hanno mostrato, in vitro, un'attività inibitrice sugli enzimi α -glucosidasi e α -amilasi. Quest'ultimi sono deputati alla scissione degli zuccheri complessi assunti con la dieta in zuccheri semplici e facilmente assorbibili lungo il tratto gastrointestinale.⁵⁵

Tra i possibili target nella terapia ipoglicemizzante vi sono i recettori attivatori della proliferazione dei perossisomi (PPAR α e γ) essi svolgono un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi glucidica; aumentano la sensibilità all'insulina nel muscolo e svolgono un ruolo

chiave nel metabolismo dei lipidi. L'ossadiazolo **48** è in grado di interagire con entrambe le isoforme recettoriali e in ratti diabetici riduce i livelli di glucosio e di colosterolo.⁵⁶

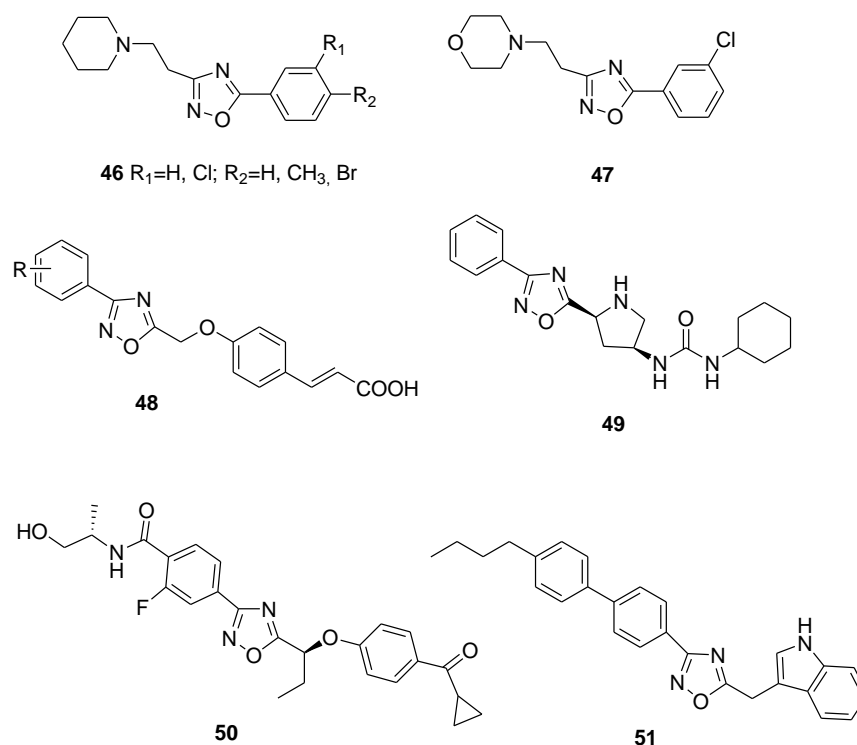


Figura 7

Gli ossadiazoli **49** e **50** agiscono come agonisti dei recettori GRBAR1 (G-protein bile acid receptor 1) e GPR119 (G-protein coupled receptor 119) i quali stimolano l'espressione dell'incetina ipoglicemizzante GLP1.^{57,58}

Il composto **51**, derivato dall'alcaloide indolico *Phidianidine*, è un inibitore della protein- fosfatasi 1B (PTP1B). Quest'ultima svolge un ruolo inibitorio nella trasduzione del segnale insulinico.⁵⁹

1.4.6 Promoters del read-through

L'Ataluren (**Figura 8**) è un 1,2,4-ossadiazolo fluorurato approvato per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne, un disordine genetico causato da mutazioni non-sense.⁶⁰

In questo tipo di mutazioni, la sostituzione di una base del DNA con un'altra codifica per un codone di terminazione prematuro (PTC). I ribosomi leggono questo codone come un segnale prematuro di terminazione e producono una proteina troncata e non funzionale. Una mutazione non-sense nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) è causa della

Fibrosi Cistica. Ataluren e suoi analoghi agiscono come read-through drugs. Essi consentono di bypassare la sequenza PTC e di ottenere proteine intere e funzionali.

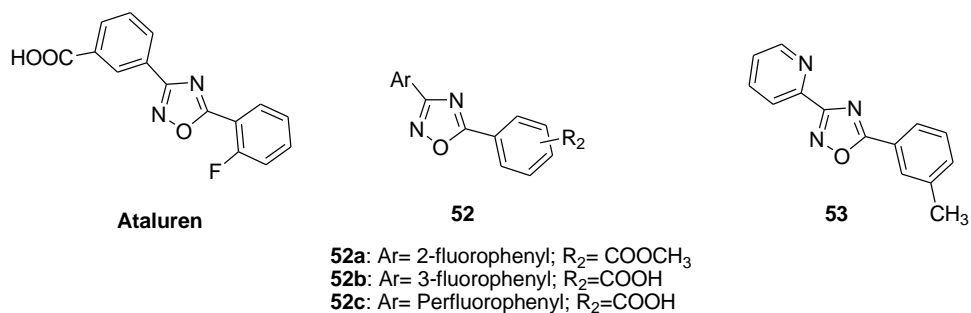


Figura 8

I derivati di Ataluren **52** ottenuti attraverso esterificazione del gruppo carbossilico e variazione del numero e della posizione degli atomi di fluoro si sono mostrati più attivi di Ataluren e hanno aumentato l'espressione della proteina CTFR.⁶¹ Il derivato **53**, che non presenta il gruppo carbossilico e gli atomi di fluoro, ha mostrato anch'esso attività read-through comparabile con Ataluren promuovendo l'espressione di CFTR.⁶²

1.5 Bibliografia

1. Tiemann, F., Krüger, P. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 1685.
2. Purushotham, N., Poojary, B. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 10996-10998.
3. Han, M., Li, S., Ai, J., Sheng, R., Hu, Y., Hu, Y., Geng, M. *Bioorg Med Chem Lett*, **2016**, *26*, 5679-5684.
4. Kravisin, M., Shetnev, A., Sharonova, T., Baykov, S., Tuccinardi, T., Kalinin, S., Angeli, A., Supuran, C.T. *Bioorg. Chem.* **2018**, *76*, 88-97.
5. Terenzi, A., Barone, G., Palumbo Piccionello, A., Giorgi, G., Guarcello, A., Pace, A. *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *373*, 62–67.
6. Baral, N., Mohapatra, S., Prasad Raiguru, B., Priyadarsini Mishra, N., Panda, P., Nayak, S., Pandey, S. K., Kumar, P. S., Sahoo, C. S. *J. Heterocycl. Chem.* **2019**, *56*, 552-565.
7. Otaka, H., Ikeda, J., Tanaka, D., Tobe, M. *Tetrahedron Lett* **2014**, *55*, 979-981.
8. Gangloff, A.R.; Litvak, J., Shelton, E.J., Sperandio, D., Wang, V.R., Rice, K.D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1441-1443.
9. Ovdiiichuk, O.V., Hordiyenko, O.V., Arrault, A. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 3427-3435.
10. Tang, Y., Imler, G.H., Parrish, D.A., Shreeve, J.M. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 8039-8042.
11. Kivrak, A., Zora, M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 817-831.
12. Clapp, L.B. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Potts, K. T.; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Eds.; Pergamon: Oxford, U.K., **1984**, *6*, 365-391
13. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Buscemi, S. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2017**, *53*, 936-947.
14. Pace, A., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A., Pibiri, I. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2015**, *116*, 85-136.
15. D'Anna, F., Fontana, G., Frenna, V., Macaluso, G., Marullo, S., Spinelli, D. *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24*, 185-192.
16. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Buscemi, S., Vivona, N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4018-4020.
17. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Buscemi, S., Vivona, N., Pani, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4004-4010.
18. Kotagiri, R., Deng, Z., Xu, W., Cai, Q. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3946-3949.
19. Palumbo Piccionello, A., Guarcello, A., Pace, A., Buscemi, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1986-1992.
20. Pace, A., Pibiri, I., Palumbo Piccionello, A., Buscemi, S., Vivona, N., Barone, G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7656-7666

21. a) Vivona, N., Buscemi, S., Pibiri, I., Palumbo Piccionello, A., Pace, A. In *Handbook of Synthetic Photochemistry*; Albini, A., Fagnoni, M., Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, Germany, **2010**, 387-416; b) Su, M. D. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 2712-2722.
22. D'Auria, M., Frenna, V., Marullo, S., Racioppi, R., Spinelli, D., Viggiani, L. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1383-1388.
23. D'Auria M., Frenna, V., Monari, M., Palumbo Piccionello, A., Racioppi, R., Spinelli, D., Viggiani, L. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6598-6601.
24. Buscemi, S., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Pibiri, I., Vivona, N. *Heterocycles* **2005**, *65*, 387-394.
25. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Buscemi, S. *Org. Lett.* **2011**, *17*, 4749-4751.
26. Fontana, G., Palumbo Piccionello, A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 884-886.
27. Buscemi, S., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Pibiri, I., Vivona, N., Giorgi, G., Mazzanti, A., Spinelli, D. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8106-8113.
28. Buscemi, S., Pace, A., Pibiri, I., Vivona, N., Lanza, C.Z., Spinelli, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 974-980.
29. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Buscemi, S., Vivona, N. *Arkivoc* **2008**, *6*, 235-244.
30. Bergamann, E.D., Bendas, H., D'avilla, U. *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 64-69.
31. Sivestrini, B. *Minerva Med.* **1960**, *51*, 4091-4094.
32. Boucher, E.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1-12.
33. El-Desoky, E.S.I., El-Sawi, A.A., Abozeid, M.A., Abdelmoteleb, M., Shaaban, M., Eman M., Keshk M.E.M., Abdel-Rahman, H. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28*, 1601-1617.
34. Baral, N., Mohapatra, S., Prasad Raiguru, B., Priyadarsini Mishra, N., Panda, P., Nayak, S., Pandey, S. K., Kumar, P. S., Sahoo, C. R. *J. Heterocycl. Chem.* **2019**, *56*, 552-565.
35. Fortuna, C. G., Bonaccorso, C., Bulbarelli, A., Caltabiano, G., Rizzi, L., Goracci, L., Musumarra, G., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Guarcello, A., Pierro, P., Cocuzza, C. E.A., Musumeci, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 533-545.
36. Fortuna, C.G., Berardozzi, R., Bonaccorso, C., Caltabiano, G., Di Bari, L., Goracci, L., Guarcello, A., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Pescitelli, G., Pierro, P., Lonati, E., Bulbarelli, A., Cocuzza, C., Musumarra, G., Musumeci, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6814-6825.
37. Palumbo Piccionello, A., Musumeci, R., Cocuzza, C., Fontana, C.G.; Guarcello, A., Pierro, P., Pace, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 441-448.

38. Abhay, A.U., Pradip K.G., Sivaramakrishnan, H., Nishigandha, N., Vijav, M., Dhiman, S., Choudharid, A., Roopane, S. M. *Bioorg. Chem.* **2019**, *86*, 507-512.
39. Shuruthi, T. G., Eswaran, S., Shivarudraiah, P., Narayanan, S., Subramanian, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 97-102.
40. Cascioferro, S., Attanzio, A., Di Sarno, V., Musella, S., Tesoriere, L., Cirrincione, G., Diana, P., Parrino, B. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 35.
41. Moniot, S., Forgione, M., Lucidi, A., Hailu, G.S., Nabbioso, A., Carafa, V., Baratta, F., Altucci, L., Giacché, N., Passeri, D., Pellicciari, R., Mai, A., Steegborn, C., Rotili, D. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2344-2360.
42. Bergant Loboda, K., Valjavec, K., Stampar, M., Wolber, G., Zegura, B., Filipic, M., Sollner Dolenc, M., Perdih, A. *Bioorg. Chem.* **2020**, *99*, 103828.
43. Dokla, E.M., Fang, C.S., Abouzid, K.A., Chen, C. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111607.
44. Zhang, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Song, J., Li, J., Han, K., Huang, J., Jiang, C., Zhang, H. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127373.
45. Gobec, M., Tomašič, T., Markovič, T., Mlinarič-Raščan, I., Dolenc, M.S., Jakopin, Ž. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *240*, 200-207.
46. Yatam, S., Jadav, S.S., Gundla, R., Gundla, K.P., Reddy, G.M., Ahsan, M.J., Chimakurthy, J. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 10305-10310.
47. Ranjan, C., Kumar, J., Sharma, K., Akhter, M., Siddiqui, A.A., Chawla, G. *Lett. Drug Des. Dis.* **2018**, *15*, 590.
48. Youssif, B., Mohamed, M., Al-Sanea, M., Moustafa, A., Abdelhamid, A., Gomaa, H. *Bioorg. Chem.* **2019**, *85*, 577-584.
49. Xu, L.L., Zhu, J. F., Xu, X. L., Zhu, J., Li, L., Xi, M.Y., Jiang, Z.Y., Zhang, M.Y., Liu, F., Lu, M.C., Bao, Q.C., Li, Q., Zhang, C., Wei, J.L., Zhang, X.J., Zhang, L.S., You, Q. D., Sun, H. P. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5419-5436.
50. Battisti, A., Palumbo Piccionello, A., Sgarbossa, A., Vilasi, S., Ricci, C., Ghetti, F., Spinozzi, F., Marino Gammazza, A., Giacalone, V., Martorana, A., Lauria, A., Ferrero, C., Bulone, D., Mangione, M. R., San Biagio, P. L., Ortore, M. G. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 31714-31724.
51. Wang, M., Liu T., Chen, S., Wu, M., Han, J., Li, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112874.
52. Jiang, C., Fu, Y., Zhang, L., Gong, J., Wang, Z., Xiao, W., Zhang, H.Y., Guo, Y.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 216-220.
53. Zhang, J., Li, J., Song, J., Cheng, Z., Sun, J., Jiang, C. *J. As. Nat. Prod. Res.* **2019**, *21*, 1090-1103.

54. Xu, L., Wu, Y., Yan, F., Li, C., Dai, Z., You, Q.D. Jiang, Z.Y., Di, B. *Free Rad. Bio. Med.* **2019**, *134*, 288-303.
55. Kayukova, L.A., Uzakova, A.B., Baitursynova, G.P., Dyusembaeva, G.T., Shul'gau, Z.T., Gulyaev, A.E., Sergazy, S.D. *Pharm. Chem. J.* **2019**, *53*, 129-133.
56. Kaur, P., Rafiq Bhat, Z., Bhat, S., Kumar, R., Kumar, R., Tikoo, K., Gupta, J., Khurana, N., Kaur, J., Khatik, G. L. *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103867.
57. Matsumoto, K., Yoshitomi, T., Ishimoto, Y., Tanaka, N., Takahashi, K., Watanabe, A., Chiba, K. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2018**, *367*, 509-517.
58. Di Leva, S.F., Festa, C., Carino, A., De Marino, S., Marchianò, S., Di Marino, D., Finamore, C., Monti, M.C., Zampella, A., Fiorucci, S., Limongelli, V. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2504.
59. Liu, J., Chen, Y., Li, J.Y., Luo, C., Li, J., Chen, K.X., Li, X.W., Guo, Y.W. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 97.
60. Campofelice, A., Lentini, L., Di Leonardo, A., Melfi, R., Tutone, M., Pace, A., Pibiri, I. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3329.
61. Pibiri, I., Lentini, L., Melfi, R., Gallucci, G., Pace, A., Spinello, A., Barone, G., Di Leonardo, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 236-244.
62. Pibiri, I., Lentini, L., Tutone, M., Melfi, R., Pace, A., Di Leonardo, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 429-435.

CAPITOLO II

Sintesi di derivati chinazolinonici e (di)acilguanidinici tramite reazione di riduzione di 1,2,4-ossadiazoli

In letteratura è possibile ritrovare numerosi metodi di sintesi che prevedono la riduzione di differenti substrati per la formazione di nuovi composti o di intermedi di percorsi sintetici più complessi. Nella maggior parte di questi lavori sono usate condizioni di reazione molto drastiche oltre che reattivi pericolosi e/o difficilmente reperibili. In questo lavoro di tesi si è messo a punto un nuovo metodo di riduzione degli 1,2,4-ossadiazoli che rappresenta un'interessante metodologia applicabile alla sintesi di derivati 4-(*IH*)-chinazolinonici e di (*di*)-acilguanidine composti dotati di rilevanti attività biologiche.

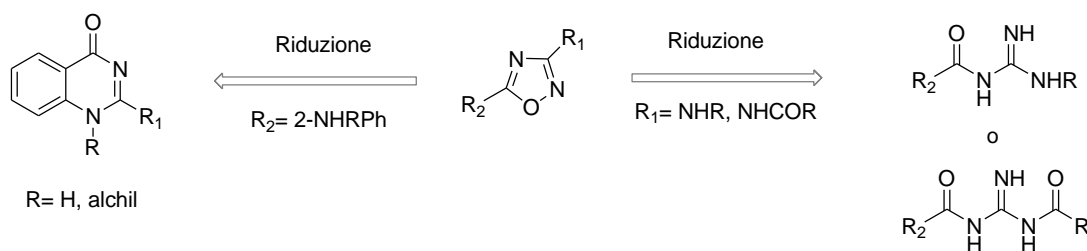


Figura 1

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 Il nucleo Chinazolinonico

I chinazolinoni sono composti eterociclici costituiti da un anello benzenico e uno pirimidinico fusi insieme.

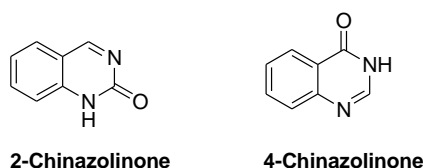


Figura. 1.1

In base alla posizione del cheto gruppo si distinguono in due isomeri strutturali il 2-chinazolinone (2-(1*H*)-chinazolinone) e il 4 chinazolinone (4-(3*H*)-chinazolinone) (**Figura 1.1**) L'isomero 4 è il più comune e la maggior parte dei metodi di sintesi conducono alla formazione di 4-chinazolinoni sostituiti in posizione 2 e sull'azoto 3. Sono pochissimi gli esempi di chinazolinoni sostituiti sull'azoto 1.

Il nucleo 4-(3*H*)-chinazolinonico riveste una certa importanza in chimica farmaceutica, con una moltitudine di azioni farmacologiche. Lo ritroviamo in classi di composti con diverse proprietà terapeutiche e farmacologiche come antimicrobici, anticonvulsivanti, antitumorali, antimalarici, antiipertensivi, antinfiammatori, anti-diabetici.

2.1.2 Metodi di sintesi di derivati chinazolinonici

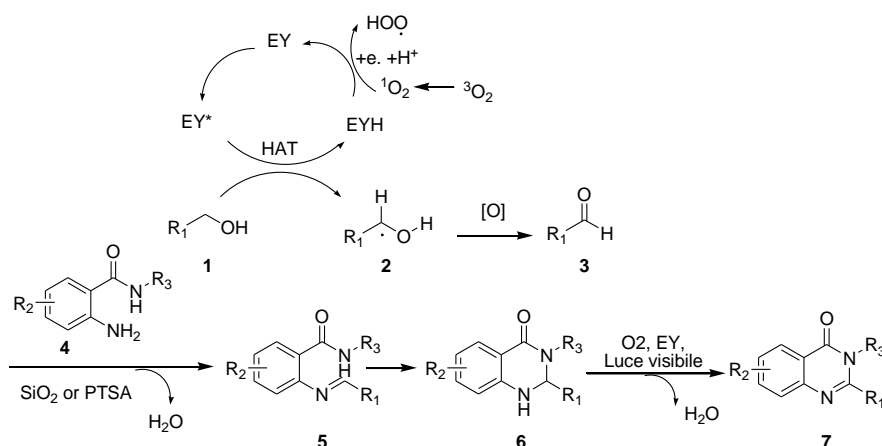
Generalmente la sintesi del nucleo chinazolinonico avviene per reazione di condensazione di acidi-benzoici alogenati, benzammide, 2-ammino-benzammide, 2-nitrobenzammide con amidine, alcol, ammine, amminoacidi o derivati degli acidi carbossilici. Molto spesso queste sintesi comprendono molti passaggi, richiedono condizioni drastiche oltre che la presenza di agenti ossidanti e catalizzatori metallici. Quest'ultimi possono rilasciare residui pericolosi limitando quindi l'applicabilità della metodica alla sintesi in campo farmaceutico. In considerazione di ciò enormi sforzi sono stati fatti per mettere a punto strategie efficienti, economicamente convenienti, metal free e che impiegano agenti ossidanti quali l'O₂ o addirittura l'aria. Di seguito sono riportati i più recenti progressi nella sintesi dei chinazolinoni, in particolare dei chinazolinoni 2-sostituiti, con un occhio di riguardo alle metodiche a minore impatto ambientale.

2.1.2.1 Sintesi di chinazolinoni da 2-ammino benzammide e 2-alo-benzammide

L'orto-amminobenzammide è sicuramente il derivato dell'acido antranilico più ampiamente sfruttato nella sintesi dei chinazolinoni. A tale scopo essa viene fatta reagire con svariati composti quali aldeidi^{1,2}, chetoni^{3,4}, esteri⁵, alcol^{6,7}, alcheni^{8,9}, alchini¹⁰ o ammine.^{11,12}

Gli alcol per la loro facile reperibilità e il basso costo sono molto usati nella sintesi dei chinazolinoni ma, molto spesso, quando vengono usati alcol primari non attivati (ad eccezione dell'alcol benzilico), si rende necessaria la presenza di catalizzatori metallici e di forti agenti ossidanti. Recentemente è stato messo a punto un nuovo metodo di foto-ossidazione selettiva degli alcol ad aldeidi che prevede l'uso di ossigeno molecolare come ossidante, eosina come agente di trasferimento di idrogeno (HAT) e condizioni metal-free. La reazione, come illustrato

nello **Schema 1.1**, procede con meccanismo radicalico.¹³



Schema. 1.1

Per quando riguarda la reazione di condensazione della 2-ammino benzammide con alchini, applicabile alla sintesi di chinazolinoni, sono stati riportati solo due esempi. Cheng *et al* hanno riportato la sintesi 2-aril-chinazolinoni partendo da cheto-alchini in presenza di acido trifluoro acetico come catalizzatore della reazione.¹⁴ Più recentemente è stata riportata, per la prima volta, la sintesi di chinazolinoni a partire da alchini o alcheni terminali e antranilammide.¹⁵

Oggi la trasformazione carbonilativa palladio catalizzata di alogenuri organici è diventata un potente strumento di sintesi organica e nello specifico è stata molto sfruttata nella sintesi dei chinazolinoni.¹⁶ Wu *et al.* hanno riportato la sintesi di chinazolinoni 2-sostituiti partendo da 2-aminobenzamide e bromuri arilici per incorporazione di una molecola di CO sotto l'azione di un catalizzatore al Palladio.¹⁷ Lo svantaggio principale della metodica di carbonilazione citata è l'utilizzo della costosa BuPAd₂ (di-1-adamantil-*n*-butil-fosfina) come legante del palladio. È diventato infatti di grande importanza l'uso di catalizzatori al Palladio che possano essere facilmente rimossi dal mix di prodotti e quindi riutilizzati. A tale scopo, la prima ciclizzazione-carbonilativa di aril-ioduri e 2-amminobenzammide è stata effettuata immobilizzando il complesso fosfina-Palladio su materiali mesoporosi (MCM-41), con ampia superficie e che permettono il riciclo finale del catalizzatore. Questa catalisi eterogenea ha consentito l'ottenimento di derivati chinazolinonici con rese da buone ad eccellenti.¹⁸

La 2-alo-benzammide può essere considerata anch'essa un substrato di partenza nella sintesi dei chinazolinoni.¹⁹⁻²¹ Una sintesi a tre componenti di 2-aril-chinazolinoni è stata messa a punto partendo da 2-bromo-benzammide che è stata fatta reagire con aldeidi in presenza di

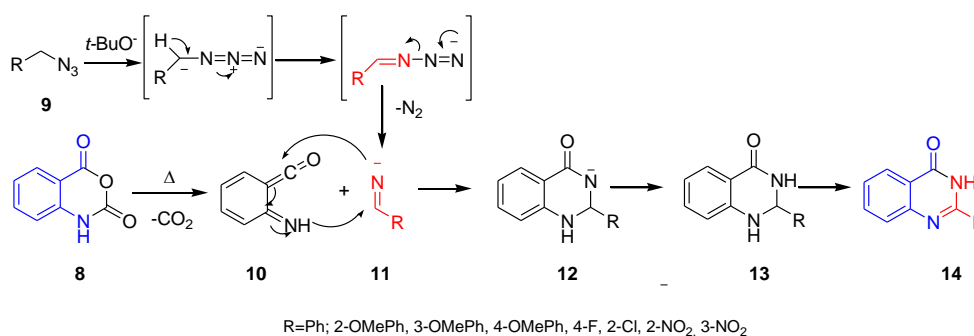
una soluzione acquosa di ioni ammonio usata come fonte di azoto e di un catalizzatore eterogeneo bimetallico costituito da Cu-Mn (1:0.25).²²

2.1.2.2 Sintesi di chinazolinoni da acido-2-alo-benzoico

I chinazolinoni sono stati ottenuti anche dalla reazione dell'acido-2-alo-benzoico con amidine o guanidine.²³⁻²⁶ L'acido 2-alo-benzoico e la guanidina sono stati utilizzati come substrati di partenza per la sintesi di 2-ammino-chinazolinoni usando un nuovo sistema di catalisi eterogenea. Nel dettaglio, la reazione è stata condotta in acetonitrile ad 80 °C usando $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ come catalizzatore e K_2CO_3 come base. La reazione procede con la formazione in situ del sistema di catalisi eterogenea nano-composito $\text{CuCO}_3\text{-K}_2\text{CO}_3$; esso si forma per graduale rimozione di ioni cloro da $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ed è stato osservato a fine reazione come residuo blu facilmente filtrabile.²⁷

2.1.2.3 Sintesi di chinazolinoni dall'anidride isatoica

L'anidride isatoica è stata ampiamente usata per la sintesi dei chinazolinoni. Tali sintesi sono spesso condotte in presenza di agenti catalitici e con diversi composti fonte di azoto tra cui benzonitrile²⁸ o benzamidina²⁹. Un interessante approccio di sintesi prevede la reazione dell'anidride isatoica **8** con benzil azide **9** a 100 °C, in DMSO ed ambiente basico per *t*-BuOK (Schema 1.2).

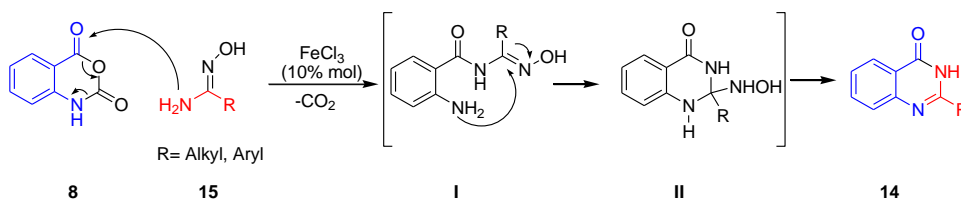


Schema. 1.2

Tale procedura consente di ottenere 4-(3*H*)-chinazolinoni **14** in buone rese, partendo da materiali facilmente reperibili ed evitando l'uso di agenti catalitici costosi e pericolosi. Per azione della base sulla benzil azide si genera la specie anionica **11** che reagisce con l'intermedio decarbossilato dell'anidride isatoica **10** in una reazione di addizione [4+2] generando l'intermedio **12**. I successivi passaggi di protonazione e ossidazione consentono di ottenere i chinazolinoni finali **14**.³⁰ L'anidride isatoica è stata usata anche in un metodo sintetico molto

rapido che prevede l'uso di PEG-400 come solvente e l'azione delle microonde. In questo caso, la formammide rappresenta la fonte di azoto.³¹

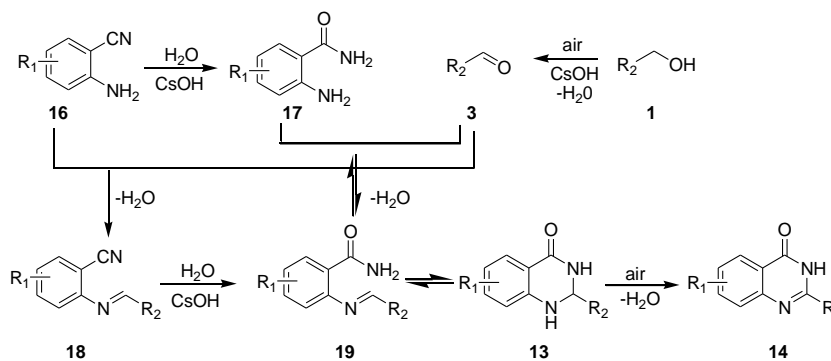
Diversi derivati chinazolinonici sostituiti in posizione due sono stati preparati ponendo a reagire in diossano l'anidride isatoica **8**, ammidossime variamente sostituite **15** e FeCl₃ come catalizzatore. In assenza di quest'ultimo il prodotto maggioritario osservato non è stato il chinazolinone ma l'1,2,4-ossadiazolo (**Schema 1.3**).³²



Schema. 1.3

2.1.2.4 Sintesi di chinazolinoni da orto-ammino benzonitrile

Rispetto all'orto-ammino-benzamide i derivati *o*-ammino-benzonitrilici sono substrati preferiti nella sintesi dei chinazolinoni. Infatti, le ammidi sono substrati altamente instabili e idrolizzano facilmente ad acido.³³ Per superare questo inconveniente ed aumentare le rese di reazione un valido approccio è quello di produrre *in situ* le ammidi attraverso idrogenazione dei nitrili. L'orto-amminobenzonitrile reagisce in reazioni di ciclizzazione ossidativa con derivati acidi,^{34,35} aldeidi³⁶ o chetoni³⁷ per generare il nucleo chinazolinonico. Recentemente, sono state investigate diverse strategie di sintesi che prevedono la reazione dell'*o*-amminobenzonitrile con alcol.^{38,39} Tra le più convenienti vi è la reazione dell'*o*-amminobenzonitrile con alcol in presenza di idrossido di cesio come base, xilene come solvente e un palloncino di aria che agisce come agente ossidante (**Schema 1.4**).⁴⁰

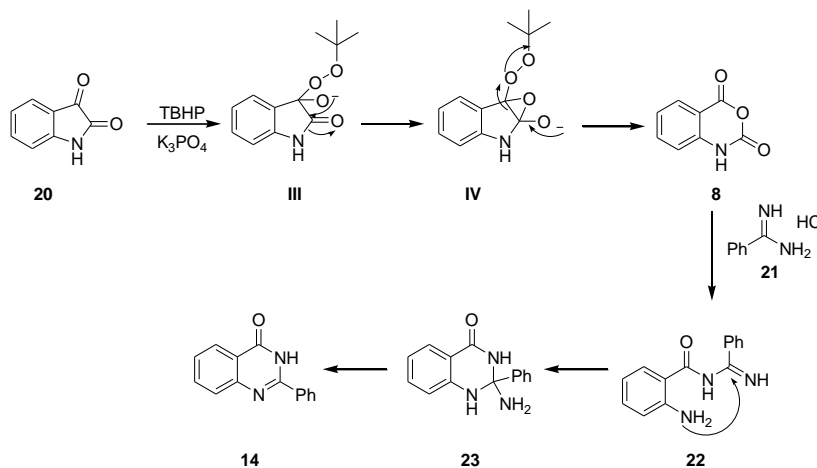


Schema. 1.4

In particolare, da un'analisi del meccanismo di reazione, riportato nello **Schema 1.4**, è stato visto che la base CsOH è cruciale in tutti gli step di reazione. Tale schema di sintesi consente di ottenere un'ampia varietà di chinazolinoni usando gli alcol che sono tra i composti chimici più stabili, economici e meno tossici. Inoltre, l'unico sottoprodotto è l'acqua senza contaminazione di residui di metalli di transizione.

2.1.2.5 Sintesi di chinazolinoni da indoli e loro derivati

Feng *et al.* hanno riportato per la prima volta la sintesi di chinazolinoni da 2-arilindoli e ammine o ammoniacca.⁴¹ Anche l'isatina **20** (**Schema 1.5**), un derivato dell'indolo, è stata efficacemente impiegata nella sintesi dei chinazolinoni usando ter-butil-idroperossido (TBHP) come agente ossidante. TBHP attacca il gruppo carbonilico della isatina portando all'intermedio **III** il quale per ciclizzazione intramolecolare e successivo riarrangiamento da origine all'anidride isatoica **8**. Quest'ultima subisce decarbossilazione per attacco dell'amidina **21**. L'ammide formatasi va incontro a ciclizzazione e forma il derivato chinazolinonico.⁴²



Schema. 1.5

2.1.3 Applicazioni farmacologiche dei chinazolinoni

2.1.3.1 Agenti antitumorali

Il nucleo chinazolinonico è presente numerosi derivati con attività antitumorale (**Figura 1.2**). I chinazolinoni **24** e **25** esercitano una significativa attività citotossica contro le linee tumorali Caco-2, HepG2 e MCF. Negli studi di docking molecolare i derivati chinazolinonici si sono adattati perfettamente sul sito attivo di AKT che è uno dei fattori oncogenici promuoventi la crescita tumorale.⁴³

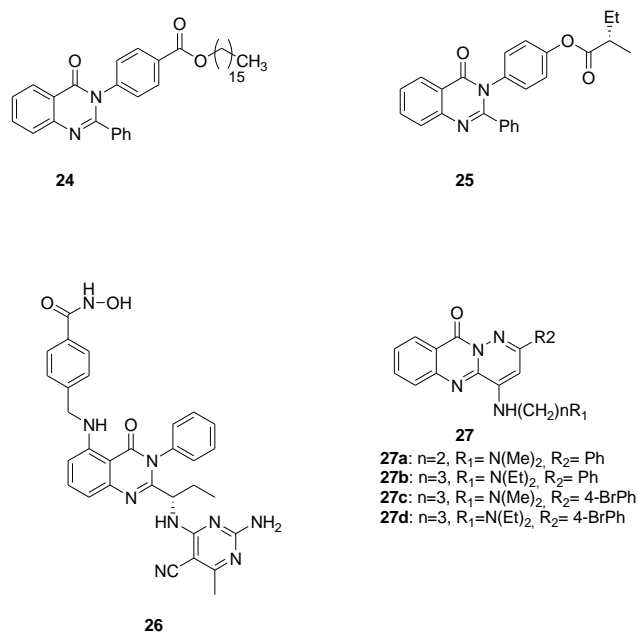


Figura. 1.2

Il chinazolinone **26** è un inibitore duale della fosfoinositide chinasi 3 (PI3K) e dell'enzima istone deacetilasi (HADCs). È stato ideato mettendo insieme la porzione chinazolinonica riscontrabile nel composto Idelalisib, inibitore di PI3K, con la porzione farmacofora di Vorinostat, inibitore dell'enzima HADC.⁴⁴ La PI3K prende parte a diversi processi cellulari inclusi la proliferazione, il differenziamento e l'angiogenesi. Gli enzimi istone deacetilasi sono una classe di enzimi che regolano l'espressione genica di varie proteine inclusi i fattori di soppressione tumorale (p53, p21) e un'alterazione della loro funzione è collegabile al processo di iniziazione cancerogena. I chinazolinoni tricyclici **27 a-d** intercalano il DNA ed il composto **27 d** inibisce la topo isomerasi I, enzima essenziale nel processo di proliferazione cellulare.⁴⁵

2.1.3.2 Agenti antibatterici

Molti studi indicano che i chinazolinoni 2,3-disostituiti hanno preziose proprietà antimicrobiche. Il Deossivasicinone (**Figura 1.3**), isolato da una Acantacea, è un alcaloide con una struttura di 4-(3*H*)-chinazolinone-pirrolo fusa. La pianta mostra inoltre attività antimicrobica. Studi di relazione struttura-attività mostrano che la posizione 3 deve essere sostituita per avere migliori attività antimicrobiche.⁴⁶

I chinazolinoni **28-30** mostrati in **Figura 1.3** hanno dato eccellenti risultati sia in termini di attività antibatterica che antifunginea. Gli studi di docking molecolari eseguiti sul sito attivo

della proteina glucosammino-6-fosfato sintetasi, essenziale per la sintesi della parete batterica, hanno mostrato ottimi profili di legame.⁴⁷

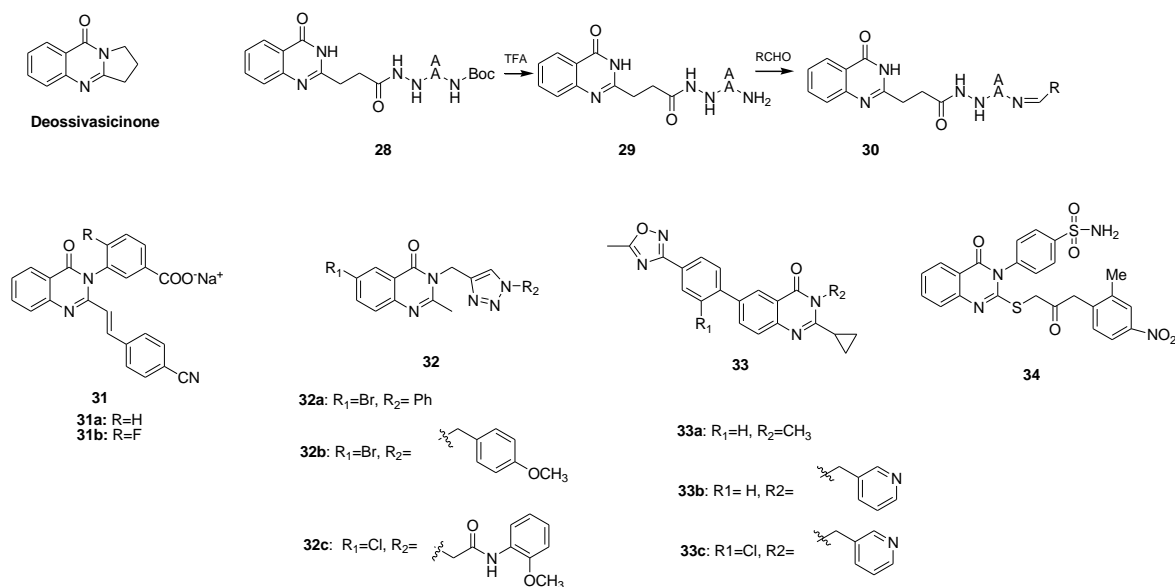


Figura. 1.3

Diversi chinazolinoni riportati in letteratura possono trovare applicazione nel trattamento delle infezioni da *Stafilococcus aureus* meticillina resistente (MRSA). La resistenza ai classici antibiotici β -lattamici è dovuta all'acquisizione di una PBP2a addizionale da parte dei batteri. Tale enzima possiede un sito regolato da meccanismo allosterico e quindi il gruppo β -lattamico non è efficace contro questi batteri.^{48,49} Alcuni lavori hanno dimostrato la sinergia di azione dei composti chinazolinonici **31** con la piperacillina e il tazobactam nelle infezioni da *Stafilococco* Meticillina Resistente. Il chinazolinone legando il sito allosterico della proteina PBP 2a provoca l'apertura del sito attivo che quindi diventa disponibile alla piperacillina. In altre parole, la PBP 2a diventa vulnerabile all'antibiotico β -lattamico in presenza del chinazolinone.^{50,51} Una serie di ibridi 4(3*H*)-chinazolinone e ossadiazolo/triazolo sono stati testati in vitro mostrando un'importante attività antibatterica contro i batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi. I derivati **32a**, **33b**, **33c** sono risultati attivi contro le specie fungine *Candida Albicans* e *Aspergillus Niger*.⁵² Il composto **34**, appartenente ad una serie di derivati chinazolinone-benzensulfonamidici, è risultato il più attivo contro MRSA. Il composto e sue nano-formulazioni hanno mostrato attività inibitoria sulla DNA-girasi e gli studi di docking hanno confermato l'interazione del composto con il sito attivo dell'enzima.⁵³

2.1.3.3 Agenti antimalarici ed antitubercolari

Gli alcaloidi di tipo chinazolinonico, febrifugina e isofebrifugina sono stati isolati come componenti attivi contro la malaria dall'erba cinese Chang Shan (*Dichroa Crossopteryx* Lour) e *Hydrangea Umbellate* e hanno attirato una notevole attenzione a causa della loro attività antimalarica potenzialmente potente.^{54,55} La prolil-tRNA sintetasi citoplasmatica di *Plasmodium Falciparum* è il target funzionale della febrifugina e dei suoi derivati come l'Halofuginone.⁵⁶ In **Figura 1.4** sono illustrati alcuni composti analoghi della febrifugina sintetizzati allo scopo di migliorare il profilo di attività.⁵⁷

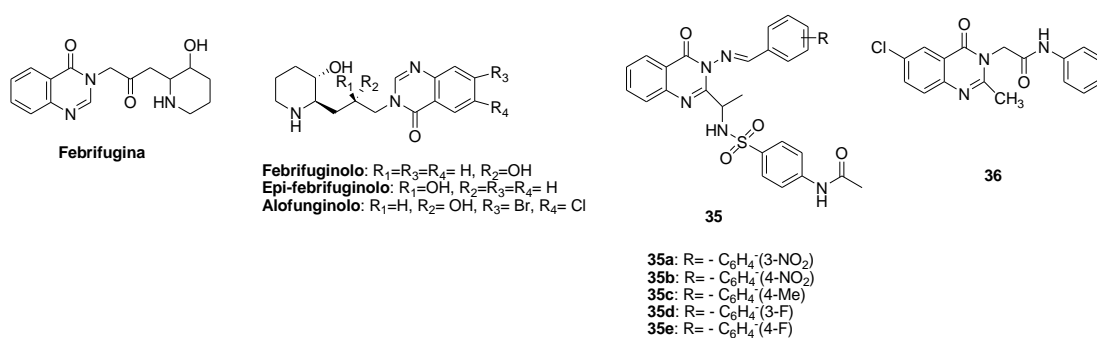


Figura. 1.4

La diidrofolato reduttasi (DHFR) di *Plasmodium Falciparum* è uno dei target nella terapia antimalarica. DHFR è un enzima necessario per la produzione dei cofattori utili alla sintesi del DNA. I derivati chinazolinone-sulfamidici **35** sono potenti agenti antimalarici. Da studi di docking si evince una stretta interazione con la DHFR del parassita.⁵⁸

I chinazolinoni hanno trovato applicazione anche nel trattamento della tubercolosi, una malattia infettiva cronica causata dal micobatterio della tubercolosi. L'enoil-acil reduttasi (InhA) del micobatterio essendo coinvolta nella biosintesi degli acidi micolici, principali costituenti della parete cellulare del micobatterio, è il target primario dei farmaci antitubercolari. Uno dei farmaci più utilizzati per il trattamento della tubercolosi è l'isoniazide la quale viene somministrata come profarmaco per poi essere attivata da una catalasi-perossidasi. La crescente resistenza all'isoniazide è dovuta proprio a mutazioni associate all'enzima che la rende attiva. Quindi, la ricerca di nuovi inibitori che non richiedono un'attivazione preliminare è necessaria per lo sviluppo di nuovi inibitori di InhA. Il derivato 2-(4-ossochinazolin-3(4H)-yl)acetamide **36** è stato in grado di uccidere forme resistenti del micobatterio della tubercolosi (XDR-TB).⁵⁸

2.1.3.4 Agenti anticonvulsivanti e sedativo ipnotici

Il Metaqualone è un importante punto di riferimento nel campo degli anticonvulsivi sintetici. Indagini di letteratura hanno rivelato che le sostituzioni in posizione 2 e 3 sono necessarie per l'attività anticonvulsiva di composti quali metaqualone, etqualone, mecloqualone, metilmetaqualone, piriqualone e afloqualone. Il metaqualone svolge il suo ruolo attraverso i recettori di tipo A del GABA.⁶⁰ I chinazolinoni **37** (**Figura 1.5**) hanno mostrato in studi di docking molecolare una ottima affinità per il recettore GABA A. I composti hanno mostrato un alto potere anticonvulsivante in ratti le cui crisi sono state indotte con electroshock e iniezioni sottocutanee di fentilenetrazolo (PTZ). Inoltre, nessuno di questi composti ha dato neurotossicità.⁶¹

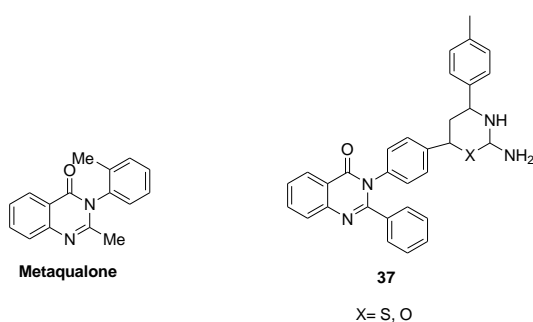


Figura. 1.5

2.1.3.5 Agenti antiinfiammatori, analgesici ed antiossidanti

La triptantrina e la rutecarpina (**Figura 1.6**) sono due esempi di chinazolinoni naturali con significativa attività antiinfiammatoria. Esse agiscono attraverso l'inibizione selettiva dell'enzima COX2.^{62,63} Riprendendo alcuni motivi strutturali della triptantrina e della rutecarpina è stata sintetizzata una serie di 4-(3H)-chinazolinoni-2-mercapto-3-piridin sostituiti, i composti **38** hanno esibito potente attività antiinfiammatoria e analgesica *in vivo* risultando più attivi dei farmaci attualmente in uso Diclofenac e Celecoxib.⁶⁴ Il derivato **39**, avente un nucleo chinazolinone/1,3,4-ossadiazolo, ha mostrato una potente attività analgesica mentre il derivato **40** è risultato un potente agente antiinfiammatorio.⁶⁵ Diversi studi hanno dimostrato che alcune sostanze peptidiche sono in grado di ridurre il processo infiammatorio inibendo le citochine. Così, il nucleo chinazolinonico è stato coniugato con una porzione peptidica e i derivati ottenuti sono il primo esempio di ibridi chinazolinone-peptide con attività antiinfiammatoria e antiossidante (Composto **41**).⁶⁶ Il recettore TRPA1 (Transient Receptor Potential), appartenente alla famiglia dei canali ionici, è espresso dai neuroni sensitivi dei gangli dorsali e numerosi dati indicano il suo coinvolgimento nei pathway dolorifici. La ricerca di

antagonisti di tale sottotipo recettoriale ha condotto all'identificazione dei chinazolinone **42** e **43** i quali possiedono elevata potenza e selettività.⁶⁷

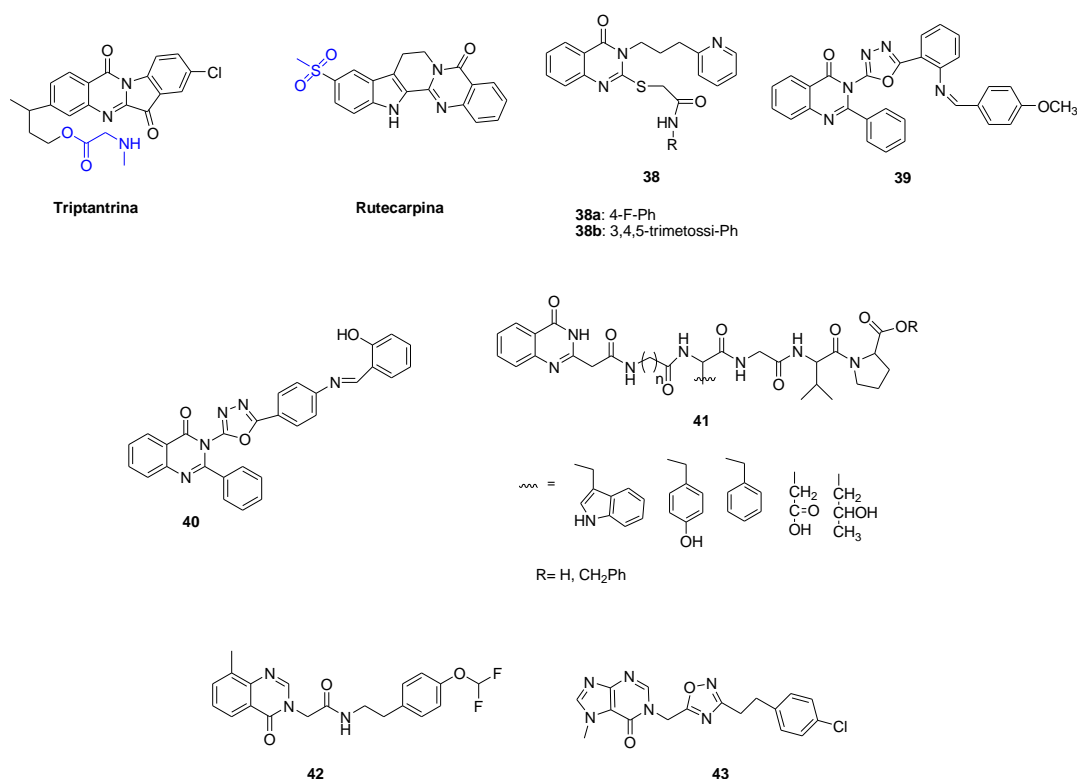


Figura. 1.6

2.1.3.6 Agenti neuroprotettivi

Il Parkinson è una complessa malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla distruzione dei neuroni dopaminergici della sostanza nigra e del corpo striato. È noto che l'adenosina è un neuromodulatore con funzioni opposte alla dopamina, quindi un possibile approccio terapeutico consiste nell'uso di inibitori dei recettori adenosinici (AR). Si è visto che antagonisti del sottotipo recettoriale A_{2A} AR_s aumentano l'attività motoria mentre antagonisti del sottotipo recettoriale A₁ AR_s, migliorano alcune funzioni cognitive. Recentemente, è stato visto che il composto benzo- α -piranone (**Figura 1.7**) possiede elevata affinità per entrambi i sottotipi recettoriali dell'adenosina. Partendo da tali conoscenze, sono stati sintetizzati composti chinazolinonici 2- sostituiti i quali presentano un'elevata somiglianza strutturale con il lead compound benzopiranone. I chinazolinoni sintetizzati hanno mostrato vari gradi di affinità con i recettori adenosinici. Il composto **44 a** favorisce il legame al recettore A₁ mentre il composto **44 b** attivo sul recettore A₂. Questi composti rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di nuovi agenti capaci di migliorare le capacità cognitive e motorie dei pazienti affetti da

patologie neurodegenerative.⁶⁸

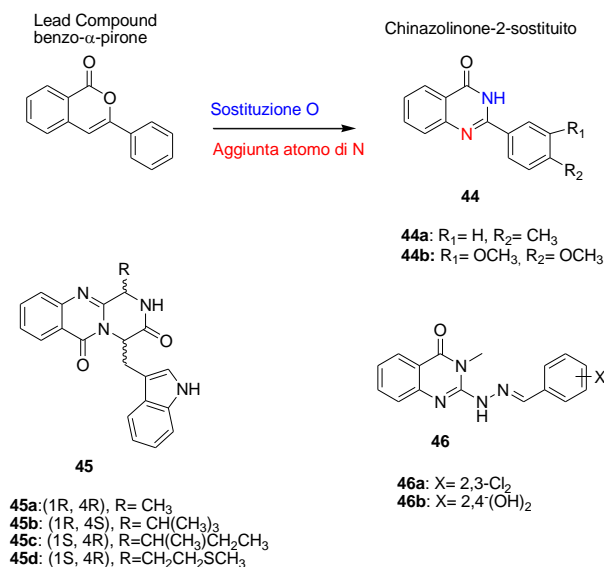


Figura. 1.7

La Fiscalina A-C e la (-)-Spiroquinazolina sono alcaloidi marini a struttura chinazolinonica con funzione neuroprotettiva in modelli di Parkinson. Esse, in quanto sostanze peptidomimetiche, agiscono contrastando l'azione della sostanza P implicata nella neuroinfiammazione e nella degenerazione dei neuroni dopaminergici.⁶⁹ I loro derivati di sintesi **45** hanno esercitato un'azione neuroprotettiva sulle cellule SH-SY5Y trattate con Rotenone, una tossina che riproduce *in vitro* le caratteristiche cellulari del Parkinson.⁷⁰ I derivati chinazolinone-idrazonici **46 a** e **46 b** sono stati identificati come nuovi inibitori non peptidici dell'enzima BACE1.⁷¹

2.1.3.7 Agenti antiiperlipidemici

L'iperlipidemia, un disordine del metabolismo dei lipidi, è considerato uno dei principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari. Studi hanno mostrato che i chinazolinoni 2-sostituiti possiedono una potenziale attività anti-iperlipidemia nell'ipercolesterolemia.⁷² Risultati di screening in vivo hanno rivelato che i composti **47** e **48** (Figura 1.8) possiedono un'attività antiiperlipidemica potente facendo diminuire il livello nel plasma di trigliceridi (TG), lipoproteina a densità molto bassa (VLDL), lipoproteina a densità bassa (LDL), ciò accompagnato da aumento del livello di lipoproteine ad alta densità (HDL). L'analisi della relazione struttura-attività ha indicato che i composti contenenti un nucleo 7-idrossi-2-metil

chinazolinone sono i migliori in termini di attività ipolipidica.⁷³

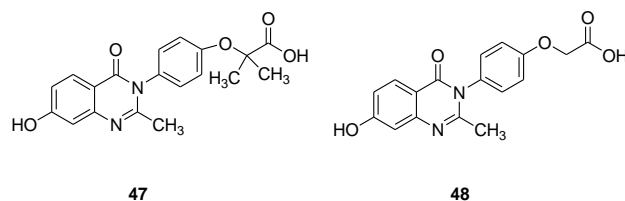


Figura. 1.8

2.1.3.8 Agenti antidiabetici

Nella ricerca di nuovi agenti ipoglicemizzanti, dotati di elevata potenza e minori effetti indesiderati, gli estratti di piante hanno attirato notevolmente l'attenzione per la loro azione antidiabetica in modelli animali.⁷⁴ L'estratto etanolo della *Rhizophora apiculata*, pianta medicinale della mangrovia indiana, possiede una grande quantità di alcaloidi che hanno esibito attività inibitoria nei confronti dell' α -glucosidasi.⁷⁵ Inoltre, gli studi computazionali hanno messo in luce l'affinità di tali alcaloidi per il recettore PPAR γ .⁷⁶ L'effetto anti-iperglicemico e antiiperlipidemico dell'estratto etanolo totale e della frazione in diclorometano è stato testato in vivo su modelli animali diabetici e la frazione in diclorometano ha esibito potente attività antidiabetica.⁷⁷ Da questa frazione è stato isolato l'alcaloide a struttura chinazolinonica Glicosina (**Figura 1.9**) ed è stato esaminato il suo effetto antidiabetico in modelli animali con diabete non insulino dipendente.⁷⁸

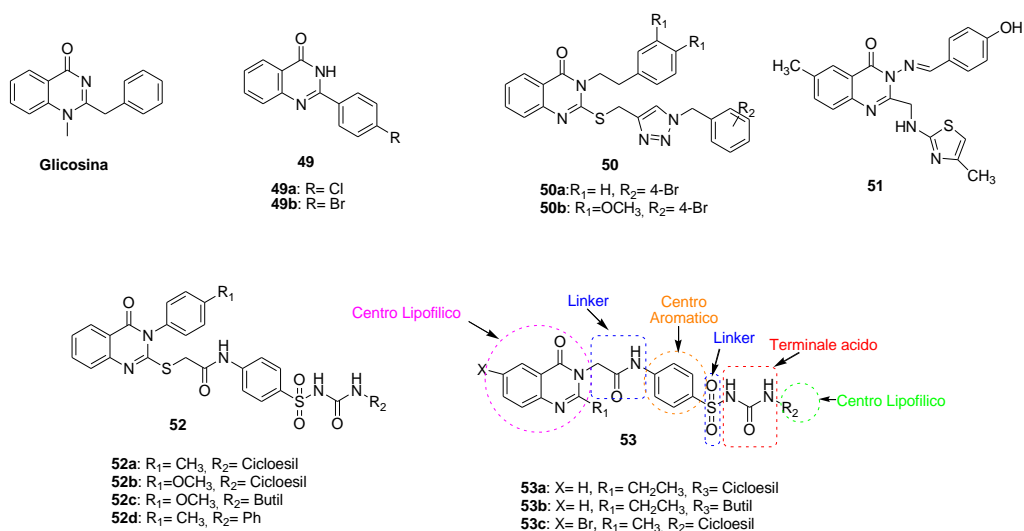


Figura. 1.9

I modelli animali usati per lo studio sono stati ratti adulti di Wistar a cui è stato indotto il diabete tramite una singola iniezione intraperitoneale di streptozotocina e nicotinammide. Tra

le tre diverse dosi di glicosina utilizzate (100mg/kg e 200mg/kg) la dose di 50 mg/kg ha mostrato un più prominente potenziale ipoglicemizzante dopo un intervallo di due ore. Quindi, l'attività anti-iperglicemizzante della dose efficace di glicosina è stata valutata in ratti sperimentali usando il test di tolleranza al glucosio (OGTT). Dopo 45 giorni, sono stati raccolti campioni di sangue per determinare il profilo dei lipidi nel siero, il livello di insulina, emoglobina ed emoglobina glicosilata. La somministrazione orale di Glicosina e Metformina ha aumentato l'insulina del plasma drasticamente rispetto al controllo diabetico. Il trattamento con glicosina e metformina ha portato a una diminuzione dei trigliceridi e a un aumento delle HDL rispetto ai topi diabetici non trattati.

Per determinare il possibile meccanismo d'azione la Glicosina è stata utilizzata in simulazioni di docking con quattro differenti possibili target: la dipeptidilpeptidasi IV (DPP-IV), il recettore di tipo γ attivatore della proliferazione dei perossisomi (PPAR γ), il recettore dell'insulina fosforilato e la proteinfosfatasi di tipo 1B. Gli studi hanno dimostrato che la glicosina interagisce con questi target con alta affinità.

I derivati 2-(4-clorofenil) chinazolinone **49 a** e il 2-(4-bromofenil) chinazolinone **49 b** fanno parte di una serie di chinazolinoni testati per l'attività inibitoria sull' α -glucosidasi.⁷⁹ In particolare, sono stati studiati gli effetti dei derivati chinazolinonici sull'idrolisi del p-nitrofenil- α -D-glucopiranoside catalizzata da α -glucosidasi. Le sostituzioni con cloro o bromo sul C4' dell'anello fenilico hanno creato efficaci inibitori dell' α -glucosidasi con valori di IC₅₀ di 12,5 \pm 0,1 μ M e 15,6 \pm 0,2 μ M, rispettivamente. Comparando con il valore di IC₅₀ del controllo positivo cioè l'Acarbosio (IC₅₀=0.475 \pm 0.001 mM), **49 a** e **49 b** sono importanti inibitori dell'alfa glucosidasi con la possibilità di adottarli come nuovi agenti antidiabetici nel controllo dell'iperglicemia postprandiale. L'analisi di quenching della fluorescenza è stata eseguita per investigare il meccanismo di interazione intrinseco tra **49 a-b** e l' α -glucosidasi. L'aggiunta dei derivati chinazolinonici comporta una riduzione dell'intensità di fluorescenza dell' α -glucosidasi parallelamente all'aumento di concentrazione dei composti testati. Questi risultati hanno indicato che **49 a** è un quencher di fluorescenza migliore e più facile da combinare con l'enzima rispetto a **49 b**. Studi di docking molecolare hanno rivelato che **49 b** è meno attivo del **49 a** contro α -glucosidasi a causa della sua debole interazione con l'enzima. Tra gli inibitori dell'enzima α -glucosidasi vi sono nuove molecole ibride costituite da un nucleo chinazolinonico legato ad un anello 1,2,3-triazolico (Composti **50**). Tutti i composti sintetizzati hanno esibito ottima attività inibitoria sull' α -glucosidasi (IC₅₀ nel range di 181.0-475.5 μ M) risultando anche più potenti del farmaco standard acarbosio (IC₅₀= 750.0 μ M).⁸⁰ L'enzima Dipeptidil peptidasi IV (DPP4) gioca un ruolo centrale nell'omeostasi del glucosio e i suoi

inibitori sono usati, insieme ad altri ipoglicemizzanti orali, nel trattamento del diabete di tipo 2. Nei test in vitro di inibizione della DPP4, il chinazolinone **51** è risultato molto potente e selettivo nei confronti della DPP4. Il chinazolinone **51** nasce da una procedura di design molecolare che mette insieme caratteristiche strutturali provenienti da inibitori noti della DPP-4: il nucleo chinazolinonico presente negli inibitori Linagliptin e Alogliptin e la tiazolina presente nel farmaco Teneagliptin.⁸¹ Due recettori coinvolti nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 sono il recettore delle sulfoniluree (SUR) e il recettore attivatore della proliferazione dei perossisomi di tipo γ (PAR γ). In una patologia complessa come il diabete l'approccio terapeutico "one drug multiple targets" è diventato di grande interesse. A tale scopo sono stati sintetizzati composti chinazolinonici legati a un motivo sulfonilurea allo scopo di ottenere agonisti di entrambi i recettori SUR e PPAR γ . Le molecole ibride chinazolinone-sulfonilurea racchiudono nella loro struttura tutte le caratteristiche necessarie per interagire con entrambi i recettori (Composti **52-53**).⁸²

2.1.4 Il gruppo Guanidinico

La guanidina è un composto simile all'urea ad eccezione della presenza del gruppo imminico che sostituisce quello chetonico. Numerosi composti guanidinici provengono da fonti naturali ma un gran numero sono di sintesi. Infatti, la guanidina è uno degli scaffold più utilizzati in chimica farmaceutica per la progettazione di nuovi composti bioattivi. Spesso, in quest'ultimi, il gruppo guanidinico si presenta sotto forma di (*di*)-acilguanidina in cui uno o entrambi i gruppi amminici sono legati ad un sostituente acilico (**Figura 1.10**).

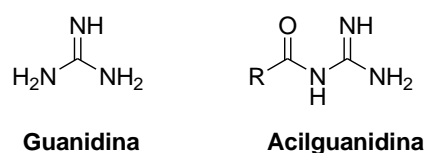


Figura 1.10

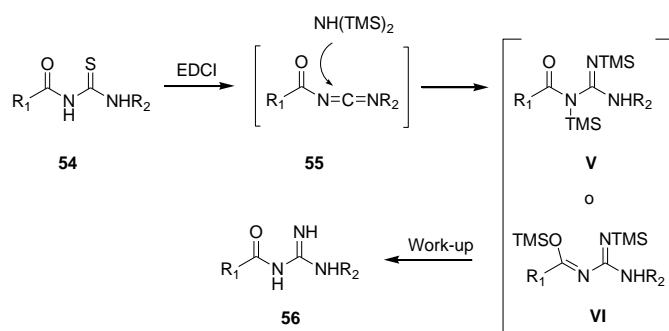
Il gruppo guanidinico è classificato come un gruppo fortemente basico. La basicità è favorita dalla stabilizzazione per risonanza del corrispondente acido coniugato (pka=12.5). Il gruppo tende a presentarsi in forma protonata a vari pH e tale caratteristica si rivela importante per l'interazione con svariati target biologici.^{83,84}

Nel Drug Design l'introduzione di un sostituito acilico sul gruppo guanidinico è sfruttata per ridurre la basicità e per ottenere composti dotati di maggiore biodisponibilità orale ed in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.⁸⁵

2.1.5 Metodi di sintesi di (*di*)-acilguanidine

Uno dei primi metodi di sintesi delle acilguanidine risale al 1942. La metodica prevede la reazione tra la guanidina in soluzione alcolica anidra e un estere di un acido carbossilico.⁸⁶ I substrati vengono usati nel rapporto molare di 1:1 e la reazione procede spontaneamente senza l'impiego di calore. Si tratta di un metodo molto versatile che prevede l'utilizzo di una grande varietà di esteri al fine di ottenere acilguanidine differenti. Differenti lavori riportano la sintesi di *N*-acilguanidine sfruttando la carbonilazione di guanidine nucleofile, ma tale metodo risulta di limitata l'applicabilità.⁸⁷

Le acilguanidine sono tipicamente ottenute dalla reazione della tiourea con ammine. La tiourea è un reattivo facilmente reperibile e molto stabile. Essa è convertita in intermedi reattivi tramite reazioni di desolforazione usando agenti di accoppiamento come l'1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDCI). Un metodo di sintesi molto conveniente prevede la condensazione della tiourea con esametildisilazano (HDMS), come fonte di azoto, in presenza di EDCI. Il meccanismo proposto per la reazione è riportato nello **Schema 1.6**. Il trattamento della tiourea **54** con EDCI porta alla formazione dell'*N*-acil-carbodiimmide **55** come intermedio reattivo. L'HDMS reagisce con **55** per dare l'intermedio **V** o **VI**. Durante il work-up il gruppo silile è rimosso con ottenimento della guanidina **56**.⁸⁸

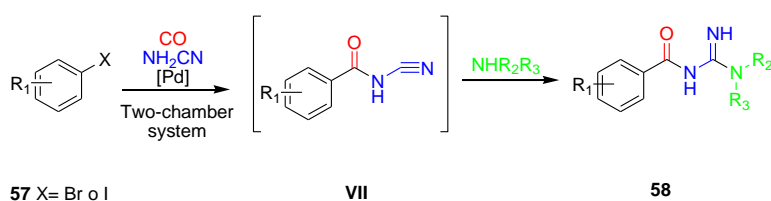


Schema 1.6

Altri approcci consentono di rimuovere lo zolfo della tiourea tramite l'uso di sali di metalli come il cloruro di mercurio (II) ma la tossicità del metallo preclude l'applicazione della

metodica in campo farmaceutico.⁸⁹ L'uso del poco tossico FeCl₃, come reattivo di desolforazione ha consentito di ottenere in ottime rese *N*-benzoilguanidine partendo da *N*-benzoiltiourea ed ammine alchiliche o ariliche.⁹⁰

Recentemente è stata riportata una nuova metodica di sintesi di *N*-acilguanidine da alogenuri arilici facilmente reperibili. La reazione procede tramite reazione di carbonilazione Palladio catalizzata (**Schema 1.7**). L'aril-bromuro o l'aril-ioduro **57** reagiscono, in presenza di CO, in una reazione di accoppiamento con la cianammide per dare l'intermedio *N*-cianobenzammide **VII** che subisce attacco nucleofilo da parte di ammine per dare le *N*-acilguanidine desiderate **58**.⁹¹



Schema 1.7

La sintesi di acilguanidine *N*-*N'* sostituite è stata effettuata anche in fase solida immobilizzando la *S*-metiltiourea su una resina e facendola reagire con acidi carbossilici in presenza di PyAOP come agente di accoppiamento.⁹²

2.1.6 Applicazioni farmacologiche delle (di)acilguanidine

Il gruppo acilguanidinico è presente in numerosi composti dotati di attività biologica. Lo ritroviamo in agonisti dei recettori H₂ dell'istamina⁹³, in inibitori della trombina⁹⁴ e in alcune sostanze ad attività antibatterica.⁹⁵ I composti acilguanidinici hanno trovato maggiore applicazione come agenti neuroprotettivi, antivirali e antiipertensivi. Alcuni esempi relativi a queste attività biologiche sono riportati di seguito.

2.1.6.1 Agenti neuroprotettivi – inibitori di BACE1

L'enzima BACE1 (Beta site APP Cleaving Enzyme 1) è il principale responsabile dell'accumulo del peptide neurotossico A β nella patologia di Alzheimer. BACE1 è un'aspartil-proteasi. Legando i residui di aspartato della Proteina Precursore l'Amiloide (APP), essa catalizza il suo cleavage formando il peptide tossico A β -42. BACE1 è riconosciuto come un

importante target per lo sviluppo di nuovi farmaci utili al trattamento dell'Alzheimer ma, ad oggi, non sono stati ancora approvati farmaci che agiscono come suoi inibitori.⁹⁶

In letteratura sono presenti numerosi lavori che dimostrano l'attività inibitrice delle acilguanidine (cicliche e non) sull'attività enzimatica di BACE1. Il composto **59** (Figura 1.11), identificato in studi di tipo computazionale, lega i residui di acido aspartico del sito catalitico di BACE1 con alta affinità.

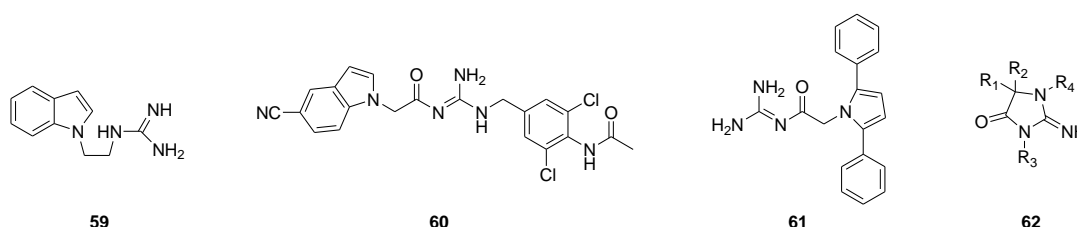


Figura 1.11

Studi di Lead optimization sul derivato **59** hanno portato all'identificazione del composto acilguanidinico **60** il quale, rispetto al suo predecessore, inibisce molto di più l'enzima BACE 1. Gli studi cristallografici hanno dimostrato un'interazione del residuo guanidinico con i due residui di acido aspartico (Asp228 e Asp32) del sito catalitico, mentre il carbonile interagisce con il residuo Gln73 della catena laterale.⁹⁷ L'acilguanidina **61** ha mostrato in studi computazionali il più basso valore di energia di legame con BACE1 per confronto con il controllo MK-8931 (Fase III trial, Merck). Inoltre, nella predizione delle caratteristiche farmacocinetiche ADMET il derivato **61** ha dato ottimi risultati in termini di assorbimento e di solubilità.⁹⁸ Anche le acilguanidine cicliche con struttura generale **62** hanno formano interazioni bidentate con la diade catalitica di BACE1 e mostrano ottime caratteristiche strutturali al fine di assicurare una buona biodisponibilità a livello cerebrale.⁹⁹

2.1.6.2 Agenti antiipertensivi- inibitori dei canali del sodio

Un farmaco a struttura guanidinica oggi in commercio è l'Amiloride, un diuretico usato nel trattamento dell'ipertensione. Essa agisce sui canali di scambio Na^+ - Ca^{2+} . La sostituzione della pirazina dell'Amiloride con il benzene ha portato alla sintesi di suoi analoghi tra cui il derivato **63** che ha mostrato un valore di IC_{50} molto più basso rispetto al farmaco ad oggi in uso.¹⁰⁰ Oltre all'Amiloride, molti degli inibitori dei canali del sodio presentano una struttura acilguanidinica che agisce come competitor del Na^+ extracellulare. Tali derivati esercitano un ruolo cardioprotettivo ed anti-ischemico in modelli animali. Uno di questi composti è il derivato **64** in Figura 1.12.

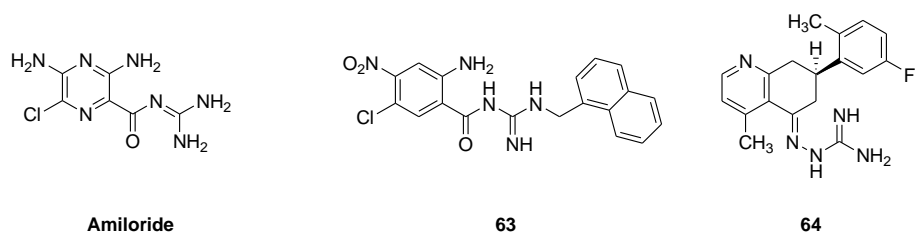


Figura 1.12

2.1.6.3 Agenti antivirali

Le acilguanidine rappresentano una classe di agenti antivirali ad ampio spettro d'azione.¹⁰¹ Il composto 5-(*N,N*-esametilene) amiloride (**HMA**, **Figura 1.13**) così come il derivato **BIT-225** inibiscono, a concentrazioni submicromolari, la replicazione del virus HIV in cellule macrofagiche e riducono il rilascio di particelle virali. Sfortunatamente la citotossicità esercitata da alcuni derivati acilguanidici, in particolare dal derivato BIT-225, ha impedito il loro uso clinico.^{102,103} Il composto **SM111**, analogo di HMA, blocca la replicazione del virus dell'influenza di tipo A ed è risultato attivo contro il virus HIV anche nelle forme resistenti ai comuni farmaci antiretrovirali. Inoltre, il composto ha mostrato minore tossicità cellulare. Molto probabilmente **SM111** agisce bloccando l'espressione del gene Env essenziale per la replicazione virale.¹⁰⁴

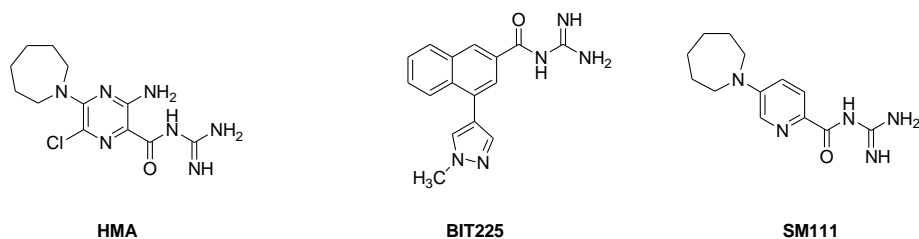
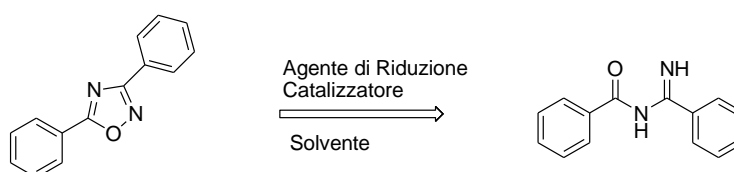


Figura 1.13

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.2.1 Ottimizzazione del nuovo metodo di riduzione degli 1,2,4-ossadiazoli

Alla luce di quanto precedentemente esposto, si è sviluppato un nuovo metodo per la riduzione di derivati 1,2,4-ossadiazolici, precursori ideali per l'ottenimento del nucleo chinazolinonico e delle funzionalità (di)acilguanidiniche. Il 3,5-difenil-1,2,4-ossadiazolo è stato utilizzato come substrato di partenza per la messa a punto del nuovo metodo di riduzione dell'1,2,4-ossadiazolo che prevede la rottura del legame labile O-N.



Schema 2.1. Riduzione del 3,5-difenil-1,2,4-ossadiazolo

Nella messa a punto del metodo sono stati usati 10 mg di 3,5-difenil-1,2,4-ossadiazolo e si è scelto di usare come agente riducente il formiato di ammonio (NH_4HCO_2 , 10 mg) e come catalizzatore 1 mg di Pd/C (5%). Inizialmente la reazione è stata condotta a temperatura ambiente, lasciando a reagire per 48 ore e variando il solvente di reazione. Alla temperatura di 25 °C si è osservata la presenza del prodotto di riduzione, anche se in basse rese, solo quando sono stati usati dei solventi protici e polari come il metanolo e l'etanolo. La reazione in MeOH condotta in assenza del catalizzatore o sostituendolo con Zn non ha portato alla formazione del prodotto desiderato. Si è osservato un abbattimento dei tempi di reazione e un incremento delle rese quando la reazione è stata condotta alla temperatura di 60 °C. (**Tabella 2.1**)

Solvente	Agente Riducente	Catalizzatore	T (°C)	Tempo	Resa%
THF	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	0%
Toluene	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	0%
Etile Acetato	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	0%
CH_2Cl_2	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	0%
CH_3CN	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	0%
MeOH	NH_4HCO_2	—	25 °C	48 h	0%
MeOH	NH_4HCO_2	Zn	25 °C	24 h	0%
MeOH	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	15%
EtOH	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	25 °C	48 h	10%
MeOH	HCO_2H	Pd/C (5%)	60 °C	1 h	78%
EtOH	NH_4HCO_2	Pd/C (5%)	60 °C	1 h	90%

Tabella 2.1. Ottimizzazione delle condizioni di reazione della riduzione del 3,5-difenil-1,2,4-ossadiazolo

2.2.2 Sintesi dei substrati 1,2,4-ossadiazolici e riduzione a 4-(1H)-chinazolinoni

I derivati 1,2,4-ossadiazolici usati come precursori per la sintesi dei chinazolinoni presentano in posizione 5 un arile che possiede in orto all'anello ossadiazolico un gruppo amminico a diverso grado di sostituzione. In posizione 3 all'anello 1,2,4-ossadiazolico troviamo un gruppo fenilico o arilico para-sostituito, oppure un gruppo benzilico (**Figura 2.1**).

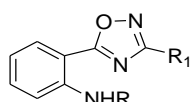
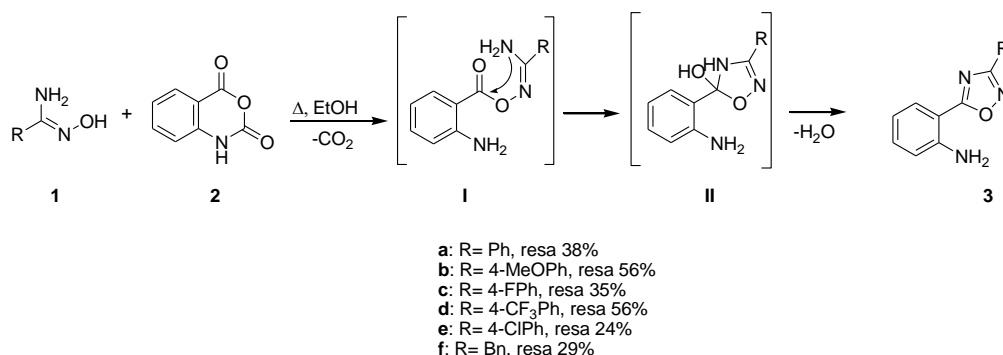


Figura 2.1

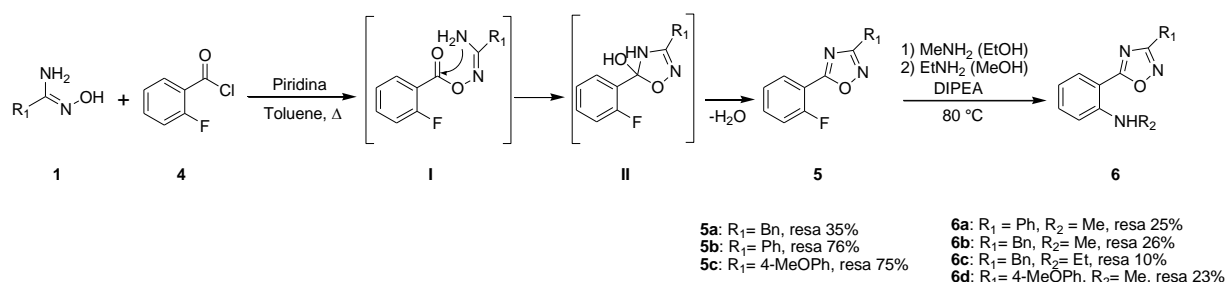
I derivati 1,2,4-ossadiazolici sono stati ottenuti seguendo la classica via dell'ammidossima usando come substrati di partenza ammidossime variamente sostituite e derivati acidi, quali l'anidride isatoica e il 2-fluorobenzoilcloruro. La sintesi di 1,2,4-ossadiazoli variamente sostituiti in posizione 5 è stata possibile sfruttando delle reazioni di S_NAr , di *N*-alchilazione e di amminazione riduttiva.

La reazione tra l'anidride isatoica **2** e diverse ammidossime **1** ha permesso di ottenere 1,2,4-ossadiazoli **3** con un gruppo NH_2 in orto all'anello ossadiazolico. La reazione prevede l'eliminazione di CO_2 e una successiva ciclizzazione (**Schema 2.2**). Le ammidossime utilizzate sono state prodotte facendo reagire l'idrossilammina cloridrato con corrispondenti nitrili.



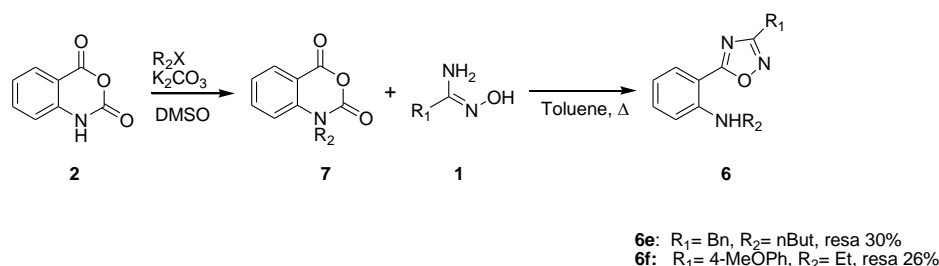
Schema. 2.2

Al fine di ottenere dei derivati 1,2,4 ossadiazolici **6** con un gruppo -NHMe o -NHEt in orto all'anello ossadiazolico sono state effettuate due reazioni di sostituzione nucleofila aromatica, sfruttando la reattività dei 5-(2'-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazoli. L'1,2,4-ossadiazolo **6** è stato pertanto ottenuto facendo reagire la benzammidossima, la benzilammidossima o la *p*-metossibenzammidossima con il 2-fluoro-benzoil cloruro **4**. Il meccanismo di reazione prevede una sostituzione nucleofila acilica cui segue una ciclizzazione intramolecolare per attacco del gruppo NH₂ sul carbonile ed eliminazione di una molecola d'acqua (**Schema 2.3**).



Schema. 2.3

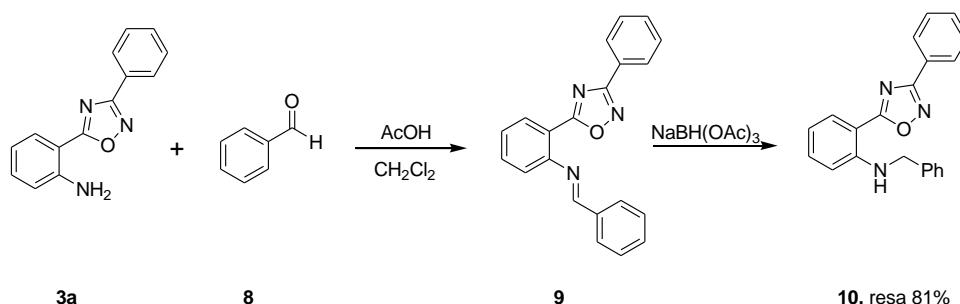
Gli ossadiazoli con in orto il gruppo -NHR sono stati ottenuti anche per alchilazione dell'anidride isatoica **2** utilizzando diversi ioduri alchilici come reagenti, DMSO come solvente di reazione e K₂CO₃ come base necessaria per deprotonare l'N (1) e consentire l'attacco da parte dell'anione formatosi sull'alogenuro alchilico. L'anidride isatoica *N*-sostituita **7** è stata fatta reagire con due diverse ammidossime benzilammidossima e *p*-metossibenzammidossima per generare gli 1,2,4-ossadiazoli **6** (**Schema 2.4**).



Schema. 2.4

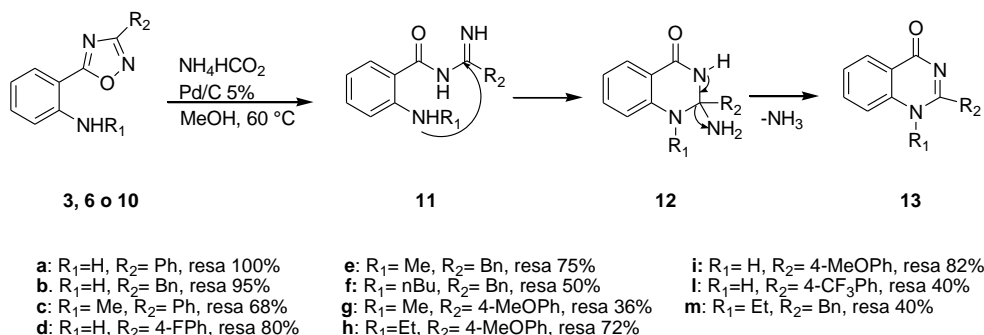
Per introdurre in orto all'anello ossadiazolico un gruppo -NHCH₂Ph si è partiti dall'ossadiazolo **3a** che è stato fatto reagire con benzaldeide **8** in una reazione di amminazione

riduttiva. In presenza di un catalizzatore acido si ha l'attacco del gruppo amminico al carbonile della benzaldeide con formazione dell'immina **9**, questa viene ridotta *in situ* dal sodio triacetossiboroidruro generando l'ossadiazolo **10** (Schema 2.5).



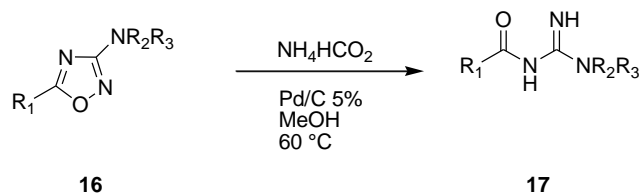
Schema. 2.5

I substrati ossadiazolici ottenuti con i tre approcci sintetici precedentemente riportati sono stati ridotti mediante il nuovo metodo di riduzione dell'1,2,4-ossadiazolo. In seguito alla reazione di riduzione e alla formazione dell'acilammidina **11**, il gruppo amminico attaccando il carbonio imminico provoca una ciclizzazione con eliminazione di ammoniaca e formazione del nucleo chinazolinonico **13** (Schema 2.6).



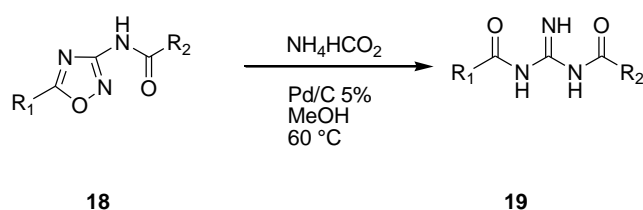
Schema. 2.6

In generale, si osserva la formazione dei prodotti desiderati in buone rese e tempi relativamente brevi. Le rese più basse si osservano per il composto derivante da **3e** per il quale la reazione di riduzione del legame O-N è accompagnata dalla riduzione del legame C-Cl, pertanto si è provveduto a lavorare in bassa conversione. Interessante notare che con il derivato benzilato **10** la reazione di riduzione si accompagna ad una debenzilazione riduttiva del sistema.



- a:** R₁= Ph, R₂= H, R₃=H, resa 69%
b: R₂= 2-furoil, R₃=H, R₃= H, resa 48%
c: R₁= Ph, R₂=H, R₃= Me, resa 93%
d: R₁=*i*-propil, R₂=H, R₃= H, resa 51%
e: R₁=Ph, R₂= Me, R₃= Ph, resa 100%

Schema 2.8



- a:** R₁= 2-tienil, R₂=2-tienil, resa 83%
b: R₁=Ph, R₂= 4-CH₃Ph, resa 85%
c: R₁=Me, R₂=Ph, resa 43%
d: R₁= Me, R₂= 3-OCH₃Ph, resa 30%
e: R₁= Ph, R₂= Ph, resa 88%
f: R₁= 2-furanil, R₂= Me, resa 67%
g: R₁= 2-tolil, R₂=Me, resa 47%

Schema 2.9

2.2.4 Valutazione biologica dei precursori 1,2,4-ossadiazolici e dei prodotti di riduzione

Come già riportato precedentemente è noto che il nucleo chinazolinonico è presente in un'ampia varietà di composti biologicamente attivi. Tra le attività biologiche riscontrate vi è quella ipoglicemizzante propria dell'alcaloide chinazolinonico Glicosina ma anche di alcuni derivati chinazolinonici di sintesi.⁷⁷⁻⁸¹ Scopo di questo lavoro è stata la valutazione biologica dei chinazolinoni sintetizzati, considerabili analoghi della glicosina, ma anche dei loro precursori ossadiazolici, considerabili isosteri del nucleo chinazolinonico. In particolare, i derivati chinazolinonici e ossadiazolici sono stati testati su sistemi cellulari modello per valutare gli effetti relativi a vitalità cellulare e induzione di stress ossidativo. Inoltre, al fine di mettere in luce un possibile effetto ipoglicemizzante è stato analizzato l'effetto dei composti su un enzima chiave nell'omeostasi del glucosio la dipeptidilpeptidasi 4 (DPPIV).

2.2.4.1 Valutazione citotossicità

La valutazione della citotossicità tramite saggio MTS è stata effettuata utilizzando cellule di neuroblastoma umano (LAN5) e cellule di adenocarcinoma umano alveolare A549 (risultati non mostrati) incubate per 24 ore con i composti di interesse alle concentrazioni di 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM . Il saggio si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio in un sale colorato di formazano. La riduzione è operata da una deidrogenasi NAD(P)H-dipendente espressa solo dalle cellule vive e metabolicamente attive. La quantità di formazano formata è proporzionale al numero di cellule vive e viene misurata per assorbanza a 490 nm.

I risultati ottenuti sulle due linee cellulari sono sovrapponibili; la maggior parte dei composti saggiati non hanno dato citotossicità fino alla concentrazione di 25 μM esibendo valori di vitalità cellulare uguale o superiore al controllo (**Figura 2.2**). La glicosina **13e** ed il suo precursore ossadiazolico **6b** alla concentrazione di 25 μM hanno dato le più alte percentuali di vitalità cellulare. Per alcuni derivati alla concentrazione di 50 e 100 μM si è osservata una diminuzione della vitalità cellulare e al microscopio la formazione di cristalli con cambio della morfologia cellulare e la perdita dei processi neuritici delle cellule LAN5.

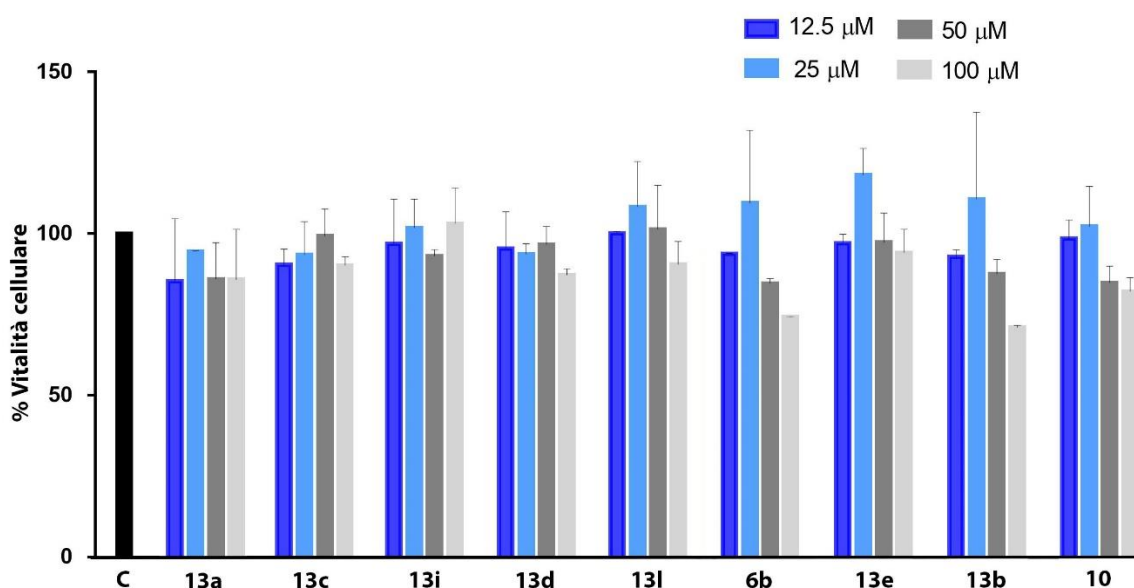
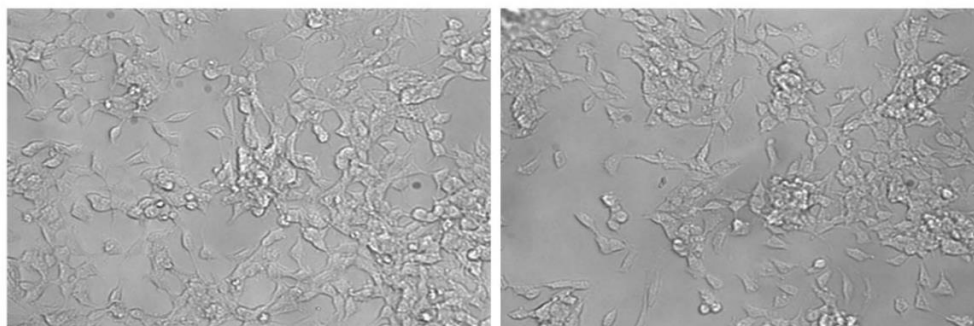


Figura 2.2. Vitalità cellulare delle cellule di neuroblastoma LAN5 esposte per 24 ore alle concentrazioni indicate dei composti. I dati sono rappresentati come valore medio \pm deviazione standard



LAN5 Controllo

LAN5 trattate con 13 e

Figura 2.3. Cellule LAN5 controllo vs LAN5 trattate con **13e** (Glicosina)

Composto	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM
3f	++	++	++	++
6b	++	+	+	+
10	++	++	Cristalli	Cristalli
13a	++	++	++	+ -
13i	++	++	++	+ -
13d	++	++	++	+
13l	++	++	Cristalli	Cristalli
13c	++	++	++	+ -
13e	++	++	++	+

Tabella 2.2. Risultati dell'osservazione al microscopio di LAN5 dopo 24h dal trattamento con i composti. Il simbolo ++ indica cellule uguali al controllo, il simbolo + - indica cellule uguali al controllo ma in numero inferiore. Per i composti **10** e **13l** si è osservata la formazione di cristalli alle concentrazioni di 50 e 100 μM .

2.2.4.2 Valutazione dello stato redox intracellulare

I composti chinazolinonici sintetizzati sono analoghi dell'alcaloide ipoglicemizzante Glicosina mentre i derivati (*di*-)acilguanidici possono essere considerati analoghi del farmaco ipoglicemizzante orale Metformina. In uno studio recente è stato dimostrato la Metformina può indurre stress ossidativo in cellule LAN5 oltre che danno mitocondriale, rilascio di citocromo C, aumento dei livelli di APP (Proteina Precursore l'Amiloide) e accumulo del peptide A β -

amiloide tutti fattori predisponenti allo sviluppo di Alzheimer.¹⁰⁷ La ricerca di nuovi agenti ipoglicemizzanti sicuri e che non inducano stress ossidativo è di grande importanza per il trattamento di una complessa patologia quale il diabete. Al fine di valutare il potenziale redox intracellulare delle cellule LAN 5 ed escludere un potenziale pro-ossidante dei composti, è stato eseguito il saggio fluorimetrico della Diclorofluoresceina (DCF).

La Diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) è una molecola non fluorescente e permeabile alle membrane. All'interno delle cellule la DCF-DA è idrolizzata da esterasi intracellulari con cleavage del gruppo acetato. In presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) la molecola si ossida e genera la sostanza 2',7'-diclorofluoresceina altamente fluorescente. La fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di ROS intracellulari. Le cellule trattate con i composti, alle concentrazioni di 25 μ M, e 50 μ M, hanno dato valori di fluorescenza simili a quelli delle cellule non trattate. Questo risultato suggerisce che i composti non abbiano indotto la produzione di intracellulare di ROS e quindi stress ossidativo nelle cellule (**Figura 2.4**)

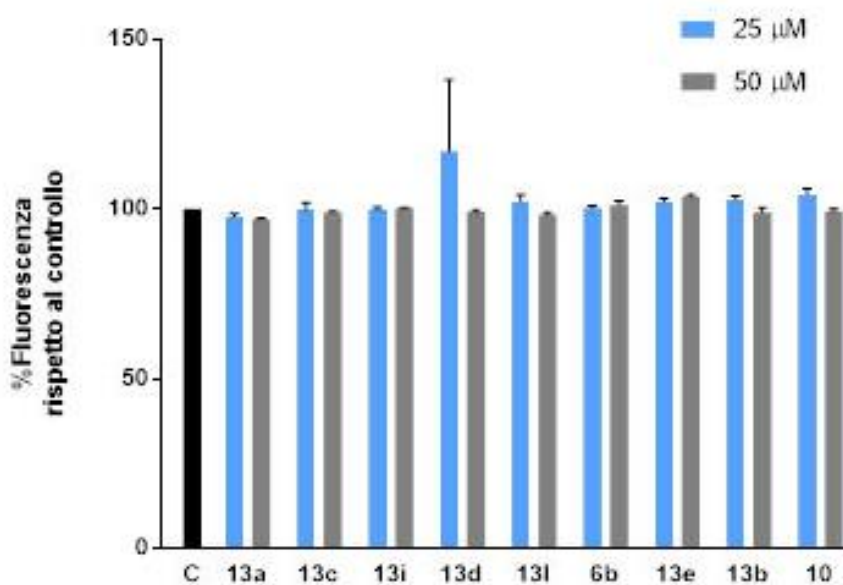


Figura 2.4. Risultati del saggio della DCF effettuato su cellule LAN 5 trattate con i composti alle concentrazioni indicate. I dati sono rappresentati come valore medio \pm deviazione standard

2.2.4.3 Valutazione dell'attività enzimatica della dipeptidil-peptidasi 4

L'enzima dipeptidil-peptidasi 4 (DPPIV) è responsabile dell'idrolisi e inattivazione delle incretine GLP1 e GIP. Quest'ultimi sono ormoni metabolici essenziali per il mantenimento dei valori glicemici nella norma. Sono secreti dall'organismo dopo un pasto e agiscono stimolando il rilascio di insulina e inibendo quello di glucagone. L'identificazione di

molecole capaci di inibire l'attività della DPPIV è di grande importanza per l'identificazione di nuovi agenti ipoglicemizzanti. Alcuni derivati chinazolinonici, 1,2,4-ossadiazolici e (di)-acilguanidinici sono stati testati *in vitro* per mettere in luce una possibile attività inibitoria sull'enzima DPPIV.

Il test di inibizione enzimatica è stato condotto usando DPP4 Activity Assay Kit (Sigma Aldrich). I composti sono stati testati alla concentrazione di 100 μ M. L'attività dell'enzima DPP4 è stata misurata attraverso il cleavage del substrato H-Gly-Pro-AMC nel prodotto fluorescente 7-Amino-4-Methyl-Coumarin (λ_{ex} = 360; λ_{em} = 460). Quindi, la quantità di fluorescenza emessa è stata proporzionale all'attività enzimatica. La fluorescenza è stata registrata a 37 °C, in modalità cinetica, per 30 minuti, con lettura dei valori di fluorescenza ogni minuto. La Sitagliptina è stata usata come controllo positivo.

I valori di fluorescenza sono riportati in funzione del tempo (**Figura 2.5**) e le percentuali di inibizione (**Tabella 2.3**) sono state calcolate come riportato sotto:

$$\% \text{ Relativa di Inibizione} = (\text{Slope EC} - \text{Slope SM}) / \text{Slope EC} \times 100$$

Slope SM = pendenza della retta relativa al composto testato

Slope EC = pendenza della retta relativa all'enzima non inibito

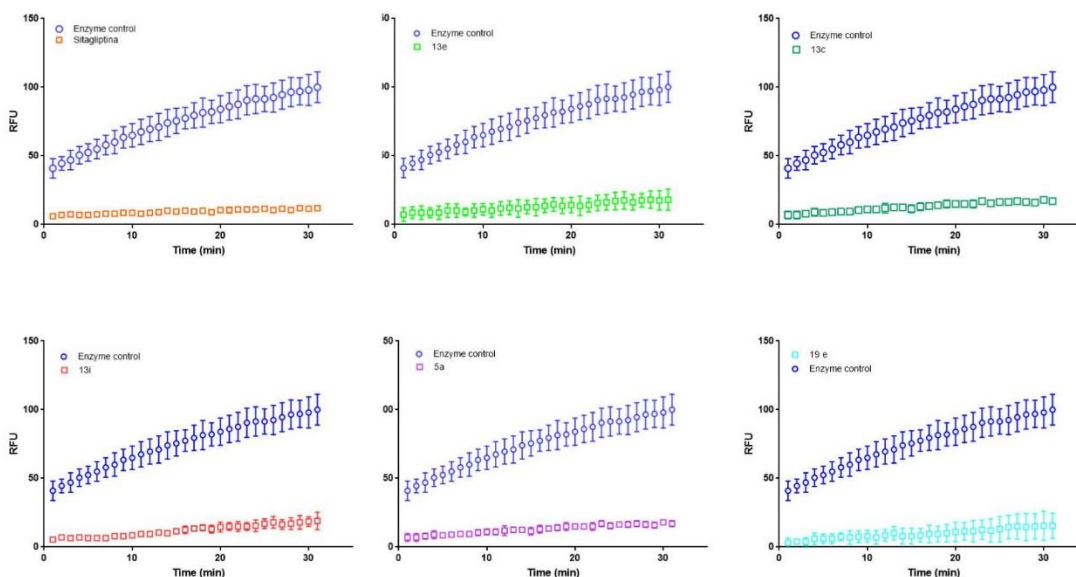


Figura 2.5. Curve rappresentative di inibizione enzimatica della DPPIV in presenza dei composti testati alla concentrazione di 100 μ M. I valori di fluorescenza sono riportati in funzione del tempo. I dati sono stati analizzati attraverso analisi di regressione lineare effettuata sul regime iniziale della curva.

Composto	Inibizione (%) 100 μ M
13c	83
13i	79.1
13e	83.9
13l	72.5
13g	82
13h	NA
13f	87.1
5a	84
19c	79.3
19e	83
17d	37
Sitagliptina	92

Tabella 2.3. Percentuali di inibizione dell'enzima DPPIV

I composti testati hanno dato ottime percentuali di inibizione enzimatica. Fra questi l'alcaloide ipoglicemizzante Glicosina che in precedenti studi di docking molecolare aveva mostrato alta affinità di legame con la didpeptidil peptidasi IV.⁷⁷

2.2.4.4 Valutazione dell'attività enzimatica dell' α -glucosidasi

L'enzima α -glucosidasi scinde gli zuccheri complessi, assunti con la dieta, in zuccheri più semplici e facilmente assorbibili lungo il tratto gastrointestinale. L'inibizione dell' α -glucosidasi rappresenta un efficace approccio terapeutico per il controllo della glicemia post-prandiale. Alcuni derivati 1,2,4-ossadiazolici, chinazolinonici e guanidinici sono stati testati in vitro allo scopo di identificare un loro possibile effetto inibitorio sull'enzima. Il test di inibizione dell' α -glucosidasi è stato eseguito secondo un metodo precedentemente riportato in letteratura.¹⁰⁸ Il saggio si basa sull'idrolisi, enzima catalizzata, del substrato *p*-nitrofenilglucopiranoside a *p*-nitrofenolo. La formazione di quest'ultimo è misurata per assorbanza a 490 nm. L'Acarbosio è stato usato come controllo positivo. Tutti i composti hanno dato valori di assorbanza prossimi a quelli dell'enzima non inibito. Ciò indica che essi non esercitano un'attività inibitoria sull'enzima.

2.3 CONCLUSIONI

Il metodo di riduzione sviluppato consente di utilizzare condizioni di reazione blande e reattivi facilmente reperibili. Esso rappresenta una novità rispetto ai metodi classici che prevedono l'uso di idrogeno come agente riducente. Il metodo è sfruttabile per l'ottenimento di intermedi di vie di sintesi complesse o per la sintesi di composti di interesse biologico. La riduzione di 1,2,4-ossadiazoli variamente sostituiti ha consentito di ottenere con rese molto soddisfacenti e con un ottimo grado di purezza un'ampia libreria di composti chinazolinonici e guanidinici. In particolare, sono stati ottenuti chinazolinoni N (1) sostituiti analoghi dell'alcaloide ipoglicemizzante Glicosina. Invece, i derivati (*di*-)acilguanidinici sono strutturalmente correlabili al farmaco ipoglicemizzante orale Metformina. I derivati chinazolinonici hanno mostrato un buon profilo di citocompatibilità su cellule LAN5 e il test di valutazione dell'attività della DPPIV ha dato risultati molto soddisfacenti riguardo il potenziale inibitore di alcuni dei composti chinazolinonici, ossadiazolici e guanidinici sintetizzati. L'analisi dell'effetto dei composti su modelli animali diabetici potrebbe essere di grande interesse per l'identificazione di nuovi agenti ipoglicemizzanti dotati di maggiore potenza e di minori effetti indesiderati rispetto ai farmaci attualmente in uso.

2.4 MATERIALI E METODI

2.4.1 Chimica

Tutti i solventi e reagenti sono stati acquistati e usati senza ulteriore purificazione. Le reazioni sono state monitorate tramite cromatografia su strato sottile (Merk KGaA, Darmstadt, Germany). I composti sintetizzati sono stati purificati attraverso cromatografia flash usando silice (Merck, 0.040-0.063 mm) e un mix di etile acetato ed etere di petrolio in varie proporzioni come eluenti. Il punto di fusione è stato determinato con un apparato Reichart-Thermovar Hostage su piastra Kofler. ¹HNMR, ¹³CNMR e HPLC/MS sono stati utilizzati per verificare la struttura e la purezza dei composti sintetizzati. L' ¹HNMR e il ¹³CNMR sono stati registrati con spettrometro Bruker 300 Avance alla frequenza di 300 MHz per l' ¹HNMR e 62.5 MHz per il ¹³CNMR; il DMSO-d₆ o CDCl₃ sono stati usati come solventi e il TMS come standard interno. Gli spettri di massa sono stati acquisiti tramite apparato HPLC-massa (6540 UHD Accurate Mass Q-TOF LC/MS – Agilent Technologies) equipaggiato con sorgente Dual AJS ESI.

Procedura generale per la sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 3 a-f

Ad una soluzione in etanolo (30 ml) dell'appropriata ammidossima (1 mmol) è stata aggiunta l'anidride isatoica (1 eq). Il mix di reazione è stato riscaldato a refluxo per circa 5 ore e l'andamento di reazione è stato monitorato tramite controllo TLC. Gli 1,2,4-ossadiazoli finali sono stati purificati tramite cromatografia su colonna usando la miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (20:1).

2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3a)

Solido Bianco; resa 38%; p.f. 128-129 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 6.68-6.73 (m, 1H), 6.95-7.00 (m, 3H), 7.33-7.39 (m, 1H), 7.60-7.62 (m, 3H), 7.84-7.87 (m, 1H), 8.14-8.17 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 104.0, 116.1, 117.0, 126.7, 127.7, 128.9, 129.6, 131.9, 134.5, 149.3, 167.7, 175.2; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₄H₁₁N₃O: 238.0975, sperimentale: 238.0974

2-(3-(4-metossifenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3b)

Solido Marrone; resa 56%; p.f. 131-133 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.86 (s, 3H), 6.67-6.72 (m, 1H), 6.94-7.00 (m, 3H), 7.14 (d, 2H, J'= 9 Hz), 7.32-7.38 (m, 1H), 7.82-7.85 (m, 1H), 8.10 (d, 2H, J'=9 Hz); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 55.8, 104.1, 115.0, 116.1,

117.0, 119.0, 128.9, 129.3, 134.4, 149.2, 162.2, 167.4, 174.9; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₃N₃O₂: 268.1081 sperimentale: 268.1094

2-(3-(4-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3c)

Solido bianco; resa 35%; p.f. 126-129 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 6.67-6.72 (m, 1H), 6.95-7.00 (m, 3H), 7.33-7.38 (m, 1H), 7.42-7.47 (m, 2H), 7.83-7.86 (m, 1H), 8.21-8.29 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 103.9, 116.1, 116.6, 117.0 (d, J= 11.3 Hz), 123.3 (d, J= 3 Hz), 128.9, 130.2 (d, J= 8.9 Hz), 134.5, 149.3, 164.4 (d, J= 247.7 Hz), 166.9, 175.2.; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₄H₁₀FN₃O: 256.0881 sperimentale: 256.0869

2-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3d)

Solido marrone chiaro; resa 56%; p.f. 136-138 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 6.68-6.73 (m, 1H), 6.96-7.00 (m, 3H), 7.34-7.40 (m, 1H), 7.85-7.88 (m, 1H), 7.98 (d, 2H, J=8.0 Hz), 8.39 (d, 2H, J=8.0 Hz); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 103.7, 116.1, 117.1, 124.3 (q, J= 270.8 Hz), 126.5 (q, J= 1.25 Hz), 128.5, 128.9, 129.7, 130.5, 131.8 (q, J=31.8 Hz), 134.6, 149.4, 166.7, 175.5; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₀F₃N₃O: 306.0849 sperimentale: 306.0884

2-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3e)

Solido bianco; resa 24%; p.f. 141-142 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.98 (s, 2H), 6.80-6.86 (m, 2H), 7.35-7.40 (m, 1H), 7.51 (d, 2H, J=8.7 Hz), 8.02 (d, 1H, J=8.5 Hz), 8.12 (d, 2H, J=8.7 Hz). ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 103.8, 116.1, 117.1, 125.6, 128.9, 129.5, 129.8, 134.6, 136.8, 149.4, 167.0, 175.3. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₄H₁₀ClN₃O: 272,0585, sperimentale: 272,0638

2-(3-benzil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (3f)

Solido marrone chiaro; resa 29%; p.f. 87-89 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 4.17 (s, 2H), 6.64-6.69 (m, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.87-6.90 (m, 1H), 7.25-7.37 (m, 6H), 7.80 (m, 1H) ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 31.9, 104.1, 116.1, 116.9, 127.3, 128.8, 129.0, 129.4, 134.4, 136.3, 149.1, 169.2, 174.9. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₃N₃O: 252.1131, sperimentale: 252.1131

Procedura generale per la sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 5 a-c e 6 a-d

Ad una soluzione in toluene (100 ml) dell'appropriata ammidossima (7 mmol) e del 2-fluorobenzoilcloruro (1.1 eq), è stata aggiunta piridina (1.1 eq). Il mix è stato posto a reagire a refluxo. La reazione è stata monitorata tramite TLC. Il solvente di reazione è stato rimosso tramite evaporatore rotante e il prodotto è stato isolato tramite cromatografia su colonna usando una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato nel rapporto 20:1. L'1,2,4-ossadiazolo ottenuto (1mmol) è stato fatto reagire con una soluzione etanolica di metilammina o una soluzione metanolica di etilammina (7.6 ml) e diisopropilettilammina (10 mmol) in un tubo chiuso a pressione. Il tubo è stato posto ad agitare a 80 °C in un bagno ad olio per 12 ore e la reazione è stata monitorata con TLC. Il prodotto desiderato è stato isolato tramite cromatografia su colonna usando la miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (20:1).

3-benzil-5-(2-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazolo (5a)

Solido bianco; resa 35%; p.f. 62-65 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 4.20 (s, 2H), 7.28-7.40 (m, 7H), 7.58-7.59 (m, 1H), 8.11 (s, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 32.4, 117.1 (d, J= 17.4 Hz), 124.6 (d, J= 3.3 Hz), 127.1, 128.0 (d, J= 8.7 Hz), 128.7, 129.1, 130.9, 134.5 (d, J= 7.1 Hz), 135.5, 158.9, 162.4, 169.9, 172.8. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₁N₂O: 255.0928, sperimentale: 255.0929

3-fenil-5-(2-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazolo (5b)

Solido bianco; resa 76%; I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹⁰⁹

3-(4-metossifenil)-5-(2-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazolo (5c)

Solido bianco; resa 75%; I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.

110

N-metil-2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (6a)

Solido bianco; resa 25% ; p.f. 79-81 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.02 (d, 3H, J=4.9 Hz), 6.74-6.78 (m, 1H), 6.90 (d, 1H, J=8.5 Hz), 7.49-7.54 (m, 1H), 7.59-7.64 (m, 3H), 7.67-7.70 (m, 1H), 7.94 (dd, 1H, J'=1.4 Hz, J''= 8.0 Hz), 8.18-8.21 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 29.9, 105.9, 110.9, 115.4, 127.0, 127.5, 128.8, 129.5, 131.2, 134.3, 149.0,

167.7, 175.0; HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{15}H_{13}N_3O$: 252.1131, sperimentale: 252.1131

N-metil-2-(3-benzil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (6b)

Solido bianco; resa 26%; p.f. 57 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 2.92 (d, 3H, $J=4.9$ Hz), 4.19 (s, 2H), 6.70-6.75 (m, 1H), 6.84 (d, 1H, $J=8.6$ Hz), 7.27-7.50 (m, 6H), 7.86 (d, 1H, $J=8.0$ Hz). ^{13}C NMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 29.9, 31.9, 104.7, 111.7, 115.7, 127.4, 129.0, 129.3, 129.4, 135.1, 136.3, 148.9, 169.1, 174.7. HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{16}H_{15}N_3O$: 266.1287, sperimentale: 266.1308

N-etil-2-(3-benzil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (6c)

Solido giallo; resa 10%; p.f. 60 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1.32-1.37 (m, 3H), 3.23-3.32 (m, 2H), 4.15 (s, 2H), 6.67-6.75 (m, 2H), 7.28-7.42 (m, 6H), 7.56 (s, 1H), 7.93-7.96 (dd, $J'=1.2$ Hz $J''=7.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (62.5 MHz, DMSO) δ 14.7, 31.8, 37.5, 104.4, 112.1, 115.8, 127.4, 129.0, 129.3, 129.5, 135.1, 136.2, 148.1, 169.1, 174.6 HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{17}H_{16}N_3O$: 280.1444, sperimentale: 280.1440

N-metil-2-(3-(4-metossifenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (6d)

Solido bianco; resa 23%; p.f. 97-99 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.01 (d, 3H, $J=4.7$ Hz), 3.87 (s, 3H), 6.73-6.78 (m, 1H), 6.89 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 7.14 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.48-7.53 (m, 1H), 7.69-7.70 (m, 1H), 7.91-7.94 (m, 1H), 8.13 (d, 2H, $J=8.7$ Hz). ^{13}C NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 30.1, 55.9, 105.9, 111.8, 115.0, 115.7, 118.8, 129.4, 129.5, 135.1, 149.0, 162.3, 167.3, 174.6; HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{16}H_{15}N_3O_2$: 282.1237, sperimentale: 282.1261

Procedura generale per la sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 6 e-f

Una soluzione in DMSO (20ml) dell'anidride isatoica (3 mmol), di un appropriato alogenuro alchilico (1.1 eq) e di K_2CO_3 (1 eq) è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore, eseguendo continuo monitoraggio TLC. Il solvente di reazione è stato allontanato sottovuoto e il mix di reazione è stato estratto con acqua ed etile acetato. La fase organica è stata essiccata con Na_2SO_4 ed evaporata sottovuoto. Il solido, senza ulteriori purificazioni, è stato solubilizzato in toluene e riscaldato a refluxo con benzilammidossima o *p*-metossibenzammidossima (1.5 eq). La reazione è stata monitorata con TLC per circa 3 ore.

L'ossadiazolo desiderato è stato isolato tramite cromatografia su colonna usando una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (20:1).

N-butil-2-(3-benzil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (**6e**)

Olio incolore; resa 30%; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 0.89-0.93 (m, 3H), 1.30-1.43 (m, 2H), 1.52-1.62 (m, 2H), 3.17-3.23 (m, 2H), 4.17 (s, 2H), 6.67-6.72 (m, 1H), 6.84 (d, 1H, J=8.5 Hz), 7.28-7.45 (m, 5H), 7.55-7.57 (m, 1H), 7.84 (d, 1H, J=8.0 Hz). ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.9, 20.3, 31.1, 32.5, 42.7, 105.1, 111.2, 115.0, 127.1, 128.6, 129.1, 129.4, 134.2, 135.7, 148.2, 168.7, 175.0. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₉H₂₁N₃O: 308.1757 sperimentale: 308.1791

N-etil-2-(3-(4-metossifenil)-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (**6f**)

Solido bianco; resa 26%; p.f. 98-100 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.43-1.48 (m, 3H), 3.31-3.39 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 6.75 (m, 2H), 7.03 (d, 2H, J=8.6 Hz), 7.38-7.43(m, 1H), 7,75 (s, 1H), 8.07 (d, 2H, J= 8.6 Hz) ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.6, 37.7, 55.4, 105.2, 111.3, 114.2, 115.2, 119.4, 128.9, 129.4, 134.1, 148.1, 161.9, 167.2, 174.7; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₇N₃O₂: 296.1394, sperimentale: 296.1406

Procedura generale per la sintesi dell'1,2,4-ossadiazolo 10

L'1,2,4-ossadiazolo **3a** (1 mmol) è stato fatto reagire con benzaldeide (1.1 mmol) in presenza di sodiotriacetossiboroidruro (3 mmol) e di acido acetico (2.2 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente sotto costante agitazione, eseguendo il controllo tramite TLC. Dopo 24 ore, una soluzione 1M di NaOH (3ml) è stata aggiunta al mix di reazione. Dopo l'allontanamento del solvente di reazione tramite evaporatore rotante, il solido è stato estratto con H₂O e CHCl₃. La fase organica anidrificata con Na₂SO₄ è stata tirata a secco sottovuoto. Al fine di ottenere il prodotto desiderato, il residuo solido è stato separato su colonna cromatografica usando una miscela costituita da etere di petrolio ed etile acetato (5:1).

N-benzil-2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)-benzenammina (**10**)

Solido giallo; resa 81%; p.f. 132-134 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.60 (d, 2H, J=5.3 Hz), 6.77-6.82 (m, 2H), 7.26-7.54 (m, 9H), 8.05-8.09 (m, 3H), 8.41 (m, 1H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 47.4, 105.7, 111.8, 115.9, 126.9, 127.2, 127.4, 127.5, 128.8 (2C, overlap),

129.5, 131.2, 134.4, 138.7, 148.0, 167.6, 174.9; HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{21}H_{17}N_3O$: 328.144, sperimentale: 328.1452

Procedura generale per la sintesi dei 4-chinazolinoni (13 a-m) e delle (di)-acilguanidine (17 a-e, 19a-g)

Ad una soluzione in MeOH (20ml) dell'appropriato 1,2,4-ossadiazolo (100 mg) è stato aggiunto l'agente riducente NH_4HCO_2 (100 mg) e il catalizzatore Pd/C 5% (10 mg). La reazione è stata posta a riscaldare a refluxo per 2 ore monitorandone l'andamento tramite TLC. Una filtrazione a caldo su carta da filtro si è resa necessaria per rimuovere il catalizzatore al palladio. Il filtrato ottenuto è stato evaporato sottovuoto per rimuovere il metanolo. Nel caso in cui il reagente è stato completamente trasformato nel prodotto quest'ultimo è stato isolato per semplice estrazione con acqua ed etile acetato. In presenza di residui del substrato iniziale si è resa necessaria una separazione su colonna cromatografica usando come eluente una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (1:1).

2-fenil-4-(1H)-chinazolinone (13a)

Solido bianco; resa 100%; p.f. 238-240 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.53-7.60 (m, 4H), 7.75 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.83-7.88 (m, 1H), 8.15-8.20 (m, 3H), 12.55 (s, 1H). HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{14}H_{10}N_2O$: 223.0866, sperimentale: 223.0882. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹¹

2-benzil-4-(1H)-chinazolinone (13b)

Solido bianco; resa 95%; p.f. 247 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3,94 (s, 2H), 7,25-7,47 (m, 6H), 7.60-7.62 (m, 1H), 7.75-7.77 (m, 1H), 8.07-8.09 (m, 1H), 12.42 (s, 1H); HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{15}H_{12}N_2O$: 237.1022, sperimentale: 237.1041. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹²

1-metil-2-fenil-4-(1H)-chinazolinone (13c)

Solido bianco; 68 %; p.f. 160 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 3.71 (s, 3H), 7.47-7.52 (m, 5H), 7.59-7.63 (m, 2H), 7.74-7.79 (m, 1H), 8.35 (dd, $J'=1.4$ Hz, $J''=8.2$ Hz, 1H). HRMS (ESI) $[M+H]^+$: m/z teorica per $C_{15}H_{12}N_2O$: 237.1022, sperimentale: 237.1041. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.⁹¹

2-(4-fluorofenil)-4-(1H)-chinazolinone (13d)

Solido bianco; resa 80%; p.f. 272-274 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.38-7.43 (m, 2H), 7.50-7.55 (m, 1H), 7.74 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.82-7.87 (m, 1H), 8.16 (d, J=8.0 Hz, 1H), 8.24-8.28 (m, 2H), 12.59 (s, 1H). HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₄H₉FN₂O: 241.0772, sperimentale: 241.0789. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.

113

1-metil-2-benzil -4-(1H)-chinazolinone (13e)

Solido giallo; resa 75%; p.f. 100-105 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.63 (s, 3H), 4.28 (s, 2H), 7.28-7.36 (m, 6H), 7.43-7.49 (m, 1H), 7.67-7.73 (m, 1H), 8.36 (dd, J'=1.3 Hz, J''=7.9 Hz, 1H). HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₄N₂O: 251.1179, sperimentale: 251.1178. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹⁴

1-butil-2-benzil-4-(1H)-chinazolinone (13f)

Solido bianco; resa 50%; p.f. 87-89 °C. ;¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.91-0.96 (m, 3H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.52-1.58 (m, 2H), 4.02-4.07 (m, 2H), 4.26 (s, 2H), 7.27-7.38 (m, 6H), 7.43-7.48 (m, 1H), 7.68-7.74 (m, 1H), 8.39-8.42 (m, 1H). ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.6, 19.9, 30.3, 43.2, 47.1, 114.8, 125.9, 127.5, 128.3, 128.9, 129.1, 130.0, 133.8, 134.8, 140.6, 161.8, 169.0. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₉H₂₀N₂O: 293.1684, sperimentale: 293.1653

1-metil-2-(4-metossifenil)-4-(1H)-chinazolinone (13g)

Solido bianco; resa 36%; p.f. 162-164 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.74 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.97 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.60 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.70-7.76 (m, 1H), 8.32 (dd, J'=1.4 Hz, J''=8.0 Hz, 1H). ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 38.4, 55.5, 113.9, 115.4, 120.3, 125.9, 126.8, 128.3, 131.1, 133.7, 142.0, 161.6, 162.2, 168.9. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₄N₂O₂ : 267.1128, sperimentale: 267.1150

1-etil-2-(4-metossifenil)-4-(1H)-chinazolinone (13h)

Solido bianco; resa 72%; p.f. 195-196 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.33-1.37 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 4.23-4.30 (m, 2H), 7.01-7.04 (m, 2H), 7.49-7.56 (m, 4H), 7.75- 7.81 (m, 1H), 8.43-8.46 (m, 1H). ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.3, 43.9, 55.5, 114.0, 115.5, 121.0, 126.0, 127.6, 129.0, 129.7, 133.7, 140.4, 161.1, 162.5, 168.7. HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica

per C₁₇H₁₆N₂O₂: 281.1285, sperimentale: 281.1304

2-(4-metossifenil)-4-(1H)-chinazolinone (13i)

Solido marrone chiaro; resa 82%; p.f. 237 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.86 (s, 3H), 7.10 (d, J=8.9 Hz, 2H), 7.47-7.52 (m, 1H), 7.71 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.79-7.85 (m, 1H), 8.14 (dd, J'=1.1 Hz, J''=7.9 Hz, 1H), 8.20 (d, J= 8.9 Hz, 2H), 12.42 (s, 1H). HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z calcolata per C₁₅H₁₂N₂O₂: 253.0972, sperimentale: 253.0095. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹⁵

2-(4-(trifluorometil)fenil)-4-(1H)-chinazolinone (13l)

Solido bianco; resa 40%; p.f. 320 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.55-7.60 (m, 1H), 7.79-7.96 (m, 4H), 8.19 (d, J=8.1 Hz, 1H), 8.38 (d, J=8.1 Hz, 2H), 12.76 (s, 1H). HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₉F₃N₂O: 291.0739, sperimentale: 291.0772. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹⁶

1-etil-2-benzil-4(1H)-chinazolinone (13m)

Solido bianco; resa 40%; p.f. 103 °C.; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.22-1.26 (m, 3H), 4.18 (q, J'= 6.9 Hz, J''= 14.1 Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 7.26-7.39 (m, 5H), 7.44-7.50 (m, 2H), 7.69-7.74 (m, 1H), 8.40-8.42 (m, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.5, 42.1, 43.1, 114.7, 125.9, 127.5, 128.4, 129.1, 130.1, 133.9, 134.8, 140.3, 152.9, 161.8, 169.1; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₆N₂O: 265.1335, sperimentale: 265.1359

2-benzil-3-metil-4(3H)-chinazolinone (14)

Solido bianco; resa 71%; p.f. 90 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.50 (s, 3H), 4.29 (s, 2H), 7.27-7.35 (m, 5H), 7.46-7.51 (m, 1H), 7.75-7.79 (m, 2H), 8.28 (d, J= 7.5 Hz, 1H). I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹¹⁷

2-benzil-3-etil-4(3H)-chinazolinone (15a)

Solido bianco; resa 79%; p.f. 91-93 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 1.06 (m, 3H), 4.00 (q, J'= 7.0 Hz, J''= 13.8 Hz), 4.29 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H), 7.48-7.53 (m, 1H), 7.65 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.77-7.83 (m, 1H), 8.12 (dd, J'= 1.2 Hz, J''=8.1 Hz, 1H); HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₆N₂O: 265.1335, sperimentale: 265.1358

2-benzil-4-etossichinazolina (15b)

Olio viscoso; resa 21 %; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.45-1.50 (t, J= 6.9 Hz; 3H); 4.28 (s, 2H), 4.61 (q, J'= 7.2 Hz, J''= 14.1 Hz, 2H), 7.20-7.33 (m, 3H), 7.47-7.52 (m, 3H), 7.76-7.82 (m, 1H), 7.91 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 8.12 (d, J= 8.1 Hz, 1H).; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₇N₂O₂: 265.1330, sperimentale: 265.1353. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura. ¹¹⁸

N-carbamimidoilbenzammide (17a)

Solido bianco; resa 69%; p.f. 154-155 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.94 (s, 1H), 7.40-7.53 (m, 3H), 8.06 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 8.16 (d, J= 7.5 Hz, 2H); HRMS (ESI) [M-H]⁻: m/z teorica per C₈H₉N₃O: 162.0673, sperimentale: 162.0671. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura. ¹¹⁹

N-carbamimidoilfuran-2-carbossammide (17b)

Olio; resa 48 %; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 6.51-6.52 (dd, J'=1.69 Hz, J''= 3.23 Hz, 1H), 6.92 (d, J=3.26 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H). ¹³CNMR (62,5 MHz, DMSO) δ ppm 111.9, 114.0, 144.9, 153.2, 163.2, 168.4; HRMS (ESI) [M-H]⁻: m/z teorica per C₆H₇N₃O₂: 152.0465, sperimentale: 152.0465

N-(N-metilcarbamimidoil)benzammide (17c)

Olio; resa 93%; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 2.79 (s, 3H), 7.35-7.43 (m, 3H), 8.08 (s, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 128.1, 128.9, 130.8, 139.7, 140.5, 175.5; HRMS (ESI) [M-H]⁻: m/z teorica per C₉H₁₁N₃O: 176.0829, sperimentale: 176.0831

N-carbamimidoil-3-metilbutanamide (17d)

Solido Giallo; resa 51%; p.f. 167-170 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.30 (s, 9H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 26.5, 28.2, 40.9, 157.3, 181.7; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₆H₁₃N₃O: 144.1131, sperimentale: 144.1131

N-(N-metil-N-fenilcarbamimidoil)benzammide (17e)

Solido bianco; resa 100%; p.f. 149-151 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.43 (s, 3H), 7.35-7.53 (m, 8H, overlap), 8.02-8.04 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 30.2, 127.7, 127.8, 128.2, 129.1, 130.0, 131.3, 139.4, 143.2, 160.8, 175.6; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z

teorica per C₁₅H₁₅N₃O: 254.1287, sperimentale: 254.13

N,N'-(imminometilene)bis(tiophene-2-carbossammide) (**19a**)

Solido bianco; resa 83%; p.f. 167-170 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 7.23 (s, 2H), 7.93 (s, 4H), 9.29 (s, 2H), 12.30 (s, 1H); ¹³CNMR (62,5 MHz, DMSO) δ ppm 128.8, 132.1 (2C, overlap), 134.1, 158.9 (3C, overlap); HRMS (ESI) [M-H]⁻ : m/z teorica per C₁₁H₉N₃O₂S₂: 278.0063, sperimentale: 278.0064

N-(*N*-benzoilcarbamidoloil)-4-metilbenzammide (**19b**)

Solid giallo chiaro; resa 85%; p.f. 158-160 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.45 (s, 3H), 7.28-7.33 (m, 3H), 7.47-7.52 (m, 2H), 7.56-7.61 (m, 1H), 8.00 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 8.13-8.16 (m, 2H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 128.4, 128.5, 128.6, 129.4, 131.3, 132.7, 135.2, 143.9, 159.2, 173.0, 175.1; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₅N₃O₂: 282.1237, sperimentale: 282.1306

N-(*N*-acetilcarbamidoloil)benzammide (**19c**)

Solido giallo; resa 43%; p.f. 124-127 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.02 (s, 3H), 7.43-7.48 (m, 2H), 7.52-7.57 (m, 1H), 8.16 (d, J= 7.2 Hz, 2H), 9.34 (s, 2H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 30.2, 128.5, 128.9, 132.3, 137.1, 159.5, 163.9, 165.2; HRMS (ESI) [M+H]⁺ : m/z teorica per C₁₀H₁₁N₃O₂: 206.0924, sperimentale: 206.0952

N-(*N*-acetilcarbamidoloil)-4-metossibenzamide (**19d**)

Solido marrone; resa 30%; p.f. 87-90 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.88 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 7.07-7.10 (dd, J'= 2.51 Hz, J''= 8.16 Hz, 1H), 7.33-7.38 (m, 1H), 7.72 (d, J= 1.5 Hz, 1H), 7.77 (d, J= 7.8 Hz, 1 H), 9.40 (s, 2H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 24,4, 55.3, 113.0, 119.2, 121.3, 129.5, 138.4, 159.4, 159.7, 174.1, 178.7

N,N'-(imminometilene)dibenzammide (**19e**)

Solido bianco; resa 88%; p.f. 153-155 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.50-7.63 (m, 6H), 8.14 (d, J= 7.2 Hz, 4H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 123.8, 123.9, 128.1, 129.8, 154.3. I dati spettroscopici sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹²⁰

N-(*N*-acetilcarbamidoloil)furan-2-carbossammide (**19f**)

Solido arancione; resa 67%; p.f. 147-150 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.10 (s, 3H),

6.51 (d, J= 1.6 Hz, 1H), 7.19 (d, J= 3.3 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 29.7, 112.1, 116.7, 145.6, 150.9, 159.1, 169.5, 173.7; HRMS (ESI) [M+H]⁺ : m/z teorica per C₈H₉N₃O₃: 196.0717, sperimentale: 196,0758

N-(*N*-acetilcarbamidoloil)-2-metilbenzammide (**19g**)

Solido bianco; resa 47%; p.f. 107-110 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.74 (s, 1H), 2.55 (s, 1H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.35-7.38 (m, 1H), 9.71 (s, 2H); ¹³CNMR (62,5 MHz, CDCl₃) δ ppm 20.9, 24.4, 125.7, 129.2, 130.9, 131.4, 137.1, 138.0, 159.3, 175.2, 180.8; HRMS (ESI) [M+H]⁺ : m/z teorica per C₁₁H₁₃N₃O₂: 220.1081, sperimentale: 220.1038

2.4.2 Biologia

Saggio di vitalità cellulare

Il saggio di vitalità cellulare è stato effettuato su cellule LAN5 fatte crescere fino a confluenza ($\approx 6 \times 10^5$ cell/ml) in una piastra a 96 pozzetti e trattate con quattro concentrazioni dei composti di interesse (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M). Dopo 24 ore dal trattamento la valutazione della citotossicità è stata eseguita usando il saggio MTS (Promega) seguendo le istruzioni del produttore. In particolare, 20 μ l della soluzione di MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimirtossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e le cellule sono state lasciate ad incubare per 4 ore a 37 °C e al 5% di CO₂. L'assorbanza a 490 nm è stata letta su un lettore di piastra WallacVictor 2 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Monza, Italia). I risultati sono espressi come percentuale dei valori di assorbanza delle cellule trattate rispetto al controllo (cellule non trattate), in accordo con la seguente equazione:

$$\text{Vitalità} = (\text{OD Composto} / \text{OD Controllo}) \times 100\%$$

Saggio della Diclorofluoresceina

La valutazione della produzione intracellulare di ROS, mediante analisi fluorimetrica, è stata effettuata su cellule LAN 5 piastrate in una piastra a 96 pozzetti e lasciate crescere a confluenza ($\approx 6 \times 10^5$ cell/ml). Dopo 24 ore dal trattamento con i composti, alla concentrazione di 25 μ M e 50 μ M, le cellule sono state incubate con una soluzione 1mM di diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente e al buio. Dopo il lavaggio in PBS le cellule sono state analizzate con lettore di piastra a fluorescenza (WallacVictor 2 1420 Multilabel Counter-PerkinElmer). Il filtro di eccitazione è stato impostato a 485 nm mentre il

filtro di emissione a 530 nm. I valori di fluorescenza delle cellule trattate sono stati confrontati con quelli delle cellule non trattate.

Saggio di valutazione dell'attività enzimatica della DPPIV

Per il test di inibizione della DPP4 è stato usato il kit fluorimetrico DPP4 Activity Fluorometric Assay Kit (Sigma Aldrich) in accordo con le istruzioni del produttore. I composti sono stati sciolti in DMSO alla concentrazione iniziale di 10 mM e testati alla concentrazione di 100 μ M. Il test è stato condotto in una piastra per fluorescenza a 96 pozzetti. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 25 μ l del composto da testare (alla concentrazione di 400 μ M), 49 μ l di buffer e 1 μ l di enzima. La piastra è stata posta ad incubare a 37 °C e al riparo dalla luce. Successivamente, un mix di reazione costituito da 23 μ l di buffer e 2 μ l del substrato dell'enzima è stato aggiunto a ciascun pozzetto. L'attività enzimatica è proporzionale alla quantità di prodotto fluorescente generato. La lettura dei valori di fluorescenza è stata effettuata con lettore di piastra BioTek (λ_{ex} = 360; λ_{em} = 460), in modalità cinetica per 30 min. L'inibitore noto Sitagliptina è stato usato come controllo positivo del test.

2.5 BIBLIOGRAFIA

1. Li, F., Lu, L., Ma, J. *Org Chem Front* **2015**, *2*, 1589-1597
2. Mishra, S., Das, D., Sahu, A., Patil, S., Agarwal, R.K., Gajibhiye, A. *Curr Org Cat* **2020**, *7*, 118-123
3. Kausar, N., Roy, I., Chattopadhyay, D., Das, A.R. *Rcs Adv* **2016**, *6*, 22320-22330
4. Shen, G., Zhou, H., Sui, Y., Liu, Q., Zou, K. *Tetrahedron Lett* **2016**, *57*, 587-590
5. Li, Z., Dong, L., Chen, X., Li, Q., Zhou, Y., Yin, S. *J Org Chem* **2015**, *80*, 9392-9400
6. Das, S., Sinha, S., Samanta, D., Mondal, R., Chakraborty, G., Brandaõ, P. *J Org Chem* **2019**, *84*, 10160-10171
7. Wang, Z., Tang, Y. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1330-1336
8. Wei, L., Wu, G., Wenxia, G., Jinchang, D., Xiaobo, H., Miaochang, l., *et al.* *Org Chem Front* **2018**, *5*, 2734
9. Karasala, B.K., Gollamudi, P., Inkollu, B., Vidavalur, S. *Russian J Org Chem* **2020**, *56*, 1446-1454
10. Abdullaha, M., Mohammed, S., Ali, M., Kumar, A., Vishwakarma, R.A., Bharate, S.B. *J Org Chem* **2019**, *84*, 5129-5140
11. Arachchige, P.T., Yi, C.S. *Org Lett* **2019**, *21*, 3337-3341
12. Sharma, R., Abullaha, M., Bharate, S.B. *Asian J Org Chem* **2017**, *6*, 1370-1374
13. Xia, Q., Shi, Z., Yuan, J., Bian, Q., Xu, Y., Liu, B., *et al.* *Asian J Org Chem* **2019**, *8*, 1933-1941
14. Yang, X., Cheng, G., Shen, J., Kuai, C., Cui, X. *Org Chem Front* **2015**, *2*, 366-368
15. Abdullaha, M., Mohammed, S., Ali, M., Kumar, A., Vishwakarma, R.A., Bharate, S.B. *J Org Chem* **2019**, *84*, 5129-5140
16. Saeed, B., Samira, A., Haleh, H., Leila, M., Mohsen, B., Rahim, E., Mohammad, M. *Appl Organomet Chem* **2019**, *33*
17. Wu, H.F., He, L., Neumann, H., Beller, M. *Chem Eur J* **2013**, *19*, 12635
18. You, S., Huang, B., Yan, T., Cai, M. *J Org Met Chem* **2018**, *875*, 35-45
19. Shinde, M.H., Kshirsagar, U.A. *RCS Adv* **2016**, *6*, 52884-52887
20. Upadhyaya, K., Thakur, R.K., Shukla, S.K., Tripathi, R.P. *J Org Chem* **2016**, *81*, 5046-5055
21. Iqbal, M.A., Lu, L., Mehmood, H., Khan, D.M., Hua, R. *ACS Omega* **2019**, *4*, 8207-8213
22. Rohit, S., Ram, V., Sandip, B. *Eur J Org Chem* **2016**, *2016*, 5227-5233

23. Liu, X., Fu, H., Jiang, Y., Zhao, Y. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 348-351; *Angew Chem* **2009**, *121*, 354-257
24. Huang, X., Yang, H., Fu, H., Qiao, R., Zhai, Y. *Synthesis* **2009**, *16*, 2679-2688
25. Abhishek, T., Bhalchandra, B. *RCS Adv* **2015**, *5*, 57235-57239
26. Dubey, A.V., Kumar, A.V. *ACS Sustainable Chem Eng* **2018**, *6*, 14283-14291
27. Thakur, M.S., Nayal, O.S., Bhatt, V., Sharma, S., Kumar, N. *Asian J Org Chem* **2016**, *5*, 750-754
28. Mehdi, S., Shakiba, S., Rahim, P. *Monatshefte fuer Chemie* **2017**, *148*, 739-743
29. Thriveni, P., Ramesh, K., Krishna, M., Sekhar, T. *Het Lett* **2020**, *10*, 47-52
30. Sayahi, M.H., Bahadorikhalili, S., Mahdavi, M., Baghshirin, L. *Chem Het Comp* **2019**, *55*, 964-967
31. Rao, K.R., Mekala, R., Raghunadh, A., Meruva, S.B., Kumar, S.P., Kalita, D., et al. *RCS Adv* **2015**, *5*, 61575-61579
32. Mekala, R., Akula, R., Kamaraju, R.R., Bannoth, C.K., Regati, S., Sarva, J. *Synlett* **2014**, *25*, 821-826
33. Ahmed, T.J., Knapp, S.M.M., Tyler, D.R., *Coord Chem Rev* **2011**, *255*, 949-974
34. Anshu, D., Pratibha, S., Sarika, B., Vijay, P. *Chem Select* **2019**, *4*, 9871-9877
35. Fiorito, S., Taddeo, V.A., Epifano, F., Genovese, S. *Arkivoc* **2017**, *2017*, 68-75
36. Zhao, W. Liu, P, Li, F. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1523-1530
37. Chai, H., Li, J., Yang, L., Liu, M., Yang, D., Zhang, Q., Shi, D. *Chin J Chem* **2014**, *32*, 865-870
38. Yongke, H., Shaozhong, L., Huaiu, L., Yanxing, L., jin, L., Chuansong, D., et al. *Org Chem Front* **2019**, *6*, 2744-2748
39. Lin, T., Xianghua, Z., Guodong, Z., Yugiang, Z., Xingkun, Y. *Asian J Org Chem* **2016**, *5*, 335-339
40. Wang, Q., Lv, M., Liu, J., Li, Y., Xu, Q., Zhang, X., et al. *ChemsusChem* **2019**, *12*, 3043-3048
41. Feng, Y., Li, Y., Cheng, G., Wang, L., Cui, X. *J Org Chem* **2015**, *80*, 7099-7107
42. Jia, F., Zhou, Z., Xu, C., Wu, Y., Wu, A. *Org Lett* **2016**, *18*, 2942-2945
43. Noser, A.A., El-Naggar, M., Donia, T., Abdelmonsef, A.H. *Molecules* **2020**, *25*, 4780
44. Thakur, A., Tawa, G.J., Henderson, M.J., Danchik, C., Liu, S., Shah, P., et al. *J Med Chem* **2020**, *63*, 4256-4292
45. Huang, W.Y., Zhang, X., Lyu, L., Wang, S., Zhang, X. *Bioorg Chem* **2020**, *99*, 103814

46. Duraipandiyam, V., Al-Dhabi, N.A., Balachandran, C., Ignacimuthu, S., Sankar, C., Balakrishna, K. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 727304
47. Rakesh, K.P., Kumara, H.K., Ullas, B.J., Shivakumara, J., Gowda, D.C. *Bioorg Chem* **2019**, *90*, 103093
48. Bouley, R., Kumarasiri, M., Peng, Z., Otero, L.H., Song, W., Suckow, M.A., *et al.* *J Am Chem Soc* **2015**, *137*, 1738-1741
49. Qureshi, S.I., Chaudhari, H.K. *Bioorg Med Chem* **2019**, *27*, 2676-2688
50. Janardhanan, J., Bouley, R., Martinez-Caballero, S., Peng, Z., Batuecas-Mordillo, M., Meisel, J.E., *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* **2019**, *63*, e02637-18
51. Qureshi, S.I., Chaudhari, H.K. *Bioorg Med Chem* **2019**, *27*, 2676-2688¹ Qian, Y., Allegretta, G., Janardhanan, J., Zhihong, P., Mahasenani, K., Kiran, V., *et al.* *J Med Chem* **2020** (Ahead of print)
52. Kotla, V.V., Garlapati, R., Chunduri, V.R. *J Heterocyclic Chem* **2016**, *53*, 719-726
53. Ghorab, M.M., Alqahtani, A.S., Soliman, A.M., Askar, A.A. *Int J Nanomedicines* **2020**, *15*, 3161-3180
54. Smullen, S., McLaughlin, N.P., Evans, P. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26*, 2199-2220
55. Fishman, M., Cruickshank, P.A. *J Med Chem* **1970**, *13*, 155-156
56. Keller, T.L., Zocco, D., Sundrud, M.S., Hendrick, M., Edenius, M., Yum, J., *et al.* *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 311-317
57. Mai, H.D., Thanh, G.V., Tran, V.H., Vu, V.N., Vu, L.V., Truong, B.N. *Tetrahedron Lett* **2014**, *55*, 7226-7228
58. Patel, T.S., Bhatt, J.D., Vanparia, S.F., Patel, U.H., Dixit, R.B., Chudasama, C.J., *et al.* *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 6635-6646
59. Pedgaonkar, G.S., Sridevi, J.P., Jeankumar, V.U., Saxena, S., Devi, P.B., Renuka, J., *et al.* *Eur J Med Chem* **2014**, *86*, 613-627
60. Hammer, H., Bader, B.M., Ehnert, C., Bundgaard, C., Bunch, L., Hoestgaard-Jensen, K., *et al.* *Mol Pharmacol* **2015**, *88*, 401-420
61. Jain, N., Singour, P.K. *Lett Drug Des Discov* **2020**, *17*, 199-213
62. Jahng, Y. *Arch Pharmacol Res* **2013**, *36*, 517
63. Lee, E.S., Kim, S.I., Lee, S.H., Jeong, T.C., Moon, T.C., Chang, H.W., Jahng, Y. *Bull Korean Chem Soc* **2005**, *26*, 1975
64. Abdel-Aziz, A. A.M., Abou-Zeid, L.A., ElTahir, K.E.H., Mohamed, M.A., El-Enin, M.A.A., El-Azab, A.S. *Bioorg Med Chem* **2016**, *24*, 3818-3828

65. Dewengan, D., Nakhate, K.T., Verma, V.S., Nagori, K., Tripathi, D.K. *J Heterocyclic Chem* **2017**, *54*, 3187-3194
66. Rakesh, K.P., Suhas, R., Gowda, D.C. *Int J Pept Res Ther* **2019**, *25*, 227-234
67. Schenkel, L.B., Olivieri, P.R., Boezio, A.A., Deak, H.L., Emkey, R., Graceffa, R.F., et al. *J Med Chem* **2016**, *59*, 2794-2809
68. Pieterse, L., Van der Walt, M.M., Terre'Blanche, G. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30*, 127274
69. Thornton, E., Vink, R. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34138
70. Long, S., Resende, D.I.S., Kijjoo, A., Silva, A.M.S., Fernandes, R., Xavier, C.P.R., et al. *Molecules* **2019**, *24*, 534
71. Haghijoo, Z., Firuzi, O., Hemmateenejad, B., Emami, S., Edraki, N., Miri, R. *Bioorg Chem* **2017**, *7*, 126-133
72. Refaie, F.M., Esmat, A.Y., Abdel Gawad, S.M., Ibrahim, A.M., Mohamed, M.A. *Lipids Health Dis* **2005**, *4*, 422
73. Mokale, S.N., Palkar, A.D., Dube, P.N., Sakle, N.S., Miniyar, P.B. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26*, 272-276
74. Baldea, L.A.N., Martineau, L.C., Benhaddou-Andaloussi, A., Arnason, J.T., Levy, E., Haddad, P.S. *Ethnopharmacol* **2010**, *132*, 473-482
75. Selvaraj, G., Kaliampurthi, S., Trirugnanasambandam, R. *Biocatal Agric Biotechnol* **2015**, *4*, 653-660
76. Selveraj, G., Kaliampurthi, S., Trirugnanasambandam, R. *Bangladesh J Pharmacol* **2014**, *9*, 298-302
77. Gurudeeban, S., Satyavani, K., Sengottuvel, S., Thamocharan, G., Ramanathan, T. *Pharma Innov* **2015**, *4*, 31-35
78. Selveraj, G., Kaliampurthi, S., Trirugnanasambandam, R. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 632-640
79. Wei, M., Chai, W.M., Wang, R., Yang, Q., Deng, Z., Peng, Y. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 1303-1308
80. Saeedi, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Pourrabia, P., Razzaghi, N., Ghadimi, R., Imanparast, S., et al. *Bioorg Chem* **2019**, *83*, 161-169
81. Ali, Z., Akhtar, M.J., Siddiqui, A.A., Khan, A.A., Haider, M.R., Yar, M.S. *Arch Pharm Chem Life Sci* **2017**, *350*, e1600298
82. Ibrahim, M.K., Eissa, I.H., Alesawy, M.S., Metwaly, A.M., Radwan, M.M., ElSohly, M.A. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25*, 4723-4744
83. Rauf, M.K., Din, I., Badshah, A. *Expert Opin Drug Discov* **2014**, *9*, 39-53

84. Saczewski, F., Balewski, L. *Expert Opin Ther Patents* **2013**, *23*, 965-995
85. Ghorai, P., Kraus, A., Keller, M., Götte, C., Igel, P., Schneider, E., *et al.* *J Med Chem* **2008**, *51*, 7193–7204.
86. Simons, J.K., Ohio, T., Weaver, W.I. *Pittsburg United States Patent Office* **1942**, 260-254
87. Cardullo, F., Donati, D., Merlo, G., Paio, A., Petricci, E., Taddei, M. *Synlett* **2009**, *2009*, 47–50
88. Shinada, T., Umezawa, T., Ando, T., Kozuma, H., Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett* **2006**, *47*, 1945-1947
89. Cunha, S., Costa, M.B., Napolitano, H.B., Lariucci, C., Vencato, I. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1671–1675.
90. Pape, S., Wessig, P., Brunner, H. *J Org Chem* **2016**, *81*, 4701-4712
91. Åkerbladh, L., Schembri, L.S., Larhed, M., Odell, L.R. *J Org Chem* **2017**, *82*, 12520-12529
92. Dharmpal, S.D., Yufen, Z. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42*, 1259-1262
93. Kagermeier, N., Werner, K., Keller, M., Baumeister, P., Bernhardt, G., Seifert, R., *et al.* *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, *23*, 3957-3969
94. Adang, A.E., Lucas, H., de Man, A.P, Engh, R.A., Grootenhuis, P.D. *J Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 3603–3608
95. Shinji, K., Schinichi, N., Masaki, H., Masayuki, I., Hideaki, K. *J Org Chem* **2015**, *80*, 6076-6082
96. Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D., Malawska, B. *Curr Med Chem* **2015**, *22*, 373-404
97. Zou, Y., Li, L., Chen, W., Chen, T., Ma, L., Wang, X., *et al.* *Molecules* **2013**, *18*, 5706-5722
98. Nisha, C.M., Kumar, A., Nair, P., Gupta, N., Silakari, C., Tripathi, T., *et al.* *Adv Bionformatics* **2016**, *2016*, 9258578
99. Zhu, Z., Sun, Z.Y., Voigt, J., Strickland, C., Smith, E.M., Cumming, J., *et al.* *J Med Chem* **2010**, *53*, 951-965
100. Rogister, F., Laeckmann, D., Plasman, P.O., Van Eylen, F., Ghyoot, M., Maggetto, C., *et al.* *Eur J Med Chem* **2001**, *36*, 597-614
101. Sriwailajaroen, N., Magesh, S., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Sakai, M., *et al.* *J Med Chem* **2016**, *59*, 4563-4577
102. Ewart, G.D., Mills, K., Cox, G.B., Gage, P.W. *Eur Biophys J* **2002**, *31*, 26–35
103. Khohury, G., Ewart, G., Luscombe, C., Miller, M., Wilkinson, J. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54*, 835–845

104. Mwimanzi, P., Tietjen, I., Miller, S.C., Shahid, A., Cobarrubias, K., Kinloch, N.N., *et al. J Virol* **2016**, 90, 20
105. Buscemi, S., Pace, A., Frenna, V., Vivona, N. *Tetrahedron* **1995**, 51, 5133-5142
106. Buscemi, S., Pace, A., Frenna, V., Vivona, N. *Heterocycles* **2002**, 57, 811-823
107. Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Barera, A., Vasto, S., Di Carlo, M. *Biochim Biophys Acta* **2015**, 1853, 1046-1059
108. Farooq, A., Shahazadi, L., Bajda, M., Ullah, N., Rauf, A., Shazad, S.A., Farooq, A.K., Ashraf, M., Yar, M. *Arch Pharm Chem Life Sci*, **2016**, 349, 724–732
109. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Pierro, P., Pibiri, I., Buscemi, S., Vivona, N. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 119-127
110. Auld, D.S., Zhang, Y., Southall, N.T., Rai, G., Landsman, M., MacLure, J., *et al. J Med Chem* **2009**, 52, 1450-1458
111. Hanusek, J., Sedlák, M., Šimůnek, P., Štěřba, V. *Eur J Org Chem* **2002**, 2002, 1855-1863
112. Chakrabarty, M., Batabyal, A., Morales-Rios, M.S., Nathan, P. *Monatshefte fur Chemie* **1995**, 126, 789-794
113. Hosein Sayahi, M., Bahadorikhalili, S., Jafar Saghanzhad, S., Mahdavi, M. *Res Chem Intermed* **2018**, 44, 5241-5243
114. Bhattacharrya, J. *Heterocycles* **1980**, 14,10
115. Kidwai, M., Priya. *Indian J Chem* **2007**, 47B, 1876-1881
116. Bie, Z., Li, G., Wang, L., Lv, Y., Niu, J., Gao, S. *Tetrahedrons Lett* **2016**, 57, 4935-4938
117. Pakrashi, S.C., Chakravarti, A.K. *J Chem Soc* **1969**, 23, 1443-1444
118. Wang, H., Lorion, M.M., Ackermann, L. *Angew Chem* **2016**, 55, 10386-10390
119. Kuan, L., Liancheng, D., Boxuan, X., Weile, Y., Di, W., Yanfang, Z., Ping, G. *RCS Adv* **2016**, 6, 54277-54280
120. Nakae, I. *Neurosci* **1981**, 7, 205-217

CAPITOLO III

Sintesi e valutazione biologica di 1,2,4-ossadiazoli potenziali modulatori degli chaperoni molecolari

L'1,2,4-ossadiazolo è ampiamente sfruttato in chimica farmaceutica in quanto valido isostero di gruppi esterei ed ammidici. I composti **A** e **B** in **Figura 1** possiedono rispettivamente un'attività inibitoria sullo chaperone HSP70¹ e modulatoria sullo chaperone Hsp60.^{2,3}

In questo capitolo, i composti A e B sono stati considerati come Lead Compounds nello sviluppo di nuovi derivati 1,2,4-ossadiazolici che potrebbero trovare applicazione nel trattamento di complesse patologie come l'Alzheimer e il diabete, in cui è noto il coinvolgimento degli chaperoni molecolari. Il legame ammidico, presente nei Lead Compounds, è stato sostituito dall' nucleo 1,2,4-ossadiazolico.

La valutazione biologica dei composti sintetizzati è stata effettuata durante il periodo di ricerca svolto presso l'University of Texas of Medical Branch (Galveston, TX) sotto la guida del Professore Rakez Kaye e con la collaborazione della Dottoressa Filippa Lo Cascio e del Dottore Mauro Montalbano.

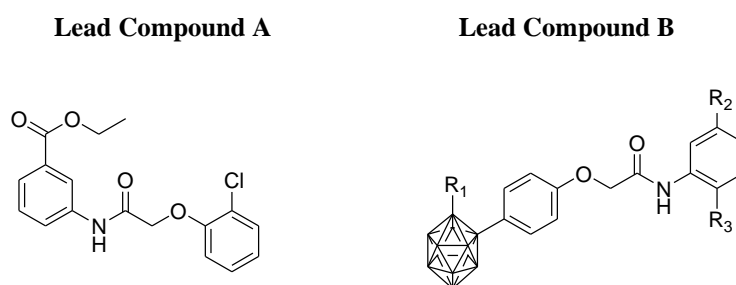


Figura 1

3.1 INTRODUZIONE

Gli chaperoni molecolari sono una classe di biomolecole localizzate all'interno delle cellule, nell'ambiente extracellulare e nei fluidi del corpo. Poiché vengono over-espressi in situazioni di stress sono comunemente chiamati Heat Shock Proteins (HSPs-Proteine attivate dal calore). Essi svolgono un ruolo protettivo mantenendo la normale omeostasi cellulare ed in particolare il giusto ripiegamento proteico. Affinché le proteine dell'organismo possano svolgere correttamente tutte le funzioni a cui sono destinate è necessario che oltre ad avere una corretta sequenza degli amminoacidi e quindi una corretta struttura primaria, abbiano anche un giusto ripiegamento e quindi un'appropriata struttura terziaria. Gli chaperoni molecolari rappresentano il principale sistema di controllo della qualità delle proteine in quanto le coadiuvano nell'assunzione del giusto folding, ne facilitano il refolding o in alcuni casi ne promuovono la degradazione indirizzando le proteine difettose al sistema ubiquitina-proteasoma. In accordo al loro peso molecolare gli chaperoni sono classificati in 7 famiglie: HSP10, small HSPs 15-30 KDa (di cui Hsp27 è un membro), HSP40 (DnaJ), HSP60, HSP70, HSP90, HSPs100. L'anormale composizione e struttura (per mutazioni o modifiche post-traslazionali) o i livelli anormali delle Heat Shock Proteins possono causare condizioni patologiche generalmente definite cheperonopatie. È noto, inoltre, che le HSP sono associate a differenti condizioni cliniche inclusi cancro,⁴ aterosclerosi,⁵ infiammazione⁶ e diabete.⁷

3.1.1 Gli chaperoni molecolari e la patologia diabetica

Differenti studi hanno messo in evidenza una diminuzione delle HSPs in pazienti con diabete di tipo 1 e 2 a causa di meccanismi trascrizionali o post-traslazionali. Inoltre, anche la fluidità della membrana ha un ruolo importante nell'attività del fattore di trascrizione HSF1 essenziale per l'espressione delle HSP. Il diabete e l'insulino resistenza, quindi la glicazione e lo stress ossidativo sono correlati a una maggiore rigidità della membrana che ha effetto sull'espressione delle chaperonine. Inoltre, in questi pazienti, gli alti livelli di glucosio ematico promuovono la reazione di Maillard che comporta una glicosilazione di alcune proteine e la formazione di AGEs (Advanced Glycation Products). Gli AGEs sono aggregati di proteine non funzionali e sono alla base di molti dei disordini secondari associati al diabete quali neuropatia, angiopatia o retinopatia. Inoltre, le stesse HSPs subiscono il processo di glicosilazione perdendo la propria attività di chaperonine. Differenti studi dimostrano che una riduzione della glicazione delle proteine e un aumento della loro stabilità potrebbe ridurre l'insorgenza di molte delle

complicazioni del diabete. Questo può essere fatto mediante composti di natura chimica e farmaceutica, esercizio fisico o calore, tutti fattori che aumentano l'espressione delle HSPs. Inoltre, le HSP intracellulari bloccano il fattore di trascrizione NF-kB avendo quindi un ruolo antiinfiammatorio. I bassi livelli di HSP portano quindi a un aumento di attività di NF-kB accentuando l'infiammazione correlata al diabete. Le HSPs sono state identificate anche come potenziali antigeni per lo sviluppo dell'autoimmunità, associata al diabete di tipo 1⁸ e sono inoltre coinvolte nello sviluppo del diabete gestazionale.⁹

3.1.2 Gli chaperoni molecolari e i disordini neurodegenerativi

La presenza di proteine con una conformazione alterata (misfolded) è stata riscontrata in molte malattie neurodegenerative quali Alzheimer, Parkinson, sclerosi amiotrofica laterale, malattia di Huntington, demenza frontotemporale e demenza da corpi di Lewy.¹⁰⁻¹⁴ Nel complesso questi disordini neurodegenerativi vengono raggruppati sotto il nome di "Proteinopatie" e l'identificazione degli aggregati di proteine misfolded è usato come biomarker primario nella diagnosi. È evidente, quindi, il ruolo centrale degli chaperoni nelle malattie neurodegenerative ed esso è stato ampiamente investigato negli ultimi vent'anni.¹⁵

La malattia di Alzheimer si caratterizza per l'anomalo processamento di due proteine A β 42 e Tau. Il peptide A β 42 deriva dall'idrolisi della proteina precursore l'amiloide (APP) mediata dall'enzima BACE1 e dalla γ -secretasi. A β 42 aggrega per formare le placche amiloidi extracellulari o le più tossiche forme oligomeriche.^{16,17} In condizioni patologiche, la proteina Tau, essenziale per le funzioni microtubulari, può subire modifiche post-traslazionali quali fosforilazione o acetilazione che riducono la sua affinità per i microtubuli con conseguente distacco da essi ed aggregazione. Si formano così gli oligomeri solubili di Tau (TauO) i quali a loro volta assemblano in filamenti e in aggregati intracellulari (NFT- Neurofibrillary Tangles).¹⁸ Anche in questo caso gli oligomeri di Tau sono considerati specie altamente tossiche responsabili della perdita neuronale che si osserva prima ancora della formazione di NFTs.¹⁹

3.1.2.1 Hsp70 e Hsp90 e il loro ruolo biologico nella malattia di Alzheimer

La famiglia delle Hsp70 è composta da 17 membri di cui alcuni sono indotti dallo stress mentre altri, come Hsc70, sono costitutivamente espressi. Le chaperonine Hsp70 si trovano in vari compartimenti cellulari quali nucleo, citoplasma, mitocondri e reticolo endoplasmatico. Esse agiscono con meccanismo ATP dipendente associati al co-chaperone Hsp40 e in collaborazione con Hsp90.²⁰

La proteina Hsp70 agisce nelle prime fasi del processo di folding proteico ed insieme al

co-chaperone Hsp40 e alla proteina CHIP forma il complesso di riconoscimento del substrato (**Figura 1.1**). La proteina CHIP agisce come co-chaperone della Hsp70 ma anche come ubiquitina-ligasi indirizzando le proteine al proteasoma e quindi alla degradazione. CHIP svolge, quindi, un importante ruolo nell'equilibrio tra folding proteico e degradazione. Infatti, mentre cellule transfettate con CHIP hanno mostrato un aumento di Tau ubiquitinato, le cellule transfettate con Hsp70 non hanno dato tale effetto.²¹ Successivamente al riconoscimento le proteine possono andare incontro a un processo di refolding mediato esclusivamente dall'Hsp70 o per azione di proteine di trasferimento denominate HOP vengono trasferite all'Hsp90 la quale reclutando i co-chaperoni P23 o Pin1 completa il refolding o opera la defosforilazione della proteina aberrante. In una via alternativa, mediata dall'attività ubiquitin ligasi di CHIP, Hsp90 viene rilasciato dal complesso per essere degradato e contemporaneamente il substrato proteico è indirizzato alla degradazione proteasomica. Inoltre, la degradazione dell'Hsp90 favorisce l'attività del fattore di trascrizione HSF1 il quale è inibito dal legame con Hsp90. HSF1 libero può traslocare nel nucleo e iniziare la trascrizione di altre Hsps.^{22, 23}

Gli chaperoni, oltre a favorire il refolding delle proteine o indirizzarle al sistema di degradazione proteosomica, mediano la degradazione autofagica CMA (Chaperone Mediated Autophagy). Essi mediano il trasferimento delle proteine aberranti al lisosoma attraverso la proteina LAMP-2a (Lysosome-associated membrane protein).²⁴

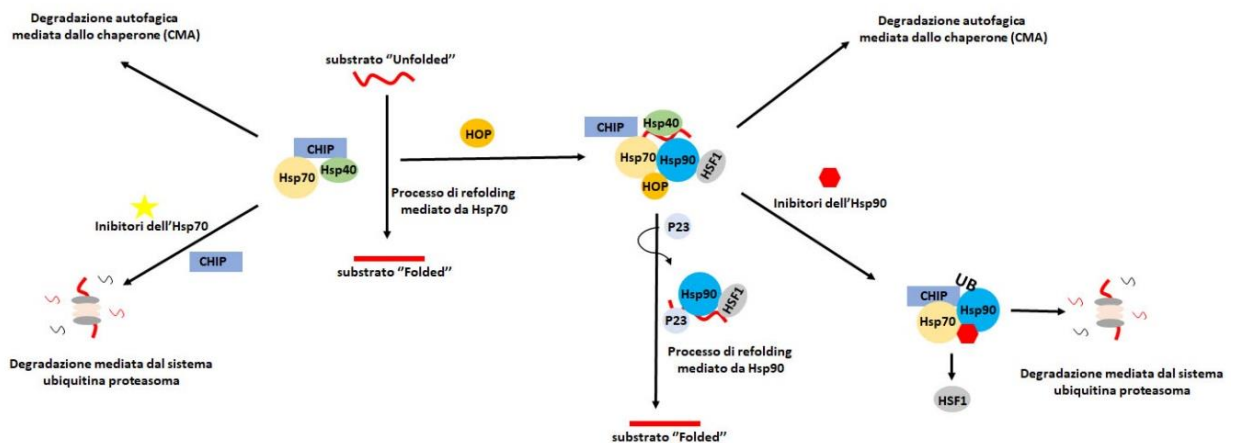


Figura 1.1. Meccanismo proposto per l'interazione proteina cliente-chaperone molecolare

Diversi studi dimostrano il coinvolgimento dell'Hsp70 e dell'Hsp90 nei processi neurodegenerativi e nella modulazione di Tau. Si è visto che esiste una correlazione inversa tra aggregazione di Tau ed espressione di Hsp70 e Hsp90. Infatti, sezioni ippocampali da pazienti con Alzheimer hanno mostrato ammassi neurofibrillari di Tau accompagnati da bassi livelli di

chaperonine in particolare di Hsp70. Studi in vitro hanno evidenziato che usando l'antibiotico Geldamicina (GA) si ha un distacco dell'Hsp90 dal fattore di trascrizione HSF1 il quale può indurre l'espressione degli chaperoni molecolari Hsp70 e Hsp90. Tale induzione è accompagnata da una diminuzione degli aggregati di Tau e da un aumento della forma solubile. Gli studi di immunofluorescenza dimostrano una maggiore colocalizzazione di Tau e Hsp70 a livello dei microtubuli nelle cellule trattate con GA. Questi studi hanno suggerito un possibile meccanismo di incorporazione di Tau nei microtubuli mediata da Hsp90 che stabilizza Tau nel corretto folding e da Hsp70 che ne media l'incorporazione.²⁵

Si è osservato che gli aggregati di Tau contengono un grande numero di proteine compresi gli chaperoni molecolari che quindi perdono la loro funzione nel sistema di controllo delle proteine. L'aggregazione di Tau blocca anche il sistema di segnalazione neuronale mediato dall'endocitosi di vescicole rivestite da clatrina (CME). La mancata internalizzazione di queste vescicole è associata a una persistente attivazione di alcuni recettori come quelli del glutammato risultante in una elevata tossicità neuronale e morte. Il fallimento del sistema CME è uno dei primi eventi osservati, precede il fallimento del sistema di controllo proteico Hsp-mediato, ed è associato alla comparsa dello stato conformazionale di Tau del tipo oligomerico.²⁶

La valutazione di inibitori ed attivatori dell'attività dell'Hsp70 ha messo in luce che gli inibitori dell'attività ATPasica dell'enzima favoriscono la clearance di Tau riducendo Total Tau e alcune forme di Tau fosforilato. Al contrario, gli attivatori preservano i livelli di Tau nelle cellule. Gli inibitori stabilizzando il complesso Hsp70-ATP, impediscono l'idrolisi dell'ATP e riducono l'affinità per i substrati proteici non foldati o aggregati. Infatti, il trattamento di cellule con inibitori di Hsp70 comporta una riduzione dei complessi Hsp70/Tau osservati per co-immunoprecipitazione e un incremento di Tau ubiquitinato destinato al proteasoma (**Figura 1.1**). Inoltre, il trattamento concomitante con inibitori dell'Hsp90 induce un aumento di espressione di HSF1 e quindi dell'Hsp70. Per un principio stechiometrico si formano più complessi Hsp70-Tau ma in presenza di inibitori dell'attività ATPasica Tau legato è rilasciata al sistema di degradazione proteasomica. L'attività pro-folding dello chaperone è invece favorita dagli attivatori. Quindi, un possibile approccio terapeutico prevede l'induzione dei livelli dell'Hsp70 seguita dall'inibizione dell'attività ATPasica.²⁷ Anche alcuni destabilizzatori dei microtubuli, come il Nocodazolo, causano un aumento della colocalizzazione Hsp70/Tau e l'accoppiamento di tali composti con gli inibitori dell'Hsp70 provoca un incremento della degradazione di Tau.²⁸

Esempi di inibitori dell'Hsp70 sono i composti YM-08 e YM-01 analoghi dell'inibitore rodocianina MK077 (**Figura 1.2**). YM-08 essendo privo dell'anello piridinico carico passa

facilmente la barriera ematoencefalica ed è privo di tossicità renale rispetto al predecessore MK077. Il composto YM-08 lega con ottimi valori di IC_{50} lo chaperone Hsp70 e ne inibisce l'attività ATPasica. Inoltre, aumenta l'affinità di legame per proteine non foldate come la luciferasi e riduce i livelli di Tau e fosfo-Tau nelle cellule HeLaC3 e in modelli neuronali. YM08 non da riduzione dei livelli di Tau in tessuto cerebrale normale. Si osserva una riduzione di Tau e fosfo-Tau dopo destabilizzazione dei microtubuli in quanto Tau è disponibile al riconoscimento da parte delle Hsp70.²⁹ Un derivato di YM-01 ampiamente studiato è il composto JG-48 esso riduce i livelli di tau in cellule HeLaC3 transfettate con 4RONTau; riduce anche i livelli di Tau endogeno in cellule SHSY5Y e in campioni di tessuto cerebrale. JG-48 non compete con l'ATP per il legame con lo chaperone in quanto studi di docking hanno rivelato che lega l'Hsp70 in un sito diverso da quello di legame del nucleotide. Studi in vitro hanno mostrato un'attività inibitoria di JG-48 sull'attività ATPasica di Hsc70 oltre all'attività inibitoria sul refolding della luciferasi denaturata operata dal complesso chaperone /co-chaperone. È stata valutata anche l'interazione dell'Hsp70 con una proteina fluorescente in presenza di JG-48 e del fattore di rilascio del substrato BAG. Si è visto che il composto stabilizza l'interazione dello chaperone con la proteina cliente impedendone il rilascio stimolato da BAG. Inoltre, come dimostrato in saggi ELISA e di immunoprecipitazione, JG-48 stabilizza il complesso Hsp70/Tau. In particolare, in presenza di ADP si forma un complesso stabile chaperone/proteina e tale stabilizzazione può essere un segnale per la degradazione di Tau.³⁰

Tra i composti naturali dotati di attività neuroprotettiva vi è il flavonoide Mirecetina che possiede attività anti-Hsp70 e riduce i livelli di Tau.²⁴ Anche il Blu di Metilene appartenente alla classe delle fenotiazine ha mostrato attività inibitoria sull'Hsp70 e sulla formazione degli aggregati di Tau.³¹

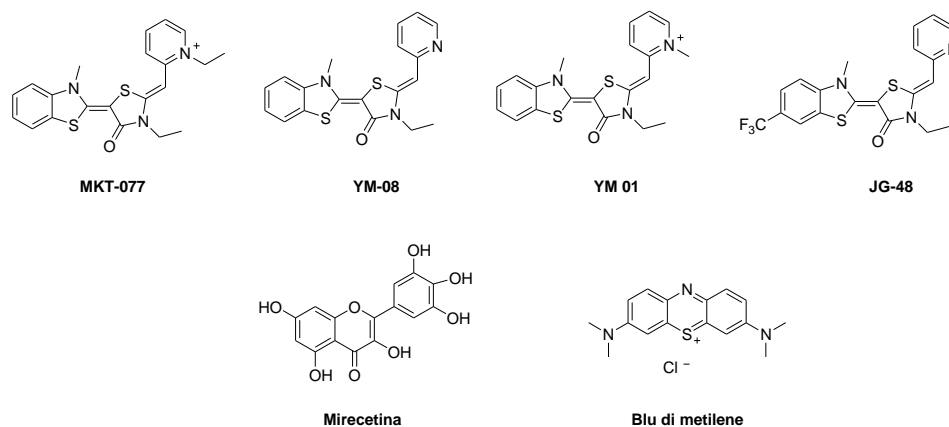


Figura. 1.2 Inibitori naturali e di sintesi dell'Hsp70

Anche gli inibitori dell'Hsp90 come EC102 favoriscono la degradazione proteasomica di fosfo-tau oltre ad aumentare i livelli del fattore di trascrizione HSF1 e di conseguenza dell'Hsp70 e dell'Hsp 40.³² Si è ipotizzato che l'Hsp90 possa avere un ruolo chiave nel processo evolutivo preservando le proteine mutanti e un simile ruolo potrebbe averlo nella patogenesi di Tau. Quindi gli inibitori dell'Hsp90 possono avere un'importante funzione nell'eliminazione delle specie proteotossiche.³³

3.1.2.2 Hsp60 e malattia di Alzheimer

Il ruolo dell'Hsp60 nella malattia di Alzheimer non è ancora ben chiaro. Alcuni autori hanno attribuito un ruolo neuroprotettivo alla chaperonina mentre altri attribuiscono un effetto deleterio agli elevati livelli dell'Hsp60 riscontrati nei pazienti con Alzheimer.³⁴ I disordini neurodegenerativi sono spesso associati con la secrezione di citochine pro-infiammatorie da parte della microglia. È stato dimostrato che la microglia over esprime l'Hsp60 che per legame con i Toll-like receptors (TLR4) stimola la secrezione dei fattori proinfiammatori. Quindi l'inibizione dell'espressione dell'Hsp60 rappresenta un'importante strategia per la prevenzione della neurodegenerazione.³⁵ L'Hsp60 è overespressa anche nei linfociti dei pazienti con Alzheimer e i suoi livelli sono usati come marker diagnostico in pazienti con disordini cognitivi che precedono la malattia di Alzheimer.³⁶ È stato dimostrato che topi transgenici che overesprimono A β -oligomeri mostrano livelli ridotti di Hsp60 e Hsp70.³⁷ Inoltre, è stato dimostrato che gli chaperoni Hsp60, Hsp70 e Hsp90 proteggono le colture neuronali dallo stress indotto dall'A β -amiloide intracellulare. In particolare, l'Hsp60 neutralizza l'effetto inibitorio di A β sul complesso IV della catena respiratoria mitocondriale.³⁸ Altre evidenze, invece, attribuiscono all'Hsp60 un ruolo deleterio, è stato visto che lo chaperone media la traslocazione dell'APP nel mitocondrio e sono stati riscontrati numerosi complessi di Hsp60 con APP/A β che causano disfunzione dell'organello.³⁹ L'Hsp 60 umana inibisce la fibrillogenesi del peptide A β 40 e A β 42 e la formazione di strutture β -sheet anche in assenza del cochaperone e di ATP. Si è ipotizzato un meccanismo d'azione secondario in cui lo chaperone previene l'aggregazione sequestrando le proteine non foldate o aggregate.^{40,41} Nella ricerca di un vaccino che possa stimolare la produzione di anticorpi contro il peptide A β è stato sviluppato un nuovo vaccino coniugato costituito da A β -amiloide- Hsp60. Quest'ultimo ha dato nei topi trattati una notevole riduzione di amiloide nel cervello e del conseguente processo infiammatorio.⁴²

Molti degli inibitori dell'Hsp60 ad oggi identificati possono essere considerati validi agenti terapeutici per il trattamento di alcune forme tumorali ma esistono pochissimi studi sulla ricerca di modulatori applicabili al campo della neurodegenerazione e in particolare

nell'Alzheimer. L'Hsp60 eucariotica rispetto all'omologo dei procarioti GroEL possiede dei residui di cisteina nucleofili che rappresentano dei siti di interazione per potenziali farmaci. Infatti gli inibitori dell'Hsp60, oltre che per competizione sul sito di legame dell'ATP, agiscono proprio su questi residui di cisteina.⁴³ La Mizoribina e il composto EC3016 (**Figura 1.3**) bloccano il legame dell'ATP all'Hsp60 e la sua idrolisi.⁴⁴ Il metabolita fungino Avrainvillamide, il metabolita batterico Epolactaene e il suo derivato ter-butil-estere (ETB) agiscono legando covalentemente i residui di cisteina dello chaperone.⁴⁵⁻⁴⁷ Altri modulatori dell'Hsp60 che agiscono sull'espressione o sull'attività con meccanismo non ancora chiaro sono il complesso del rame **1**,⁴⁸ la Suvanina⁴⁹ e i derivati fenossiacetanilidici **2**,³ riportati in **Figura 1.3**. Anche la curcumina esercita un effetto neuroprotettivo agendo sui livelli dell'Hsp60. Il trattamento con curcumina di cellule della microglia stimulate con LPS riduce i livelli del fattore di trascrizione HSF1 e di conseguenza i livelli dell'Hsp60. Si ha quindi una minore attivazione del recettore TLR4 e una ridotta produzione di fattori proinfiammatori.⁵⁰ La curcumina aumenta anche l'attività di folding del complesso Hsp60 in presenza del cochaperone Hsp10 e di ATP.⁵¹ Anche l'alcaloide Oximatrina, similmente alla curcumina, riduce l'espressione dell'Hsp60 ed inibisce il rilascio di citochine proinfiammatorie da parte della microglia.⁵²

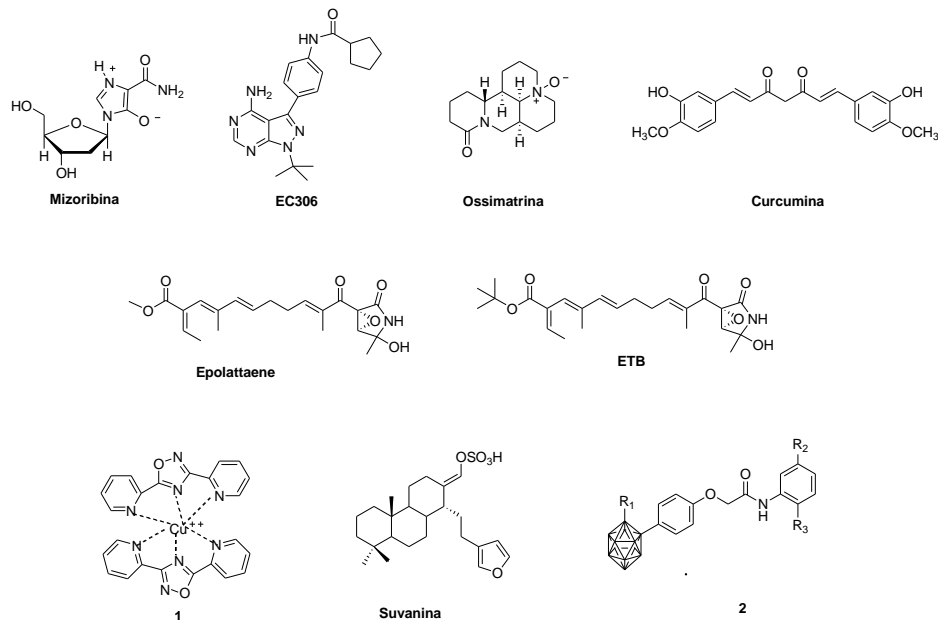
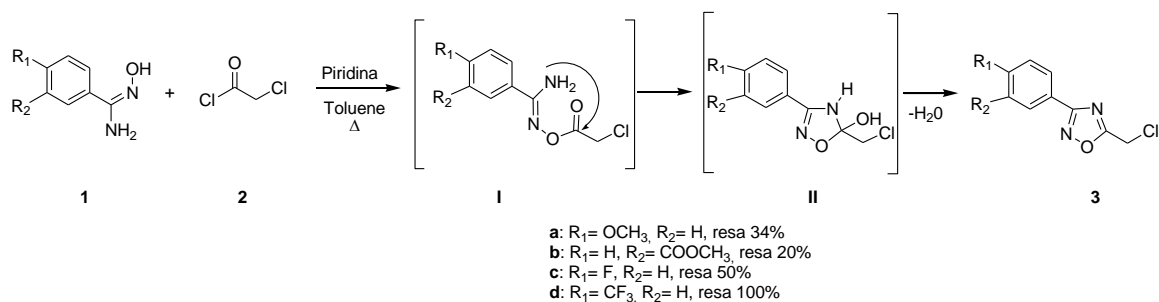


Figura. 1.3 Inibitori naturali e di sintesi dell'Hsp60

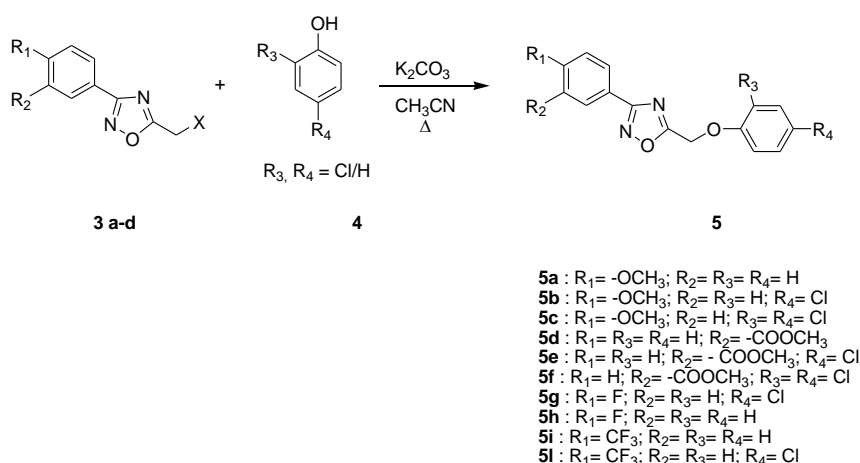
3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.2.1 Sintesi dei derivati 1,2,4-ossadiazolici di tipo fenossiacetanilidico

Per la costruzione dell'anello 1,2,4-ossadiazolico si è sfruttata la via di sintesi classica che prevede la reazione tra un'ammidossima variamente sostituita e un derivato di un acido carbossilico. In particolare, la sintesi degli ossadiazoli **5** è avvenuta in due step. In un primo step l'ammidossima **1** (Schema 2.1) ha reagito con il derivato di-alogenato dell'acido acetico **2** tramite una reazione nucleofila acilica. La successiva ciclizzazione intramolecolare e l'eliminazione di una molecola d'acqua hanno generato i derivati **3a-d**. Nel secondo step, quest'ultimi hanno dato una reazione di sostituzione nucleofila S_N2 con fenolo, *p*-clorofenolo o 3,4-diclorofenolo **4** per dare gli 1,2,4-ossadiazoli desiderati (Schema 2.2).

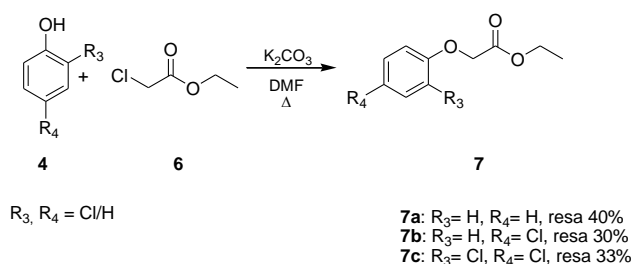


Schema. 2.1

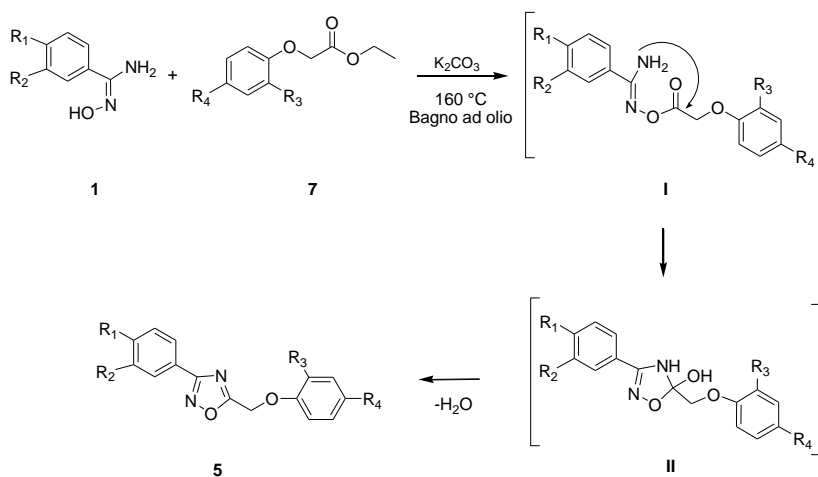


Schema 2.2

Gli inconvenienti legati alla metodica di sintesi riportata sono le basse rese ma soprattutto la presenza di residui fenolici che rendono complicata la purificazione. Al fine di ottimizzare le rese ed ottenere prodotti più puri, gli schemi precedentemente descritti sono stati sostituiti con un nuovo schema di reazione. In un primo passaggio per reazione di sostituzione nucleofila tra i fenoli **4** e l'etilcloroacetato **6** sono stati sintetizzati degli esteri **7** (Schema 2.3). Gli esteri **7**, tramite una reazione di condensazione *solvent free*, sono stati fatti reagire con le amidossime **1** per dare i derivati **5 a-p** (Schema 2.4).



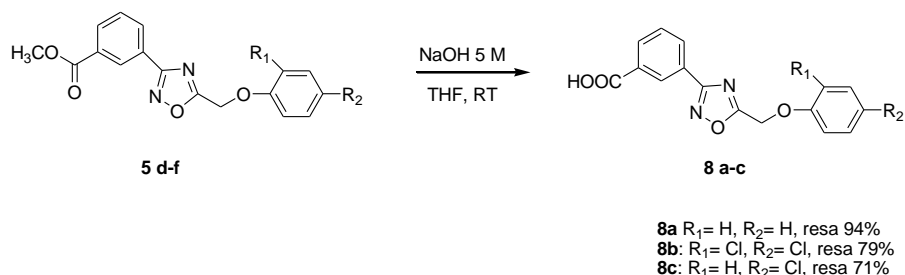
Schema. 2.3



- 5a:** $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, resa 77%
5b: $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = R_3 = \text{H}; R_4 = \text{Cl}$, resa 71%
5c: $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{H}; R_3 = R_4 = \text{Cl}$, resa 54%
5d: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}; R_2 = -\text{COOCH}_3$, resa 85%
5e: $R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = -\text{COOCH}_3; R_4 = \text{Cl}$, resa 90%
5f: $R_1 = \text{H}; R_2 = -\text{COOCH}_3; R_3 = R_4 = \text{Cl}$, resa 95%
5g: $R_1 = \text{F}; R_2 = R_3 = \text{H}; R_4 = \text{Cl}$, resa 60%
5h: $R_1 = \text{F}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, resa 64%
5i: $R_1 = \text{CF}_3; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, resa 67%
5l: $R_1 = \text{CF}_3; R_3 = R_2 = \text{H}; R_4 = \text{Cl}$, resa 50%
5m: $R_1 = \text{Cl}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, resa 80%
5n: $R_1 = \text{Cl}; R_2 = R_3 = \text{H}; R_4 = \text{Cl}$, resa 86%
5o: $R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, resa 75%
5p: $R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2; R_2 = R_3 = \text{H}; R_4 = \text{Cl}$, resa 70%

Schema 2.4

I composti **8 a-c** sono stati ottenuti dai rispettivi esteri metilici **5 d-f** per idrolisi in ambiente basico (NaOH) usando THF come solvente di reazione (**Schema 2.5**).



Schema. 2.5

3.2.2 Valutazione biologica

Per alcuni dei derivati 1,2,4-ossadiazolici sintetizzati è stata effettuata una valutazione biologica preliminare allo scopo di identificare un loro possibile effetto sull'attività e sull'espressione degli chaperoni molecolari Hsp60 e Hsp70. Considerato il ruolo degli chaperoni nei disordini neurodegenerativi e nella modulazione della proteina Tau si è scelto di utilizzare come modello cellulare le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y e di indagare gli effetti dei composti sull'espressione di Tau oltre che sull'interazione chaperoni/Tau.

3.2.2.1 Valutazione della vitalità cellulare

La valutazione della citotossicità è stata effettuata su cellule SH-SY5Y trattate per 24 ore con concentrazioni seriali dei composti di interesse (da 500 μM a 0.97 μM). La vitalità cellulare è stata valutata tramite due differenti saggi quello della Lattato Deidrogenasi (LDH) e il saggio Presto Blue. Il saggio PrestoBlue si basa sulla riduzione della Resazurina un composto non fluorescente, permeabile alle membrane cellulari. Entrando nelle cellule vive la Resazurina viene ridotta a Resorufina un composto rosso altamente fluorescente. La fluorescenza misurata è, quindi, proporzionale al numero di cellule vive. Invece, il saggio LDH misura l'assorbanza a 490 nm dovuta alla quantità di sale di formazano (rosso) formatosi dal sale di tetrazolio (giallo). Tale reazione è catalizzata dall'enzima LDH rilasciato nel mezzo di coltura solo dalle cellule danneggiate. In questo caso l'assorbanza misurata è proporzionale al numero di cellule danneggiate. In entrambi i saggi i composti hanno dato risultati sovrapponibili mostrando, nella maggior parte dei casi, valori di IC₅₀ superiori a 125 μM . In **Figura 2.1** sono riportati i risultati del saggio Presto Blue mentre la **Figura 2.2** riporta i risultati del saggio LDH.

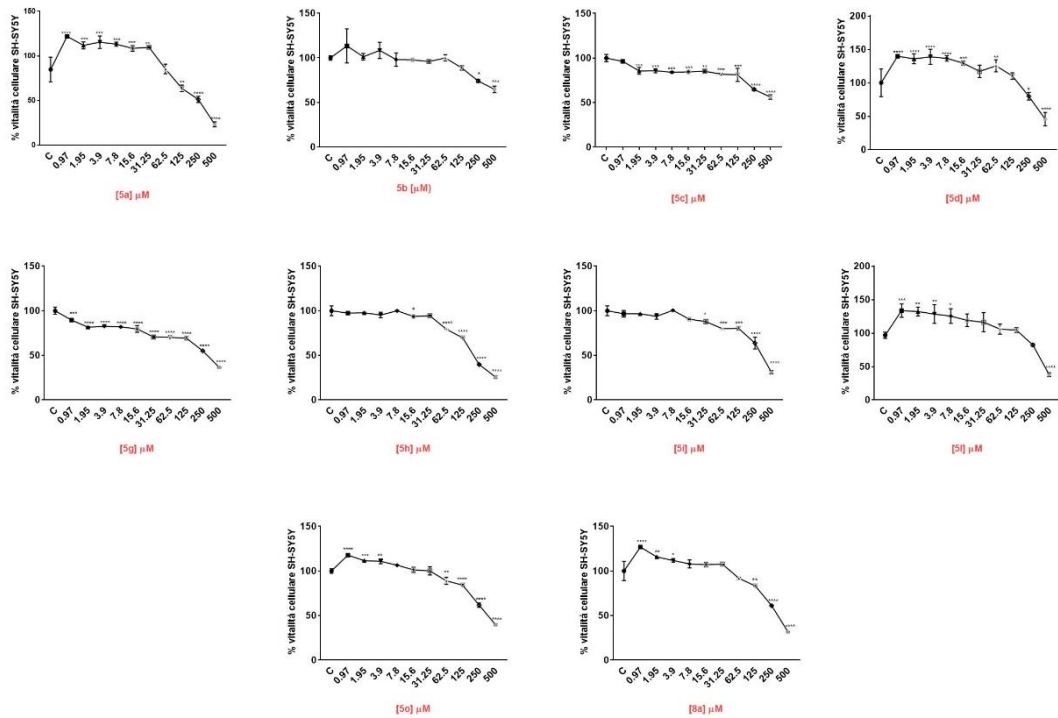


Figura 2.1. Risultati del saggio PrestoBlue. Vitalità cellulare delle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y esposte per 24 ore concentrazioni crescenti dei composti. I dati sono comparati al controllo attraverso ANOVA test seguito dal test di comparazione multipla di Dunnet: * < 0.05 , ** < 0.01 . *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

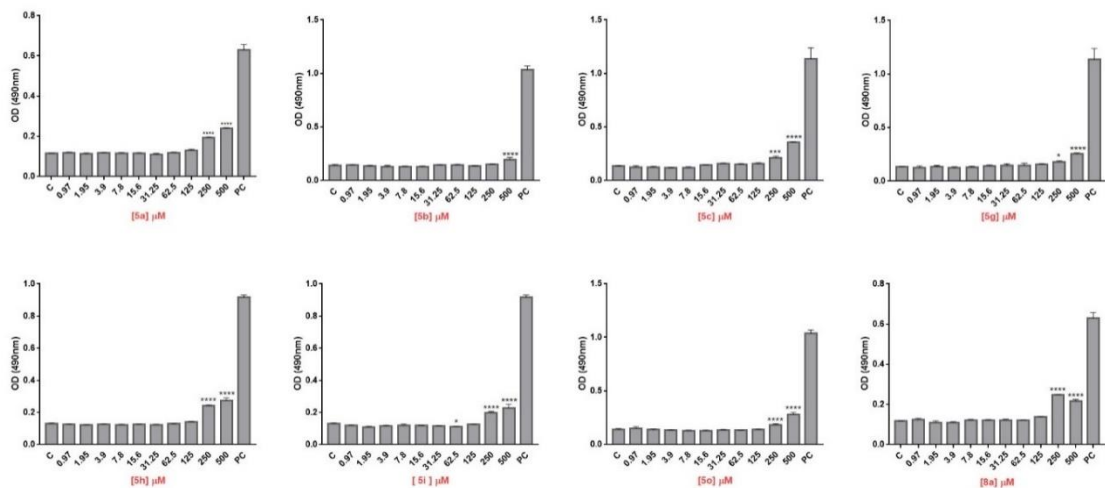


Figura 2.2. Risultati del saggio LDH. Vitalità cellulare delle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y esposte per 24 ore concentrazioni crescenti dei composti. I dati sono comparati al controllo (C) attraverso ANOVA test seguito dal test di comparazione multipla di Dunnet: * < 0.05 , *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. In grafico è riportato anche il controllo positivo (PC) del saggio corrispondente alle cellule lisate con il reattivo di lisi fornito dal kit.

3.2.2.2 Valutazione dell'espressione intracellulare di Hsp70, Hsp60 e Tau

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 24 ore con i composti di interesse alle concentrazioni di 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. I lisati cellulari sono stati analizzati tramite Western Blotting per valutare l'effetto del trattamento sull'espressione delle chaperonine Hsp60 e Hsp70 e per visualizzare eventuali variazioni nei livelli di Tau endogeno. Per la rilevazione di Tau è stato usato l'anticorpo Rabbit-Policlonal anti-Total Tau in grado di riconoscere la Tau umana nei residui di serina fosforilati e non fosforilati dell'epitopo 576-583. Come mostrato dalla quantificazione riportata in **Figura 2.3b** i composti testati hanno dato riduzioni significative di Total Tau anche se non è stata evidenziata una proporzionalità diretta tra concentrazione del composto e riduzione della proteina. Infatti, alla concentrazione di 20 μ M si è osservato un riamento dei livelli di Tau nonostante la notevole riduzione alla concentrazione più bassa.

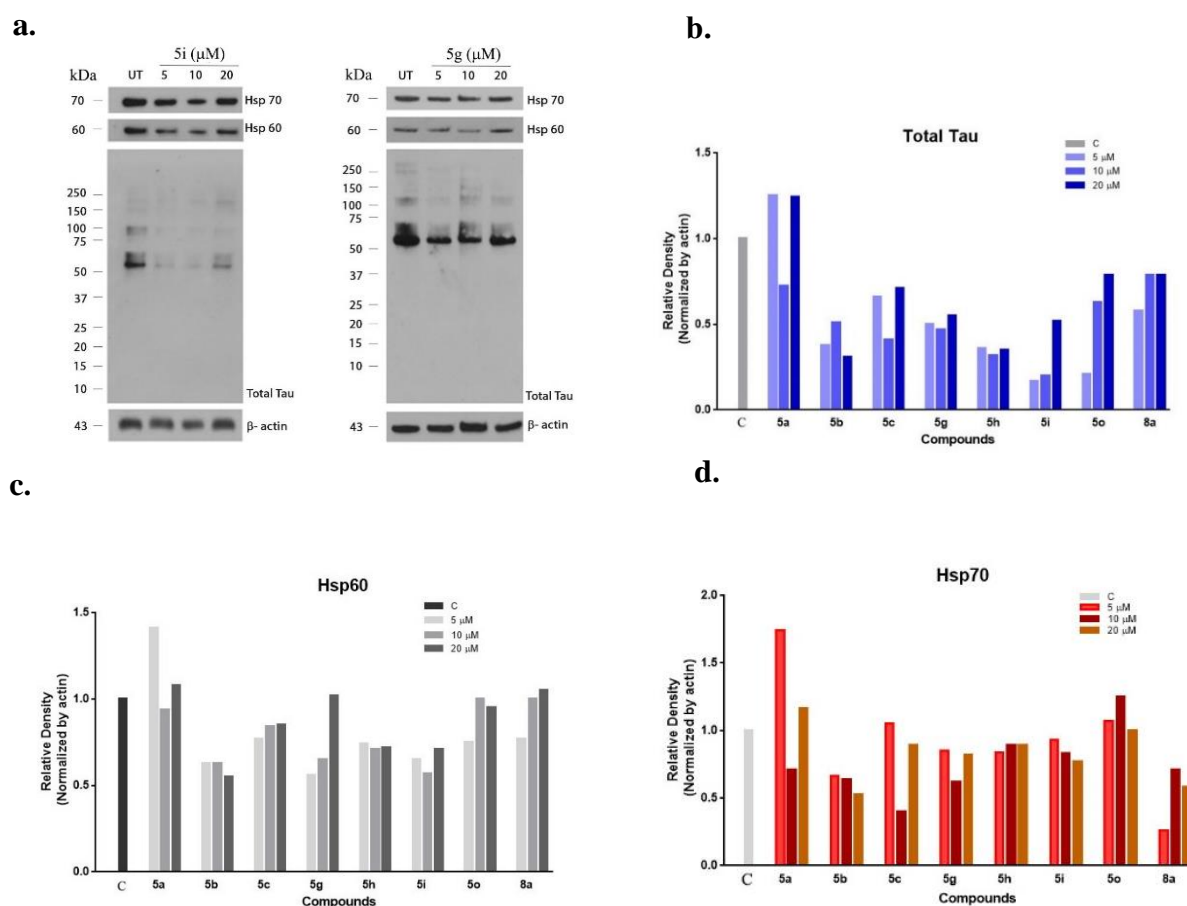


Figura 2.3. a. Western Blot rappresentativo di cellule SH-SY5Y trattate con i composti **5i** e **5g** alle concentrazioni indicate per 24h e quantificazione dei livelli di Total Tau (**b**), Hsp60 (**c**), Hsp70 (**d**) dopo trattamento con tutti i composti testati

Si è scelto di eseguire la quantificazione di Hsp60, Hsp70 e Total Tau dopo trattamento con concentrazioni più basse dei composti (1 μ M, 2 μ M e 3 μ M) (**Figura 2.4**) e, considerati i risultati ottenuti dai primi Western Blotting, si è deciso di continuare l'analisi con soli due composti: i derivati **5i** e **5g**. Il derivato **5i** è quello che ha dato la maggiore riduzione di Tau alla concentrazione più bassa di 5 μ M mentre il derivato **5g** ha dato, alla stessa concentrazione, una marcata riduzione dei livelli di Hsp60. Inoltre, considerata la presenza in entrambi i derivati di atomi di fluoro si potrebbe pensare a un loro possibile uso come strumenti diagnostici per la rilevazione di aggregati di Tau sfruttando la spettroscopia NMR del fluoro (^{19}F -NMR). Il Western Blotting effettuato a concentrazioni più basse ha messo in evidenza una riduzione significativa di Total Tau nelle cellule trattate con il composto **5i** alla concentrazione di 3 μ M mentre non sono state riscontrate variazioni significative nei livelli di Hsp70 e Hsp60 (**Figura 2.4**).

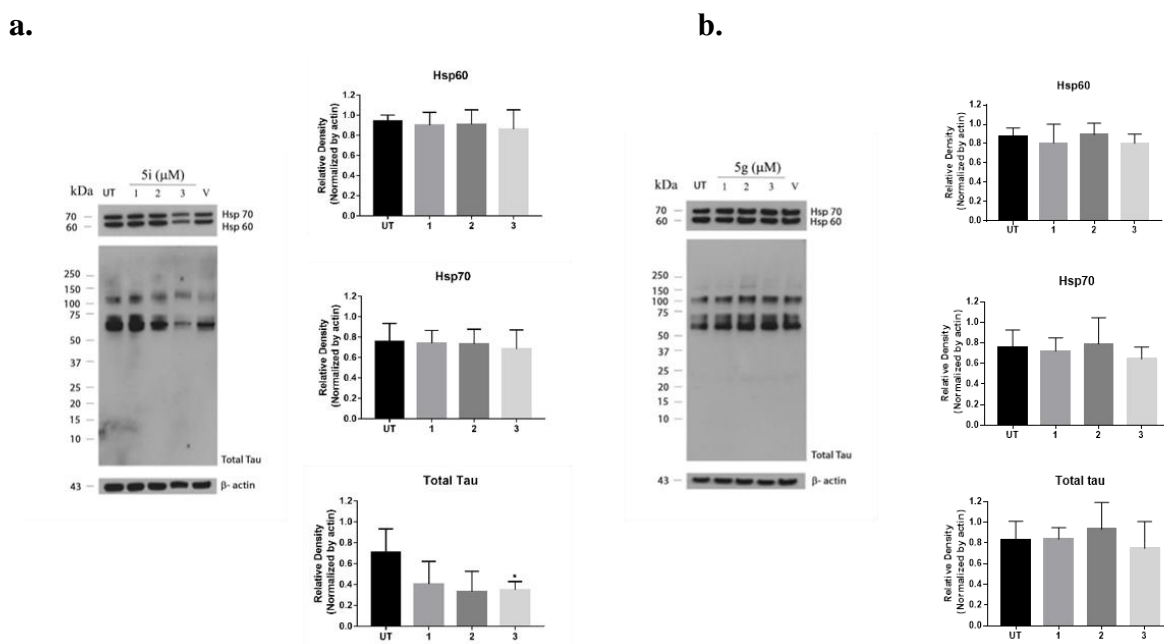


Figura 2.4. Western Blot rappresentativi delle cellule SH-SY5Y trattate per 24 ore con le concentrazioni indicate del composto **5i** (**a**) o del derivato **5g** (**b**). La quantificazione di Hsp 60, Hsp70 e Total tau è stata fatta per comparazione con le cellule non trattate (UT). I risultati sono stati confrontati attraverso analisi della varianza (ANOVA test) seguito dal test della comparazione multipla di Dunnett. La differenza dei livelli di Total Tau tra le cellule trattate con **5i** (3 μ M) e le cellule non trattate è significativa: * $p < 0,05$ ($n = 4$). Le barre e le barre di errore rappresentano rispettivamente il valore medio e la deviazione standard. Per la quantificazione di Tau sono state considerate tutte le bande.

3.2.2.3 Valutazione della colocalizzazione Hsp60-Tau e Hsp70-Tau

Servendosi del saggio di immunofluorescenza e del saggio di legatura di prossimità (descritto nel prossimo paragrafo) è stata valutata l'influenza dei composti sulla colocalizzazione e sulla interazione di Tau con gli chaperoni molecolari Hsp 60 e Hsp70. Tale interazione è di fondamentale importanza per il turnover, il refolding e la degradazione della proteina aberrante Tau.

L'analisi dell'immunofluorescenza è stata condotta sulle cellule SH-SY5Y trattate per 24 ore con i composti **5i** e **5g** (3 μ M) e successivamente incubate con gli anticorpi primari per l'Hsp60, l'Hsp70 e per Tau. Per la rivelazione di Tau è stato utilizzato un anticorpo primario in grado di riconoscere la proteina Tau umana nell'epitopo costituito dagli amminoacidi 15-25. Le immagini di immunofluorescenza mostrano una riduzione dei livelli degli chaperoni Hsp60 e Hsp70 dopo trattamento con il veicolo. Il trattamento con i composti ripristina i livelli di Hsp60 e Hsp70 inducendone un aumento (**Figura 2.5 a-b**). La quantificazione della fluorescenza associata all'anticorpo Tau 13 indica una riduzione significativa dei suoi livelli solo dopo trattamento con il derivato **5i** confermando i risultati ottenuti con il Western Blot (**Figura 2.5 c**).

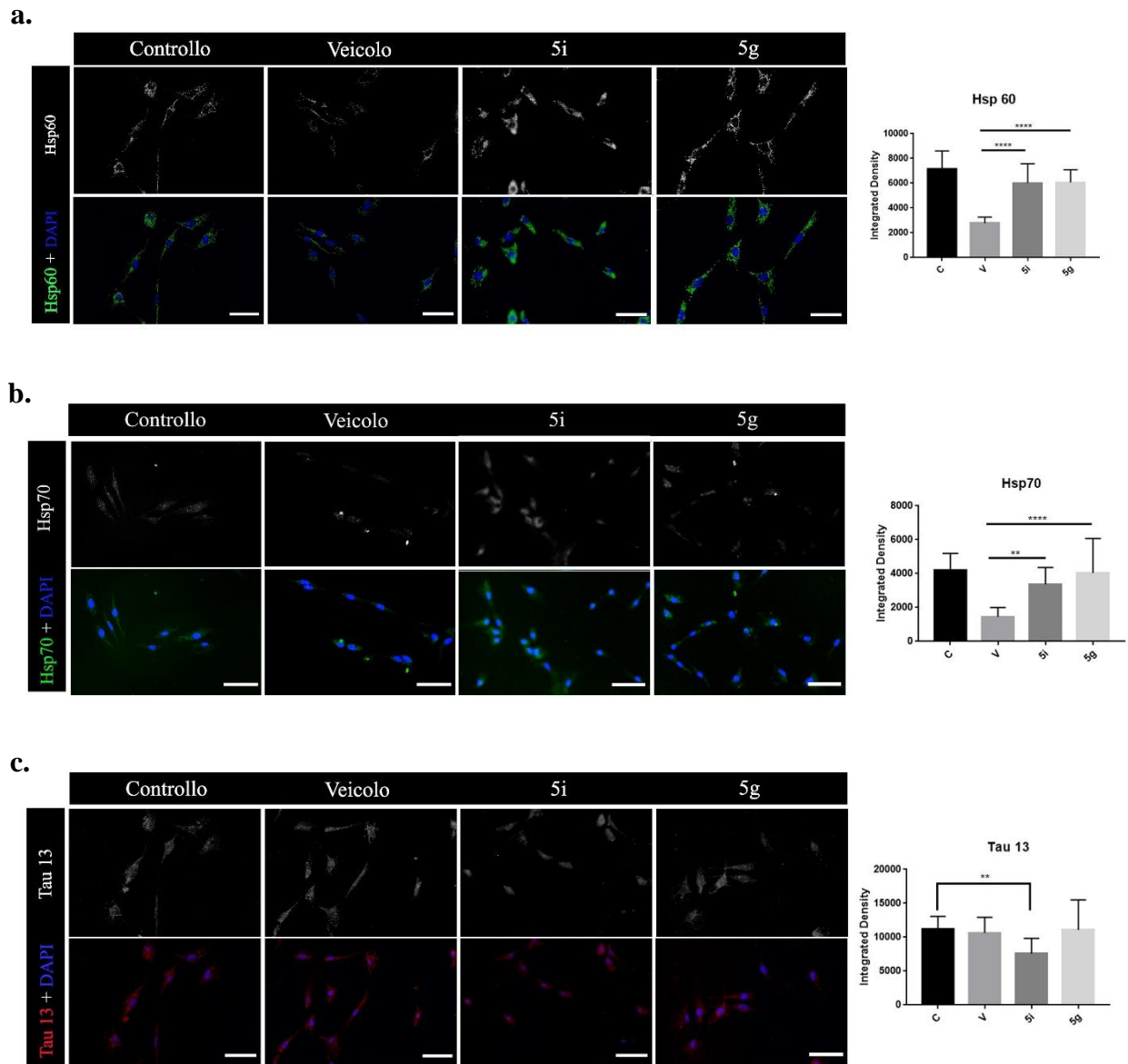
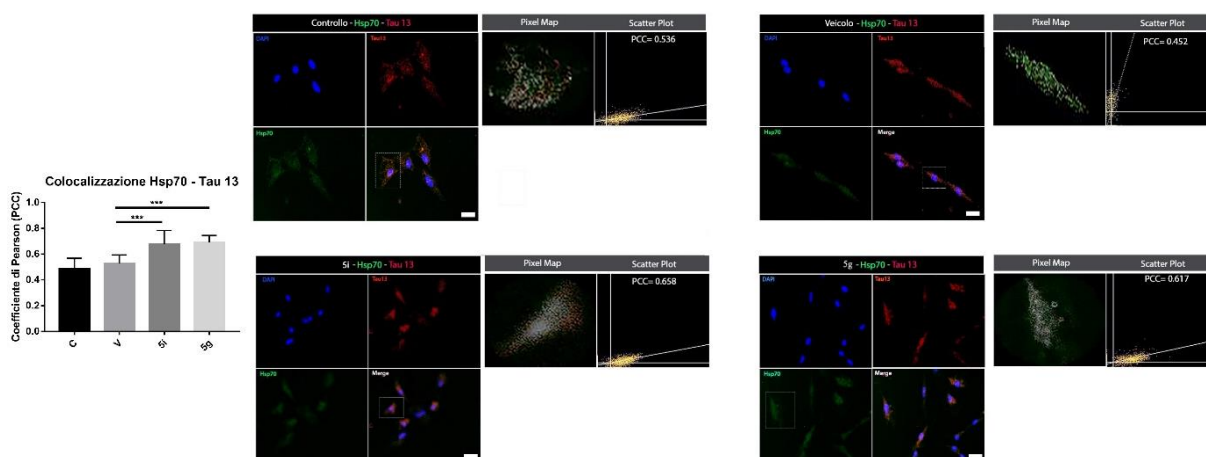


Figura 2.5. Immagini rappresentative di cellule SH-SY5Y trattate per 24 ore con i composti **5i** e **5g** (3 μ M) comparate alle cellule non trattate (C) e alle cellule trattate con il veicolo (V) **a.** cellule incubate con Rabbit Policlonal Anti-Hsp60 (1:200), DAPI (nuclei) e l'anticorpo secondario Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (Green, 1:1000) **b.** cellule incubate con Mouse Monoclonal Anti-Hsp70 (1:100), DAPI (nuclei) e l' anticorpo secondario Goat Anti-Mouse Alexa Fluor 488 (Green, 1:1000) **c.** cellule incubate con Mouse Monoclonal Anti-Tau 13 (1:500), DAPI (nuclei) e l'anticorpo secondario Goat Anti-Mouse Alexa Fluor 568 (Red, 1:1000). I dati sono stati confrontati usando l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett: **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$. I dati sono rappresentati come valore medio \pm SD. Le immagini sono state acquisite con obiettivo Nikon 20 X (zoom= 2X). Scale bar = 50 μ M

Le immagini ottenute dalla microscopia a fluorescenza sono state analizzate allo scopo di identificare una co-distribuzione delle proteine in esame e i risultati degli studi di colocalizzazione sono rappresentati graficamente tramite gli scatter plot in **Figura 2.6 a-b**. Essi riportano, per ogni pixel dell'immagine, l'intensità di fluorescenza di un canale (rosso) rispetto all'altro (verde). In condizioni di co-distribuzione delle proteine i punti dello scatter plot si trovano su una linea la cui pendenza riflette il rapporto di fluorescenza tra i due canali. Al contrario, l'assenza di colocalizzazione comporta una distribuzione dei punti in gruppi separati. La quantificazione della colocalizzazione può essere effettuata tramite il calcolo del coefficiente statistico di Pearson (PCC). I valori di PCC vanno da 1, per due immagini le cui intensità di fluorescenza sono perfettamente e linearmente correlate, a -1 per immagini le cui intensità di fluorescenza sono inversamente correlate l'una all'altra. Valori di PCC vicini allo zero indicano che le proteine in esame si distribuiscono in maniera non correlata l'una con l'altra.⁵³ L'analisi della colocalizzazione delle chaperonine HSp60 e Hsp70 con Tau 13 (Tau totale) è stata condotta misurando il coefficiente di Pearson su dieci singole cellule. Nella **Figure 2.6 a-b** sono riportate anche le Pixel Map in cui i punti di colocalizzazione dei due canali (rosso e verde) sono indicati in grigio. I composti **5i** e **5g** inducono un aumento del grado di colocalizzazione di entrambi gli chaperoni con Tau. Particolarmente significativo è l'incremento di colocalizzazione Hsp60/Tau 13 indotto dal composto **5i** comparato al veicolo. È interessante osservare una colocalizzazione prettamente citoplasmatica dell'Hsp60 con Tau 13 contrariamente all'Hsp70 che colocalizza con Tau diffusamente in tutta la cellula.

a.



b.

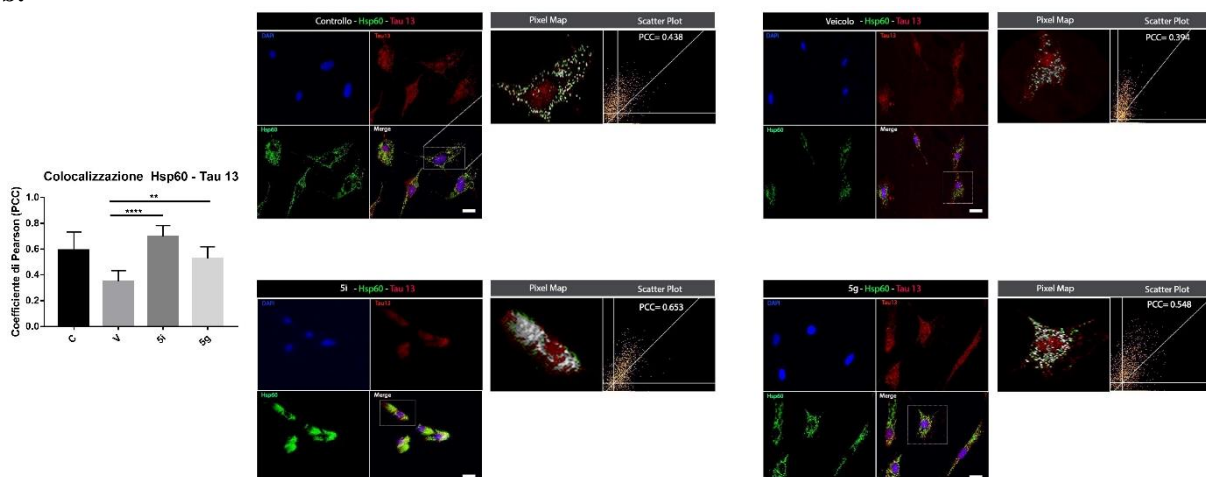


Figura 2.6. Valutazione della colocalizzazione di Tau 13 con l'Hsp70 (a) e con l'Hsp60 (b) in cellule SH-SY5Y non trattate, trattate con il veicolo e con i composti **5i** e **5g** (3 μ M). Per ogni condizione in esame è riportato l'ingrandimento di una cellula abbinato alla mappa di colocalizzazione dei pixel, allo scatter plot e al relativo Coefficiente di Colocalizzazione di Pearson. I dati ottenuti su n=10 cellule sono stati confrontati usando l'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett: ****p < 0.0001, **p < 0.01. I dati sono rappresentati come valore medio \pm SD. Le immagini sono state acquisite con obiettivo Nikon 20 X. Scale bar = 20 μ M

3.2.2.4 Saggio di legatura di prossimità (PLA)

Il saggio di legatura di prossimità (Proximity Ligation Assay- PLA) permette di identificare *in situ*, con alta sensibilità e specificità, interazioni tra proteine di interesse che si trovano a una distanza inferiore a 40 nm. Il saggio prevede il trattamento del campione con anticorpi primari di diversa specie diretti verso le proteine target. All'incubazione con gli anticorpi primari segue quella con gli anticorpi secondari, noti come PLA probes, i quali sono coniugati a sequenze oligonucleotidiche. Vengono usati una coppia di PLA probes, identificati come MINUS e PLUS, che riconoscono le regioni costanti degli anticorpi primari legati ai target. Quando le proteine in esame si trovano molto vicine tra loro le sequenze oligonucleotidiche dei due probes subiscono un processo di ibridizzazione; una ligasi forma un frammento di DNA circolare che funge da template per il processo di amplificazione operato dalla polimerasi. Nello step finale, il legame delle sequenze amplificate con oligonucleotidi marcati consente la visualizzazione dell'interazione proteina-proteina come spot rossi, ben definiti, osservabili al microscopio a fluorescenza. Poiché il saggio si basa su un processo di amplificazione del DNA poche molecole interagenti possono generare dei segnali molto visibili e ciò rende la PLA una tecnica altamente sensibile (**Figura 2.7**).⁵⁴

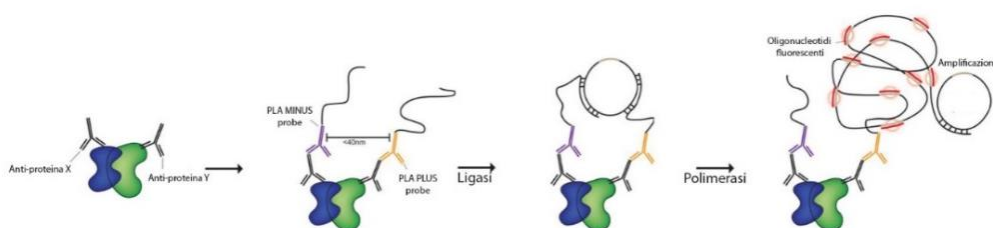


Figura 2.7. Rappresentazione schematica del saggio PLA

Le cellule SH-SY5Y non trattate e trattate con i composti **5i** e **5g** sono state sottoposte al saggio PLA allo scopo di studiare l'interazione tra Tau e gli chaperoni Hsp60 e Hsp70. Per la valutazione di Tau è stato utilizzato l' anticorpo Mouse monoclonal anti-Tau 5 che riconosce l'epitopo della Tau umana compreso tra gli amminoacidi 210-230 (**Figura 2.8 a-b**). Inoltre, è stata effettuata la PLA dell'Hsp60 e dell'Hsp 70 in presenza dell'anticorpo Mouse monoclonal anti-TTCM2 (**Figura 2.8 c-d**). Quest'ultimo è un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere conformazioni tossiche della proteina Tau. Il composto **5i** induce un notevole aumento degli spot fluorescenti associabili all'interazione Hsp60/Tau. Mentre il composto **5g** aumenta le interazioni tra l'Hsp70 e Tau. Il trattamento con entrambi i composti induce un aumento delle interazioni tra l'Hsp70 e TTCM2

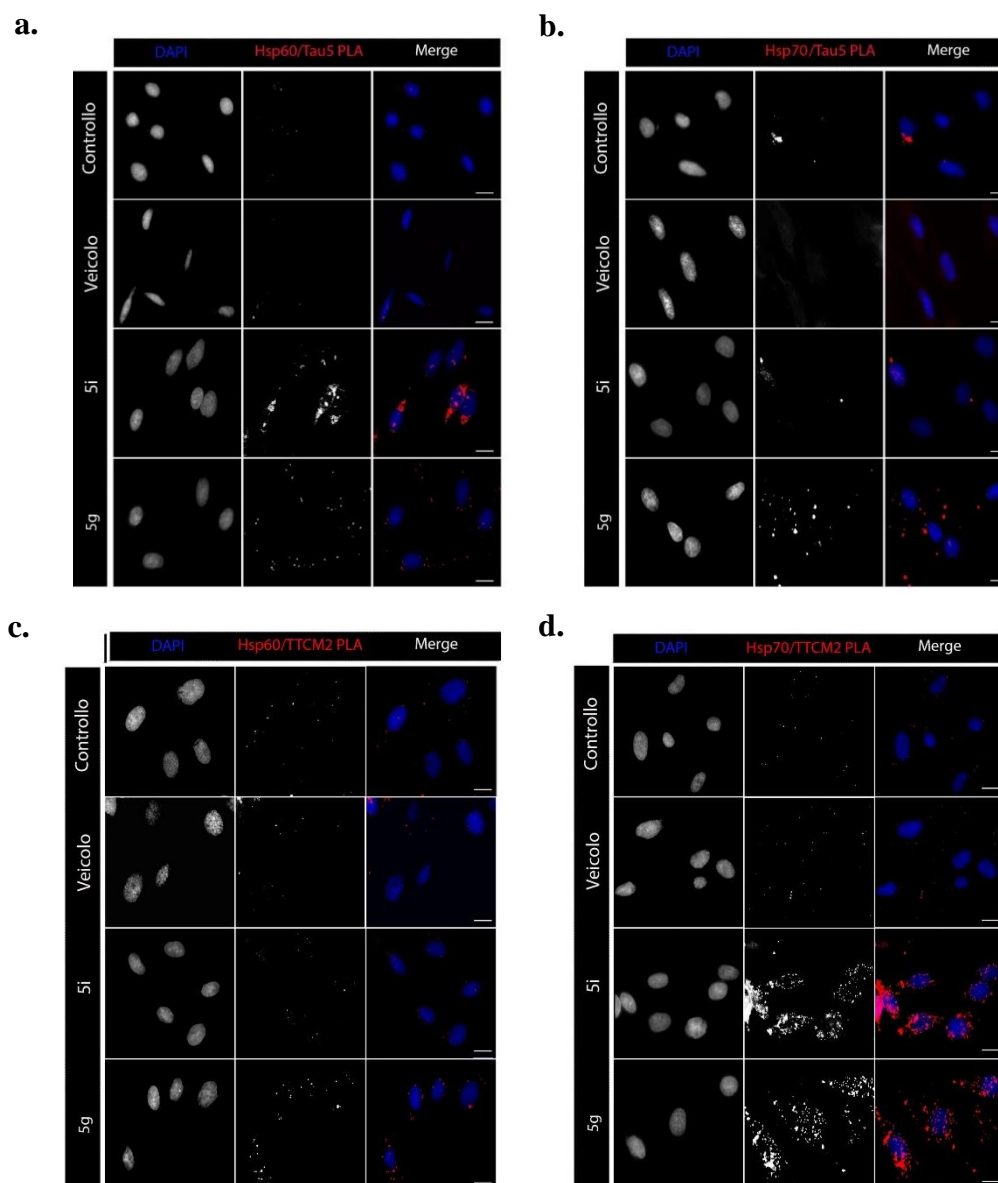


Figura 2.8. Immagini rappresentative del saggio PLA effettuato su SH-SY5Y non trattate, trattate con il veicolo e con i composti **5i** e **5g** (3 μM) **a.** valutazione dell'interazione Hsp60/Tau 5 usando gli anticorpi primari Rabbit Policlonal anti-Hsp60 (1:200) e Mouse Monoclonal anti-Tau 5 (1:500) **b.** valutazione dell'interazione Hsp70/ Tau 5 effettuata con gli anticorpi primari Rabbit Policlonal anti-Hsp70 (1:200) e Mouse Monoclonal anti-Tau 5 (1:500) **c.** valutazione dell'interazione Hsp60/TTCM2 effettuata con gli anticorpi primari Rabbit Policlonal anti-Hsp60 (1:200) e Mouse Monoclonal anti-TTCM2 (1:200) **d.** valutazione dell'interazione Hsp70/TTCM2 effettuata con gli anticorpi primari Rabbit Policlonal anti-Hsp70 (1:200) e Mouse Monoclonal anti-TTCM2 (1:200). I nuclei sono stati marcati con DAPI (blue). Immagini acquisite con obiettivo Nikon 100 X immerso in Nujol. Scale bar = 20 μM

3.2.2.5 Saggio di refolding della luciferasi

L'effetto del composto **5i** sull'attività di folding dell'Hsp60 è stato analizzato *in vitro* attraverso il saggio di refolding della luciferasi. Il saggio si basa sulla conversione, operata dall'enzima luciferasi, della luciferina in ossiluciferina luminescente. Un iniziale riscaldamento a 45 °C comporta la denaturazione del Glow Fold Substrate (Luciferasi) e come conseguenza si osserva una riduzione dei valori di luminescenza rispetto al Glow Fold non denaturato (Tempo 0 in **Figura 2.9**). Successivamente alla denaturazione, tramite riscaldamento a 30 °C, si favorisce la reazione di refolding della luciferasi operata dal complesso Hsp60 / Hsp10. I valori di luminescenza relativi riportati in **Figura 2.9** sono quindi proporzionali all'attività di refolding del complesso Hsp60 / Hsp10. L'attività di refolding dell'Hsp60 in presenza del composto **5i** (20 µM), dell'Hsp10 e dell'ATP è stata confrontata con il controllo positivo (Hsp60 + Hsp10 + ATP) e con quello negativo (Hsp60 + Hsp10). Per il controllo positivo le misure effettuate a 30 e 60 min dall'inizio del refolding mostrano un aumento della luminescenza. In presenza del composto **5i** sono stati osservati valori di luminescenza inferiori ad indicare un'attività inibitoria del composto sul processo di refolding.

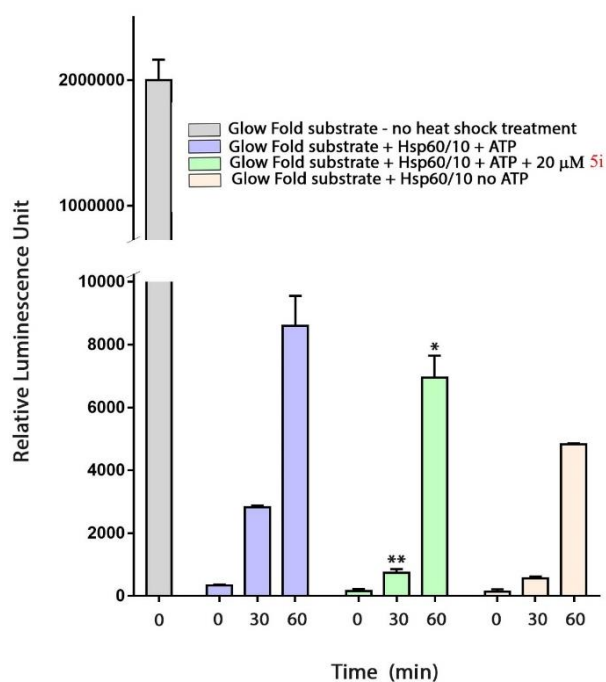


Figura 2.9. Il composto **5i** (20 µM) inibisce l'attività di refolding del complesso Hsp60/Hsp10 dopo 30 e 60 minuti dall'inizio della reazione di refolding. L'analisi dei dati è stata effettuata usando il test della varianza ANOVA seguito dalla comparazione multipla di Dunnet (Glow Fold Substrate + Hsp60/Hsp10+ ATP+ 20 µM di **5i** vs Glow Fold Substrate + Hsp60/Hsp10 + ATP), *p= 0.0327, **p= 0.007

3.3 CONCLUSIONI

Il saggio di colocalizzazione e la PLA effettuati in presenza dei composti hanno fornito preziose informazioni sulla rispettiva localizzazione degli chaperoni e di Tau evidenziando un incremento della colocalizzazione e delle interazioni rispetto alle cellule SH-SY5Y non trattate. Dal saggio di valutazione dell'attività di refolding dell'Hsp60 si evince un effetto inibitorio del composto **5i** sull'attività dell'Hsp60, suggerendo l'esistenza di un'interazione del composto con Hsp60 in grado di bloccarne l'attività. La riduzione di Total Tau endogeno, osservata al Western Blot, potrebbe essere ricollegata all'attività inibitrice sullo chaperone. Si può ipotizzare che l'incremento di interazioni chaperone / Tau e l'inibizione dell'attività dello chaperone concorrono a stabilizzare il complesso Hsp60 / Tau in una forma non attiva per il refolding ma che piuttosto favorisce l'eliminazione di Tau mediata ad esempio dal sistema proteasoma-ubiquitina.

In futuro, nuovi sistemi cellulari, che over-esprimono Tau o che sono trattati con oligomeri tossici di Tau, potranno essere presi in considerazione come modelli di patologia su cui valutare l'effetto protettivo dei composti. La valutazione *in vitro*, mediante il saggio della Tioflavina, potrebbe consentire di studiare l'effetto degli chaperoni Hsp70 e Hsp60 e, contestualmente, dei composti sull'aggregazione di Tau.

3.4 MATERIALI E METODI

3.4.1 Chimica

Tutti i solventi e reagenti sono stati acquistati e usati senza ulteriore purificazione. Le reazioni sono state monitorate tramite cromatografia su strato sottile (Merk KGaA, Darmstadt, Germany). I composti sintetizzati sono stati purificati attraverso cromatografia flash usando silice (Merck, 0.040-0.063 mm) e un mix di etile acetato ed etere di petrolio in varie proporzioni come eluenti. Il punto di fusione è stato determinato con un apparato Reichart-Thermovar Hostage su piastra Kofler. ^1H NMR, ^{13}C NMR e HPLC/MS sono stati utilizzati per verificare la struttura e la purezza dei composti sintetizzati. L' ^1H NMR e il ^{13}C NMR sono stati registrati con spettrometro Bruker 300 Avance alla frequenza di 300 MHz per l' ^1H NMR e 62.5 MHz per il ^{13}C NMR; il DMSO- d_6 o CDCl_3 sono stati usati come solventi e il TMS come standard interno. Gli spettri di massa sono stati acquisiti tramite apparato HPLC-massa (6540 UHD Accurate Mass Q-TOF LC/MS – Agilent Technologies) equipaggiato con sorgente Dual AJS ESI.

Procedura generale per la sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 3 a-d

Ad 1 mmol di ammidossima **1** sono stati aggiunti 1.5 eq di piridina, 30 ml di toluene ed infine 2 eq di cloro-acetilcloruro **2**. La reazione è stata posta a reagire a refluxo per circa 2 ore monitorandone l'andamento tramite controllo TLC. La purificazione del prodotto 1,2,4-ossadiazolico è avvenuto per separazione su colonna cromatografica usando la miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato nel rapporto di 10:1.

Procedura generale per la sintesi dell'estere 7 a-c

Una soluzione costituita da 1 mmol di fenolo **4**, 1.2 eq di etil-cloroacetato **6**, 3 eq di K_2CO_3 in DMF (0.5 ml) è stata posta ad agitare a temperatura ambiente over-night. Il work-up di reazione è consistito in un'estrazione con acqua basica ed etile acetato al fine di allontanare in fase acquosa il fenolo residuo. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e tirata a secco con evaporatore rotante. Per l'ottenimento dei derivati **7b** e **7c** è stata necessaria un'ulteriore separazione cromatografica usando la miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato nel rapporto di 10:1. I prodotti **7a** e **7c** assumono l'aspetto di oli trasparenti ed inodore mentre il derivato **7b** si presenta in forma di cristallo.

Prima via di sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 5 a-l (Schema 2.2)

I derivati **3** (1 mmol) sono stati fatti reagire con il fenolo **4** (3 eq) in presenza di K₂CO₃ (3 eq) come base e CH₃CN (40 ml) come solvente di reazione. La reazione è stata condotta a refluxo fino a scomparsa del prodotto di partenza **3**. Il work-up, utile per isolare il prodotto puro ed allontanare l'eccesso di fenolo, è consistito in un'estrazione con acqua basica ed etile acetato seguita da una cromatografia su colonna usando una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (20:1).

Seconda via di sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 5 a-p (Schema 2.4)

Gli esteri **7** (1 mmol) sono stati posti a reagire, in una provetta, con l'ammidossima **1** (1.1 eq) in presenza di K₂CO₃ (3 eq) come base. La reazione è stata condotta in assenza di solvente, riscaldando la provetta per un'ora in un bagno ad olio impostato alla temperatura di 160 °C. La reazione è stata monitorata tramite controllo TLC. L'1,2,4-ossadiazolo finale è stato isolato tramite colonna cromatografica usando l'opportuna miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (20:1).

3-(4-metossifenil)-5-(fenossimetil)-1,2,4-ossadiazolo (5a)

Resa 77 %; p.f. 66-71 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.89 (s, 3H, CH₃), 5.34 (s, 2H, CH₂), 6.99-7.07 (m, 5H), 7.33-7.38 (m, 2H), 8.05-8.08 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.4, 61.1, 114.3, 114.9, 118.8, 122.3, 129.2, 129.8, 157.6, 162.1, 168.3, 174.6; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₄N₂O₃: 283.1085, sperimentale 283.1091

3-(4-metossifenil)-5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5b)

Resa 71 %; p.f. 135 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.88 (s, 3H, CH₃), 5.32 (s, 2H, CH₂), 6.96-7.02 (m, 4 H), 7.29 (d, J= 9 Hz, 2H), 8.04 (d, J= 9 Hz, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 55.4, 61.4, 114.3, 116.3, 118.6, 127.4, 129.2, 129.7, 156.2, 162.2, 168.3, 174.1; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₃N₂O₃Cl: 317.0687, sperimentale: 317.0696

3-(4-metossifenil)-5-((3,4-diclorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5c)

Resa 54 %; p.f. 119 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.90 (s, 3H, CH₃), 5.40 (s, 2H, CH₂), 7.00-7.05 (m, 3H), 7.21-7.25 (dd, J'=2.4 Hz, J''= 8.7 Hz, 1H), 7.44 (d, 2H, J= 2.4 Hz), 8.05 (d, 2H, J= 8.7 Hz); HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₂N₂O₃Cl₂: 351.0297, sperimentale: 351.0315.

3-(3-metilbenzoato)-5-(fenossimetil)-1,2,4-ossadiazolo (5d)

Resa 85 %; p.f. 115 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.97 (s, 3H, CH₃), 5.39 (s, 2H, CH₂), 7.04-7.09 (m, 3H), 7.33-7.38 (m, 2H), 7.57-7.63 (m, 2H), 8.21 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.31 (d, J= 7.8 Hz, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 52.4, 61.13, 114.9, 122.4, 126.8, 128.7, 129.1, 129.8, 131.1, 131.7, 132.4, 157.5, 166.3, 167.9, 175.2; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₄N₂O₄: 311.1026, sperimentale: 311.1023

3-(3-metilbenzoato)-5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5e)

Resa 90 %; p.f. 157 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 3.92 (s, 3H, CH₃), 5.65 (s, 2H, CH₂), 7.15 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.40 (d, J= 9Hz, 2H), 7.74-7.79 (m, 1H), 8.17-8.19 (dd, J'= 1,2 Hz, J''= 7.6 Hz), 8.27-8.30 (dd, J'= 1,2 Hz, J''= 7.6 Hz), 8.56-8.57 (m, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 53.0, 61.6, 117.2, 126.2, 126.8, 128.0, 130.0, 130.7, 131.1, 131.9, 132.7, 156.6, 165.9, 167.5, 176.5; HRMS (ESI) [M+H]⁺ : m/z teorica per C₁₇H₁₃N₂O₄Cl: 345.0637, sperimentale: 345.0644

3-(3-metilbenzoato)-5-((3,4-diclorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5f)

Resa 95 %; p.f. 127 °C; ; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.99 (s, 3H, CH₃), 5.44 (s, 2H, CH₂), 7.05 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 7.22-7.26 (dd, J' = 2.4 Hz, J'' = 8.7 Hz, 1H), 7.45-7.46 (d, J= 2.4 Hz, 1H), 7.59-7.64 (m, 1H), 8.21-8.24 (dd, J'= 1.2 Hz, J'' = 7.8 Hz, 1H), 8.29-8.32 (dd, J'= 1.2 Hz, J'' = 7.8 Hz, 1H), 8.78 (d, J= 1.2 Hz, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 53.0, 62.5, 116.4, 123.3, 125.5, 126.5, 126.7, 127.9, 128.7, 130.1, 130.7, 131.2, 132.0, 132.7, 152.3, 167.6, 175.9 ; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₂N₂O₄Cl₂: 379.0247, sperimentale: 379.0259

3-(4-fluorofenil)-5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5g)

Resa 60 %; p.f. 120 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.34 (s, 2H, CH₂), 6.97-7.00 (m, 2H), 7.17-7.23 (m, 2H), 7.28-7.32 (m, 2H), 8.09-8.14 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.4, 116.2 (d, J= 18.3 Hz), 116.3, 122.5 (d, J= 2,75 Hz), 129.7, 129.6 (d, J= 21.0 Hz), 156.1, 165.4 (d, J= 295.9 Hz), 166.4, 174.5; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₀N₂O₂FCI: 305.0487, sperimentale: 305.0490

3-(4-fluorofenil)-5-(fenossimetil)-1,2,4-ossadiazolo (5h)

Resa 64%; p.f. 74-77 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.36 (s, 2H, CH₂), 7.04-7.09 (m, 3H), 7.16-7.22 (m, 2H), 7.33-7.38 (m, 2H), 8.10-8.15 (m, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.1, 114.9, 116.1 (d, J= 18.3 Hz), 122.4, 122.5 (d, J= 2.62 Hz), 129.7 (d, J=7.3 Hz), 129.8, 157.5, 166.4, 165.4 (d, J= 233.7 Hz), 174.9; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₁N₂O₂F: 271.0877, sperimentale: 271.0881

3-(4-(trifluorometil)fenil)-5-(fenossimetil)-1,2,4-ossadiazolo (5i)

Resa 67 %; p.f. 102 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.39 (s, 2H, CH₂), 7.05-7.08 (m, 3H), 7.34-7.39 (m, 2H), 7.77 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 8.25 (d, J=8.1 Hz, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.1, 114.9, 122.5, 123.7 (q, J= 225.8 Hz), 125.9 (q, J= 3.1 Hz), 127.9, 129.6, 133.3 (q, J= 27 Hz), 157.5, 167.6, 175.4; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₁N₂O₂F₃: 321.0845, sperimentale: 321.0846

3-(4-(trifluorometil)fenil)-5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5l)

Resa 50 %; p.f. 138-142 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.36 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, 2H, J= 9 Hz), 7.31 (d, 2H, J= 9Hz), 7.77 (d, 2H, J= 8.1 Hz), 8.24 (d, 2H, J= 8.1 Hz); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.1, 114.9, 122.5, 123.7 (q, J= 225.7 Hz), 125.9 (q, J= 3.2 Hz), 127.9, 129.6, 129.8, 133.5 (q, J= 27 Hz), 157.5, 167.6, 175.4; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₀N₂O₂F₃Cl: 355.0465, sperimentale: 355.0473

3-(4-clorofenil)-5-(fenossimetil)-1,2,4-ossadiazolo (5m)

Resa 80%; p.f. 97-99 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.36 (s, 2H, CH₂), 7.04-7.09 (m, 3H), 7.34-7.38 (m, 2H), 7.48 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 8.06 (d, J= 8.59 Hz, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.1, 114.9, 122.4, 124.8, 128.9, 129.3, 129.8, 137.6, 157.5, 167.8, 175.1; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₁N₂O₂Cl: 287.0581, sperimentale: 287.0585

3-(4-clorofenil)-5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazolo (5n)

Resa 86%; p.f. 136 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.35 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 7.31 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.49 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 8.06 (d, J= 8.4 Hz, 2H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.4, 116.3, 124.7, 127.5, 128.8, 129.3, 129.7, 137.7, 156.1, 167.9, 174.6; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₅H₁₀N₂O₂Cl₂: 321.0192, sperimentale: 321.0194

N,N-dimetil-4-(5- (fenossimetil)-1,2,4-ossadiazol-3-il)benzennamina (**5o**)

Resa 75%; p.f. 97-100 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.07 (s, 6H, CH₃), 5.34 (s, 2H, CH₂), 6.76 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.04-7.08 (m, 3H), 7.32-7.37 (m, 2H), 7.97 (d, J= 9 Hz, 2H); HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₇N₃O₂: 296.1393, sperimentale: 296.1406

N,N-dimetil-4-(5- (4-clorofenossimetil)-1,2,4-ossadiazol-3-il)benzennamina (**5p**)

Resa 70%; p.f. 146-149 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.06 (s, 6H, CH₃), 5.31 (s, 2H, CH₂), 6.76 (d, J= 9Hz, 2H), 6.99 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.30 (d, overlap with CDCl₃, 2H), 7.96 (d, J= 9Hz, 2H); HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₇H₁₆N₃O₂Cl: 330.1004, sperimentale: 330.1038

Procedura generale per la sintesi degli 1,2,4-ossadiazoli 8 a-c

L'idrolisi dei derivati esterei **5 d-f** è avvenuta per aggiunta di 14 ml di una soluzione acquosa di NaOH 5M a 1 mmol di estere, in presenza di THF (35 ml) come solvente di reazione. La reazione è stata posta ad agitare a temperatura ambiente per 72 ore eseguendo a vari intervalli dei controlli TLC. Dopo allontanamento del THF, mediante rotavapor, al residuo di reazione è stata aggiunta una soluzione acquosa acida (pH≈4) e il solido formatosi è stato filtrato su buckner. I derivati acidi **8 a-c** sono stati purificati tramite cromatografia su colonna usando etile acetato come eluente.

4-(5-fenossimetil)-1,2,4-ossadiazol-3-il)-acido benzoico (**8a**)

Resa 94%; p.f. 297 °C; ¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 5.61 (s, 2H, CH₂), 7.00-7.05 (m, 1H), 7.09 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 7.32-7.38 (m, 2H), 7.69-7.75 (m, 1H), 8.15 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.25 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, DMSO) δ ppm 61.2, 115.2, 122.4, 126.6, 128.2, 130.2, 130.4, 131.5, 132.8, 157.7, 166.9, 167.0, 167.7, 176.6; HRMS (ESI) [M+H]⁺: m/z teorica per C₁₆H₁₂N₂O₄: 297.0869, sperimentale: 297.0877

4-(5-((2,4-diclorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazol-3-il)-acido benzoico (**8b**)

Resa 79 %; p.f. 126 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.75 (s, 2H, CH₂), 7.34-7.37 (m, 1H), 7.44-7.43 (m, 1H), 7.56-7.61 (m, 1H), 7.67-7.68 (d, J= 2.7 Hz, 1H), 8.06 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.11 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 62.5, 116.3, 123.5, 125.9, 126.5, 128.3, 128.7, 129.6, 129.8, 130.1, 131.0, 132.8, 152.3, 168.13, 175.6 HRMS (ESI) [M+H]⁺ m/z teorica per C₁₆H₁₀N₂O₄Cl₂: 365.0090, sperimentale: 365.0093

4-(5-((4-clorofenossi)metil)-1,2,4-ossadiazol-3-il)-acido benzoico (8c)

Resa 71 %; p.f. 290 °C; ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.62 (s, 2H, CH₂), 7.14 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.40 (d, J= 9 Hz, 2H), 7.50-7.55 (m, 1H), 8.00 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 8,53 (s,1H); ¹³CNMR (62.5 MHz, CDCl₃) δ ppm 61.6, 117.2, 118.6, 125.4, 126.1, 128.3, 128.4, 129.0, 129.9, 132.7, 156.6, 167.9, 168.4, 175.9; HRMS (ESI) [M+H]⁺ m/z teorica per C₁₆H₁₁N₂O₄Cl: 331.0480, sperimentale: 331.0487

3.4.2 Biologia

Saggio di citotossicità Presto Blue

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) sono state mantenute in mezzo di coltura Dulbeccò (DMEM) e sono state fatte crescere a confluenza in una piastra a 96 pozzetti. Successivamente (\approx 10000 cellule/pozzetto) sono state trattate per 24 ore con i composti a differenti concentrazioni (da 500 a 0.97 μ M). L'effetto citotossico è stato determinato usando il reattivo Presto Blue (Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore. Ad ogni pozzetto contenente 90 μ l di mezzo sono stati aggiunti 10 μ l di Presto blue e la piastra è stata posta ad incubare per 10 min a 37 °C, al 5 % di CO₂ ed al riparo dalla luce. Trascorso tale tempo, i valori di fluorescenza sono stati letti tramite lettore di piastra (POLARstar OMEGA- BMG Labtechonologies) con filtro di eccitazione impostato a 540 nm e filtro di emissione a 590. La vitalità cellulare è stata calcolata come percentuale dei valori di fluorescenza delle cellule trattate rispetto al valore delle cellule non trattate che è stato posto uguale a cento.

Saggio LDH

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state mantenute in mezzo di coltura Dulbecco (DMEM) e sono state fatte crescere a confluenza in una piastra a 96 pozzetti. Successivamente le cellule (\approx 10000 cellule/pozzetto) sono state trattate per 24 ore con i composti a differenti concentrazioni (da 500 a 1 μ M). La misura della citotossicità è stata effettuata usando il saggio LDH (Cytotoxicity Detection kitPLUS-LDH, Roche) seguendo le istruzioni del produttore. I valori di assorbanza sono stati misurati a 490 nm con lettore di piastra (POLARstar OMEGA- BMG Labtechonologies)

Western Blotting

Le cellule SH-SY5Y sono state piastrate in una piastra a 6 pozzetti (≈ 1800000 cellule/well) e sono state lasciate crescere a confluenza per 24 ore. Trascorso tale periodo sono state trattate con i composti alle concentrazioni desiderate e sono state lasciate ad incubare per altre 24 ore a 37 °C e al 5% di CO₂. Le cellule sono state lisate usando RIPA Buffer 1X contenente il 2% di inibitori delle proteasi. I lisati cellulari sono stati centrifugati a 130000 rpm a 4 °C e il surnatante è stato separato. Dopo quantificazione delle proteine tramite metodo di Bradford (Pierce BCA Protein Assay Kit- Thermo Fisher), 15 μ g di proteine per ciascun campione sono stati separati per elettroforesi sul gel di poliacrilammide NuPAGE 4-12% Bis-Tris Tris(Invitrogen) in presenza di sodiododecilsolfato. Successivamente alla separazione elettroforetica, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state bloccate nei siti aspecifici con una soluzione al 10 % di non-fat milk in buffer TBS-T 1X e lasciate a 4°C per una notte o a temperatura ambiente per un'ora. Le membrane sono state poste ad incubare per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo Rabbit-Policlonal anti-Hsp60 (1: 4000, Abcam), con l'anticorpo Mouse-Monoclonal anti-Hsp70 (1: 4000, BD Bioscience) e con l'anticorpo Rabbit-Policlonal anti-Total Tau (1: 2000, Abcam). Tutti gli anticorpi sono stati sciolti in una soluzione al 5% di non-fat dry milk in TBS-T 1X. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario e gli opportuni lavaggi in TBS-T, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario per un'ora a temperatura ambiente. Sono stati usati anticorpi IgG coniugati con l'enzima perossidasi di rafano (IgG-HRP). In particolare, è stato usato l'anticorpo anti-mouse-IgG-HRP (1:10000, Healthcare) per la rilevazione dell'Hsp70 mentre si è usato l'anticorpo anti-rabbit-IgG-HRP (1:10000, Healthcare) per la rivelazione del segnale associato ad Hsp60 e Total Tau. Si è scelto come controllo la β -actina che è stata rilevata usando l'anticorpo Mouse-Monoclonal-Anti- β -actina-perossidasi (Sigma Aldrich, 1:10000). Il reattivo ECL plus (GE Healthcare) è stato usato per la rivelazione del segnale e il programma Image J per la quantificazione densitometrica delle bande.

Immunofluorescenza

Le cellule SH-SY5Y sono state piastrate in una piastra a 24 pozzetti (≈ 20000 cellule /pozzetto) su cover slip pretrattate con poly-L-lisina. Le cellule sono state trattate con i composti di interesse per 24 ore e sono state fissate per 15 min usando una soluzione al 10% di formaldeide in 1X PBS. Successivamente sono state lavate per tre volte (10 minuti per volta) con 1X PBS e permeabilizzate con una soluzione allo 0.25 % di Triton X in 1X PBS (300 μ l/pozzetto). Dopo

ulteriore lavaggio le cellule sono state poste in blocking per un'ora con Normal Goat Serum 5% (NGS). Si è poi proceduto ad incubare per un'ora a temperatura ambiente con gli anticorpi primari rivolti verso le proteine di interesse: Rabbit Policlonal anti-Hsp60 (1:200, Abcam), Mouse Monoclonal anti-Hsp70 (1:100, BD-Bioscience), Mouse Monoclonal anti-Tau 13 (1:500, Biolegend). Eseguiti tre lavaggi, gli anticorpi primari sono stati marcati con gli anticorpi secondari Goat Anti Mouse Alexa Fluor 568 (Rosso, 1:1000) per Tau 13, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 488 (Verde, 1:1000) per Hsp60, Goat Anti Mouse Alexa Fluor 488 (Verde, 1:1000) per Hsp70, lasciando la piastra ad incubare per un'ora a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. Tutte le soluzioni degli anticorpi utilizzati sono state preparate in NGS 5%. Terminata l'incubazione con gli anticorpi secondari, le cellule sono state lavate con 1X PBS per allontanare l'eccesso di anticorpo non legato. I vetrini per l'analisi al microscopio sono stati montati staccando la coverslip dalla piastra e capovolgendola su 5 μ l di DAPI (Prolong Diamond Antifade mounting media, P36966 Invitrogen) posto al centro del vetrino. I vetrini sono stati fatti asciugare sotto cappa a flusso laminare e poi esaminati con microscopio ottico a fluorescenza Keyence BZ.800 usando i filtri per il DAPI, GFP e Texas Red. L'obiettivo Nikon 20X (Zoom 2X) è stato usato per la cattura delle immagini.

PLA-Proximity Ligation Assay

L'interazione proteina-proteina è stata valutata usando il saggio di legatura di prossimità (Proximity Ligation Assay- PLA). Questo approccio consente di riconoscere molecole target a una distanza inferiore a 40 nm. Il saggio è stato condotto usando Duolink[®] PLA (Sigma Aldrich, DUO92101) in accordo con le istruzioni del produttore. Le cellule SH-SY5Y sono state piastrate, trattate con i composti per 24 ore, fissate con formaldeide al 10% e permeabilizzate con Triton X 0.25% seguendo lo stesso protocollo dell'immunofluorescenza. Le cellule sono state bloccate con la soluzione di blocking fornita dal kit (40 μ l/well) e lasciate ad incubare per un'ora a 37 °C. Gli anticorpi primari Rabbit policlonal anti-Hsp60 (1:200, Abcam), Rabbit policlonal anti-Hsp70 (1:200, Sigma Aldrich), Mouse monoclonal anti-Tau 5 (1:500, Biolegend) e Mouse monoclonal anti-TTCM2 (1:200, in house gene) sono stati diluiti nell'apposito diluente e la loro soluzione (100 μ l) è stata aggiunta a ciascun vetrino. L'incubazione è avvenuta lasciando i vetrini per una notte all'interno di una camera umida per slide. Dopo l'incubazione, i vetrini sono stati tamponati delicatamente con carta per rimuovere l'eccesso di anticorpi e sono stati lavati per tre volte, a temperatura ambiente, con la soluzione di lavaggio A fornita dal produttore. A ciascuna condizione in esame sono stati aggiunti 40 μ l

di una soluzione dei probes MINUS e PLUS creata diluendo con un rapporto di 1:5 i probes nel diluente per anticorpi. Le slides sono state poste ad incubare con tale soluzione nella camera umidificata a 37 °C per un'ora. I vetrini sono stati tamponati con carta per rimuovere l'eccesso della soluzione di PROBES e sono stati lavati con il buffer A per tre volte. Ad essi sono stati aggiunti 40 µl di una soluzione 1:40 della Ligasi in buffer di legame 1X. Tale buffer è stato prima preparato diluendo il buffer Duolink[®] 5X in acqua pura. L'incubazione con la soluzione di ligasi è avvenuta ponendo i vetrini dentro la camera umidificata a 37 °C per 30 minuti. Trascorso il periodo di incubazione la soluzione di ligasi è stata tamponata, le slide sono state lavate per tre volte con il buffer A e sono state trattate con 40 µl di una soluzione 1:80 della polimerasi in buffer di amplificazione 1X. Quest'ultimo, analogamente al buffer di legame, è stato prodotto diluendo il buffer di amplificazione 5X in acqua pura. L'incubazione con la polimerasi è avvenuta anch'essa a 37 °C, in una camera per vetrini umidificata, per 100 min. Dopo la rimozione della soluzione di amplificazione, i vetrini sono stati lavati con il buffer di lavaggio B. In particolare, sono stati effettuati due lavaggi della durata di 10 min con Buffer B 1X e un lavaggio finale di un minuto con Buffer B 0,01X. Le slide da analizzare al microscopio sono state preparate usando il minimo volume di Duolink PLA Mountig Medium contenente DAPI. Le immagini sono state catturate con microscopio Keyence BZ800 usando l'obiettivo Nikon 100 X immerso in nujol.

Valutazione dell'attività di refolding del complesso Hsp60/Hsp10

La valutazione dell'attività di refolding del complesso Hsp60/Hsp10 è stata effettuata mediante Hsp60/Hsp10 Glow-Fold[™] Protein Refolding Kit (BostonBiochem). I mix di reazione, preparati in ghiaccio e in tubi di polipropilene da 0.5 ml, sono stati creati unendo 6µl di H₂O, 2 µl del composto da testare alla concentrazione desiderata (in 0-50% DMSO), 2 µl del buffer di reazione, 4 µl della soluzione 5X di Hsp60, 2 µl della soluzione 10X di Hsp10, 2 µl di Mg²⁺-ATP e 2 µl di Glow fold substrate[™]. Nei due controlli positivo e negativo del test si è scelto di sostituire il composto con 2 µl del solvente di solubilizzazione. Inoltre, nel controllo negativo si è scelto di omettere l'ATP sostituendolo con H₂O. Per valutare il range dinamico dello strumento è stato preparato un mix di reazione contenente 16 µl di H₂O, 2 µl di buffer di reazione e 2 µl della soluzione di Glow fold substrate. Questo mix, a differenza dei precedenti, non è stato sottoposto al processo di denaturazione mediante riscaldamento. Infatti, ne sono

stati prelevati 4 μ l che sono stati aggiunti a 50 μ l di luciferina, contenuti in una piastra, ed è stato registrato il valore di luminescenza.

Tutti gli altri tubi sono stati posti ad incubare a temperatura ambiente per 15-30 min e successivamente a riscaldare per 7 minuti in un bagno ad acqua pre-impostato a 45 °C. Il riscaldamento ha favorito la denaturazione iniziale del Glow-Fold substrate (Luciferasi). In una piastra a 96 pozzetti sono stati aggiunti 50 μ l di Luciferina per pozzetto, predisponendo un numero di pozzetti uguale alle condizioni da analizzare. Successivamente 4 μ l di soluzione prelevata da ciascun tubo sono stati aggiunti ai pozzetti con la luciferina. I valori di luminescenza sono stati letti immediatamente e questa misura è stata usata come valore al tempo zero.

Per favorire il refolding, operato dal complesso Hsp60/Hsp10, i mix di reazione sono stati trasferiti in un bagno ad acqua pre-impostato a 30 °C. Anche in questo caso è stata predisposta una piastra a 96 pozzetti contenente 50 μ l di luciferina a pozzetto. Trascorsi 30 e 60 min dall'inizio del refolding, 4 μ l delle varie condizioni di reazione sono stati prelevati dai tubi e aggiunti ai pozzetti contenenti la luciferina. I valori di luminescenza rappresentano il tempo 30 min e 60 min della reazione di refolding. La luminescenza è stata registrata con lettore di micropiastra Synergy H1 (BioTek). I valori di luminescenza, proporzionali all'attività di refolding, sono riportati come valori di luminescenza relativa (RLU).

Analisi statistica dei dati

Ciascuna misura dei saggi PrestoBlue ed LDH è stata effettuata in triplicato. La quantificazione densitometrica delle bande del Western Blot è stata effettuata usando ImageJ. Il software Image J è stato usato per la quantificazione dell'immunofluorescenza e i valori di densità dei pixel (Integrated Densities) sono stati trasferiti in un grafico a barre ed espressi come media \pm la deviazione standard. Per la misura della colocalizzazione è stato usato il coefficiente di correlazione di Pearson. I dati ottenuti dal saggio di refolding sono stati riportati come media \pm la deviazione standard di tre replicati. Tutti i dati dei saggi di citotossicità, del Western Blot, dell'immunofluorescenza e del saggio di refolding sono stati soggetti ad analisi statistica e comparati tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett usando il programma GraphPad Prism TM 6.01. In tutte le analisi i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di *p value* < 0.05.

3.5 BIBLIOGRAFIA

1. Cassel, J.A., Ilyin, S., McDonnell, M.E., Reitz, A.B. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 3609-3614
2. Ban, H.S., Shimizu, K., Minegishi, H., Nakamura, H. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 11870-11871
3. Ban, H.S., Shimizu, K., Minegishi, H., Nakamura, H. *Pure Appl Chem* **2012**, *84*, 2325-2337
4. Jianming, W., Tuoen, L., Zechary, R., Qibing, M., Xiukun, L., Shousong, C. *Trends Pharm Sci*, **2017**, *38*, 226-256
5. Wick, G., Jakic, B., Buszko, M., Wick, M.C., Groundtman, C. *Nat Rev Cardiol* **2014**, *11*, 516-529
6. Van Eden, W. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **2015**, *15*, 31-36
7. Zilae, M., Shirali, S. *Can J Diabetes*, **2016**, *30*, 1-9
8. Huurman, V.A., Van Der Meide, P.E., Duinkerken, G., Willemen, S., Cohen, I.R., Elias, D., et al. *Clin Exp Immunol* **2008**, *152*, 488-497
9. Skórzyn´ska-Dziduszko, K.E., Kimber-Trojnar, Z., Patro-Małysha, J., Stenzel-Bembenek, A., Oleszczuk, J., Leszczyn´ska-Gorzela, B. *Int J Mol Sci*, **2018**, *19*, 3205
10. Campanella, C., Pace, A., Caruso Bavisotto, C., Marzullo, P., Marino Gammazza, A., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 2603
11. Marino Gammazza, A., Caruso Bavisotto, C., Barone, R., Macario, E.C., Macario, A.J. *Curr Pharm Des* **2016**, *18*, 185-208
12. Gerson, J.E., Castillo-Carranza, D.L., Kaye, R. *ACS Chem Neurosci* **2014**, *5*, 752-769
13. Malik, R., Wiedau, M. *Front Mol Neurosci* **2020**, *13*, 98
14. Cybulska, C., Perk, L., Booi, J., Leverman, P., Rijpkema, M. *Molecules* **2020**, *25*, 482
15. Macario, A.J., De Macario, E.C. *Adv Cell Aging Gerontol* **2001**, *7*, 131-162
16. Chiti, F., Dobson, C.M. *Annu Rev Biochem* **2017**, *86*, 27-28
17. Glabe, C.G., Kaye, R. *Neurology* **2006**, *66*, 74-78
18. Naseri, N.N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M., Luo, W. *Neurosci Lett* **2019**, *13*, 183-184
19. Lasagna-Reeves, C., Castillo-Carranza, D., Sengupta, U., Sermiento, J., Troncoso, J., Jackson, G.R., Kaye, R. *FABE J* **2012**, *26*, 1946-1959
20. Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopez, J., Choy, W.Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., Prado, M.A.M. *Front Neurosci* **2017**, *11*, 254

21. Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., *et al.* *Hum Mol Genet* **2004**, *13*, 703-714
22. Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., *et al.* *J Clin Invest* **2007**, *117*, 648-658
23. Koren III, J., Jinwal, U.K., Lee, D.C., Jones, J.R., Shults, C.L., Johnson, A.G., *et al.* *J Cell Mol Med* **2009**, *13*, 619-630
24. Gorantla, N.V., Chinnathambi, S. *J Mol Neurosci* **2018**, *66*, 356-368
25. Dou, F., Netzer, W.J., Tanemura, K., Li, F., Hartl, F.U., Takashima, A., *et al.* *PNAS USA* **2003**, *100*, 721-726
26. Yu, A., Fox, S.G., Cavallini, A., Kerridge, C., O'Neill, M.J., Wolak, J., *et al.* *J Bio Chem* **2019**, *294*, 7917-7930
27. Jinwal, U.K., Miyata, Y., Koren III, J., Jones, J.R., Trotter, J.H., Chang, L., *et al.* *J Neurosci* **2009**, *29*, 12079-12088
28. Jinwal, U.K., O'Leary III, J.C., Borysov, S.I., Jones, J.R., Li, Q., Koren III, J., *et al.* *J Bio Chem* **2010**, *285*, 16798
29. Miyata, Y., Li, X., Lee, H., Jinwal, U.K., Srinivasan, S.R., Seguin, S.P., *et al.* *ACS Chem Neurosci* **2013**, *4*, 930-939
30. Young, Z.T., Rauch, J.N., Assimon, V.A., Jinwal, U.K., Ahn, M., Li, X., *et al.* *Cell Chem Bio* **2016**, *23*, 992-1001
31. Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M., Harrington, C.R. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*, 11213-11218
32. Dichey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., *et al.* *J Clin Inv* **2007**, *117*, 648-658
33. Miyata, Y., Koren, J., Kiray, J., Dichey, C.A., Gestwicki, J.E. *Fut Med Chem* **2011**, *3*, 1523-1537
34. Campanella, C., Pace, A., Bavisotto, C.C., Marzullo, P., Marino Gammazza, A., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting. *Int J Mol Sci*, **2018**, *19*, 2603
35. Zhang, R., Li, Y., Hou, X., Miao, Z., Wang, Y. *Exp Ther Med* **2017**, *14*, 1832-1836
36. Cappello, F., De Macario, C.E., Marino Gammazza, A., Bonaventura, G., Carini, F., Czarnecka, A.M. *et al.* *Font Biosci* **2013**, *18*, 626-637
37. Takano, M., Yamashita, T., Nagano, K., Otani, M., Maekura, K., Kamada, H., *et al.* *Neurosci Lett* **2013**, *534*, 85-89

38. Veereshwarayya, V., Kumar, P., Rosen, K.M., Mestril, R., Querfurth, H.W. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 29468-29478
39. Walls, K.C., Coskun, P., Gallegos-Perez, J.L., Zadourian, N., Freude, K., Rasool, S., *et al.* *J Biol Chem* **2012**, *287*, 30317-30327
40. Mangione, M.R., Vilasi, S., Marino, C., Librizzi, F., Canale, C., Spigolon, D., *et al.* *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1860*, 2474-2483
41. Vilasi, S., Carrotta, R., Ricci, C., Rappa, G.C., Librizzi, F., Martorana, V., *et al.* *ACS Chem Neurosci* **2019**, *10*, 3565-3574
42. Nemirovsky, A., Fisher, Y., Baron, R., Cohen, I.R., Monsonego, A. *Vaccine* **2011**, *29*, 4043-4050
43. Cappello, F., Marino Gammazza, A., Palumbo Piccionello, A., Campanella, C., Pace, A., De Macario, E.C., *et al.* *Expert Opin Ther Targets* **2014**, *222*, 4040-4049
44. Tanabe, M., Ishida, R., Izuhara, F., Komatsuda, A., Wakui, H., Sawada, K., *et al.* *Am J Mol Biol* **2012**, *2*, 93-102
45. Wullff, J.E., Herzon, S.B., Siegrist, R., Myers, A.G. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 4898-4899
46. Nagumo, Y., Kakeya, H., Shoji, M., Hayashi, Y., Dohmae, N., Osada, H. *Biochem J* **2005**, *387*, 835-840
47. Spinello, A., Barone, G., Cappello, F., Pace, a., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. *Chem Select* **2016**, *4*, 759-765
48. Caruso Bavisotto, C., Nikolic, D., Marino Gammazza, A., Caruso Bavisotto, C., Barone, R., Emanuele, S., *et al.* *J Inorg Biochem* **2017**, *170*, 8-16
49. Cassiano, C., Monti, M.C., Festa, C., Zampella, A., Riccio, R., Casapullo, A. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1953-1958
50. Ding, F., Li, F., Li, Y., Hou, X., Ma, Y., Zhang, N., *et al.* *Exp Ther Med* **2016**, *12*, 823-828
51. Caruso Bavisotto, C., Marino Gammazza, A., Lo Cascio, F., Mocchiato, E., Maria Vitale, A., Vergilio, G., *et al.* *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 661
52. Ding, F., Li, Y., Hou, X., Zhang, R., Hu, S., Wang, Y. *Biomed Rep* **2016**, *5*, 623-628
53. Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H. *Am J Physiol Cell Physiol* **2011**, *300*, 723-724
54. Alam, M.S. *Curr Protoc Immunol* **2018**, *123*, e58

CAPITOLO IV

Proteasi di SARS-CoV-2 e design di nuovi inibitori

La diffusione dell'epidemia COVID-19 ha indirizzato l'attività di ricerca verso l'identificazione di nuovi derivati in grado di contrastare la replicazione virale. Uno screening di tipo computazionale e la successiva valutazione *in vitro* hanno consentito di identificare nuovi inibitori della proteasi di SARS-CoV-2 a struttura 1,2,4-ossadiazolica e calix-[4]-arenica. Gli studi computazionali presentati in questo capitolo sono stati effettuati dal Professore Antonino Lauria dell'Università degli Studi di Palermo. Mentre, gli studi di inibizione della proteasi e la valutazione dell'equilibrio dimero-monomero sono il frutto della collaborazione con colleghi dell'Università di Perugia e dell'Università Politecnica delle Marche.

4.1 INTRODUZIONE

Nel ventunesimo secolo si è assistito a una notevole diffusione di coronavirus responsabili di sindromi respiratorie acute gravi come la SARS-CoV diffusasi nel 2003 e la sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS-CoV) diffusasi nel 2012.¹ La più recente pandemia COVID-19 è causata dal SARS-CoV-2 il cui genoma presenta l'82% di similarità con il virus responsabile della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV).² I coronavirus sono virus ad RNA a singolo filamento positivo e al microscopio elettronico mostrano un aspetto simile ad una corona. La prima sequenza genomica di SARS-CoV-2 isolata a Wuhan e depositata in Gbank è di circa 30 kb.³ Tra le proteine strutturali codificate dal genoma vi è la glicoproteina spike la quale riconoscendo il recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) permette l'ingresso del virus nelle cellule ospiti.⁴ L'RNA virale entrato nelle cellule produce due poliproteine, pp1a e pp1ab, che sono responsabili della replicazione e proliferazione del virus. La proteasi del coronavirus chiamata M^{pro} o detta anche 3CL^{pro} è responsabile del processamento di tali poliproteine e della maturazione del virus. Essa

opera su almeno 11 siti di cleavage della poliproteina. In accordo con la nomenclatura introdotta da Shechter e Berger⁵ la M^{pro} riconosce i residui del substrato in un intervallo da P₄ a P₁' (**Figura 1.1**). L'analisi dei siti di cleavage delle poliproteine processate dalla proteasi di SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV ha mostrato un'alta similarità per i siti di riconoscimento del substrato e in particolare per la glutamina in P1 che è altamente conservata in tutti i siti di cleavage. Inoltre, l'idrolisi in prossimità della glutamina rende la M^{pro} un target ideale nella terapia antivirale in quanto le proteasi delle cellule umane ospiti non presentano questa specificità di substrato.⁶ L'inibizione della proteasi di SARS-CoV-2 è quindi un valido approccio terapeutico per lo sviluppo di nuovi agenti antivirali efficaci nel contrastare l'epidemia.⁷

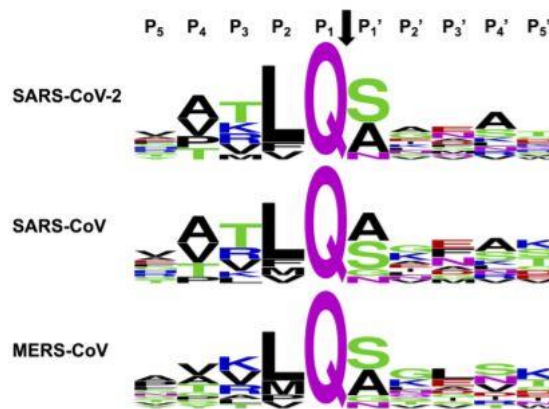


Figura 1.1. Siti di cleavage riconosciuti dalle M^{pro} di SARS-CoV, SARS-CoV2 e MERS.⁸

4.1.1 Struttura della proteasi di SARS-CoV-2

La sovrapposizione delle strutture cristallografiche della proteasi di SARS-CoV-2, di SARS-CoV e di MERS-CoV indica un alto grado di similarità e di conservazione del sito attivo. Questa similarità può essere sfruttata per l'identificazione di nuovi inibitori di SARS-CoV-2 partendo da inibitori già identificati rivolti verso SARS-CoV e MERS-CoV.

La proteasi M^{pro} possiede tre domini e un sito catalitico costituito dalla diade His41-Cys145. Il sito di legame del substrato si trova in una tasca posizionata tra il dominio I (residui 10-99) e II (residui 100-182). Il dominio III (residui 198-303) presenta struttura ad α -elica ed è coinvolto nella dimerizzazione della proteasi che avviene tramite interazione del Glu 290 di un monomero e l'Arg 4 dell'altro (**Figura 1.2**).⁹ La dimerizzazione è necessaria per l'attività della proteasi che in forma monomericamente è completamente inattiva. La dimerizzazione definisce la forma del

sito di legame del substrato probabilmente tramite l'interazione dei residui N terminali di ciascun monomero (N-finger) e il residuo Glu166 dell'altro monomero.¹⁰

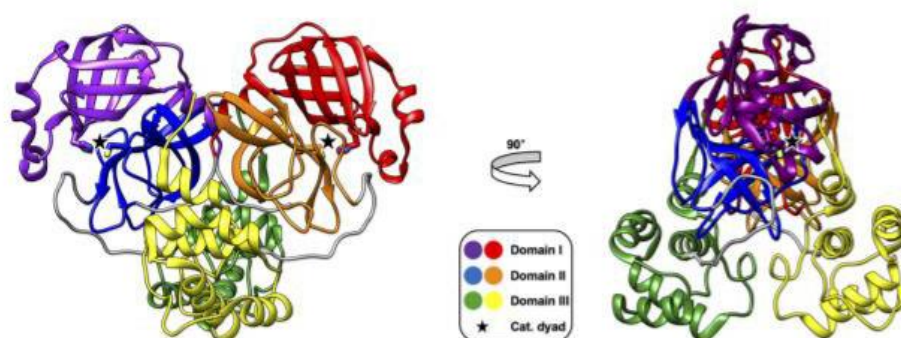


Figura 1.2. Struttura cristallografica dell'omodimero di SARS-CoV-2 (PDB: 6Y2E).⁸

4.1.2 Inibitori della proteasi di SARS-CoV-2

Potenziali inibitori della proteasi possono bloccare l'attività catalitica agendo sul sito di legame del substrato. Poiché la dimerizzazione è il processo chiave dell'attivazione biologica della proteasi un altro possibile approccio terapeutico per il COVID 19 potrebbe basarsi sull'uso di inibitori che agiscono anche sull'equilibrio monomero-dimero e quindi sul sito di dimerizzazione di M^{pro} .^{11,12} Le mutazioni della M^{pro} sono poco frequenti perché sarebbero fatali per il virus. Essendo la proteasi essenziale per la sopravvivenza del virus, il rischio di insorgenza di resistenza agli inibitori delle proteasi, dovuta a mutazioni della proteina target, è veramente basso. Inoltre, gli inibitori della proteasi possono trovare applicazione in differenti infezioni data l'alta similarità delle proteasi di vari coronavirus. Gli inibitori della M^{pro} e della proteasi di MERS-CoV possiedono gruppi reattivi in grado di legare covalentemente i residui di cisteina del sito catalitico. Anche gli inibitori emergenti della M^{pro} di SARS-CoV-2 mostrano residui reattivi con la cisteina che vengono definiti "cysteine-reactive warheads". I primi inibitori riportati presentano una struttura peptidomimetica che simula il sito di riconoscimento del substrato. Gli inibitori **1-3** riportati in **Figura 1.3** presentano un gruppo α -ketoammidico in grado di formare emioacetali con la Cys 145. La catena laterale P1 costituita da un gruppo γ -lattame mima il residuo di glutamina dei siti di cleavage delle sequenze polipeptidiche.⁹ Il derivato **4** identificato in precedenti studi aventi come target la M^{pro} di SARS-CoV è un accettore di Michael che lega in maniera irreversibile e covalente la Cys145 e ha mostrato attività anti-SARS-CoV-2 in cellule Vero.¹³ I composti **5** e **6** sono i più potenti inibitori noti

della M^{pro} di SARS-CoV-2. Il loro gruppo aldeidico in posizione C-terminale agisce come testa di guerra (cysteine-reactive warhead) e come dimostrato da studi cristallografici, lega covalentemente la Cys 145 del sito catalitico.¹⁴ Il docking di farmaci già approvati o in fase clinica sulla proteasi di SARS-CoV-2 ha portato all'identificazione di interessanti inibitori dell'attività enzimatica. Tra questi composti vi sono Ebselen, Disulfiram, Carmofur, Tideglusib e PX-12 (**Figura 1.3**). Ebselen e Carmofur modificano covalentemente la Cys 145 e hanno mostrato attività anti-SARS-CoV-2 in cellule. La struttura cristallografica della proteasi M^{pro} di SARS-CoV-2, in presenza di Carmofur, mostra un trasferimento della catena esiluridica sulla cisteina catalitica.¹⁵

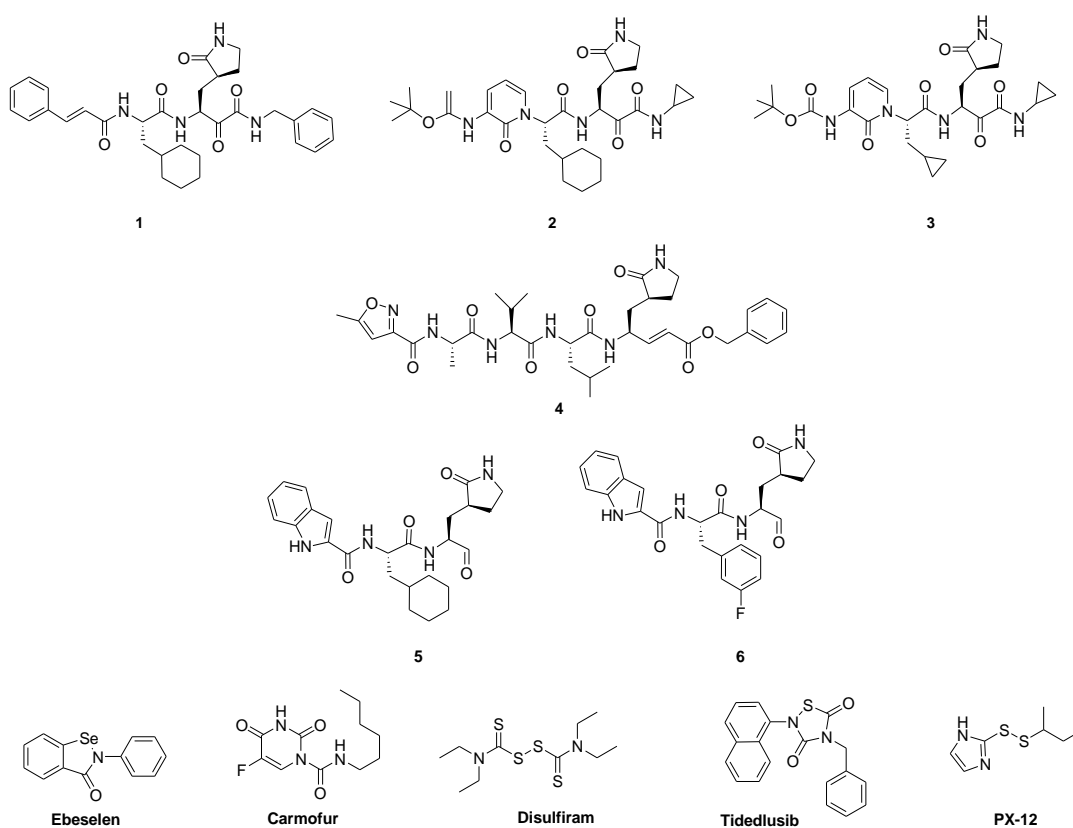


Figura 1.3 Inibitori noti della proteasi M^{pro} di SARS-CoV-2

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Allo scopo di identificare nuovi inibitori di SARS-CoV-2 è stato applicato un protocollo *in silico* su una libreria di composti di sintesi esclusivi, commerciali e appositamente disegnati. In particolare, è stato effettuato uno studio di docking molecolare sul sito catalitico di M^{pro} partendo dalla struttura di SARS-CoV-2 M^{pro} co-cristallizzata con l'inibitore nativo **3** riportato in **Figura 1.3**. L'inibitore in questione lega covalentemente il residuo catalitico Cys145 e tramite legami a idrogeno il residuo Glu166 che è fondamentale nel processo di dimerizzazione. Le molecole che hanno ottenuto i migliori punteggi al docking molecolare sono state valutate servendosi di un approccio Ligand Based e usando il server DRUDIT.¹⁶ Con tale analisi sono state valutate le caratteristiche topologiche, termodinamiche e di carica dei ligandi a cui è stato assegnato uno score (DAS - Drudit Affinity Score). Le molecole con score migliore sono state processate con Induced Fit Docking (IFT). In **Figura 2.1** sono riportate le molecole che hanno ottenuto il miglior score all'Induced Fit Docking. I composti **3** e **7** sono quelli che hanno dato lo score più alto. Essi legano il sito di legame del substrato ma a differenza dell'inibitore co-cristallizzato legano un pattern di aminoacidi diversi non legando il sito catalitico dell'enzima. È interessante notare che alcuni composti selezionati presentano una porzione fluoroarilica sostituita con un anello 1,2,4-ossadiazolico, tale porzione suscettibile di sostituzione nucleofila aromatica potrebbe rappresentare una nuova porzione reattiva nei confronti di Cys 145, configurandosi come inedita *warhead*.

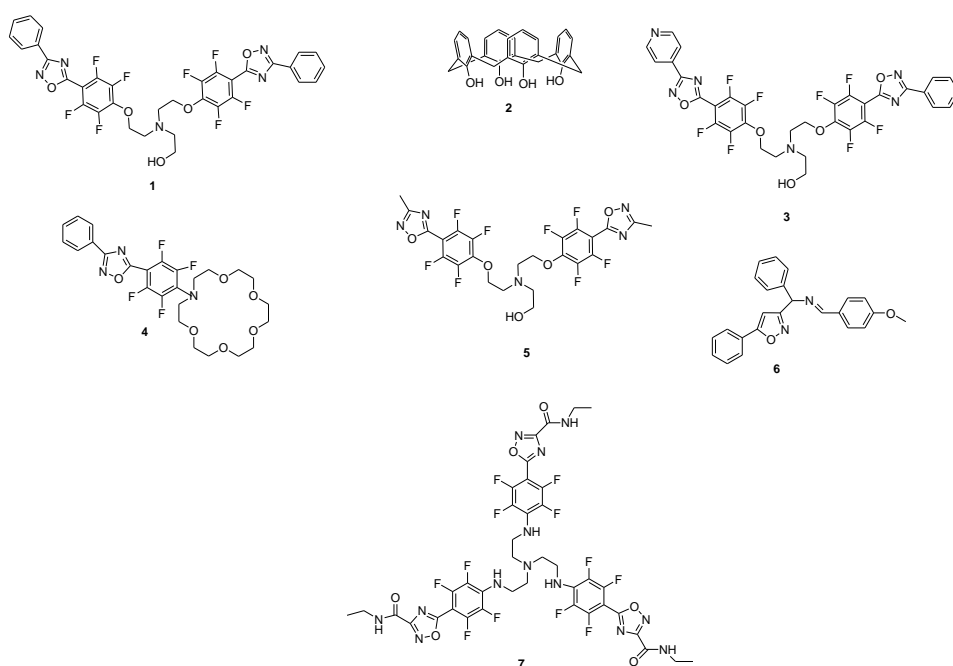
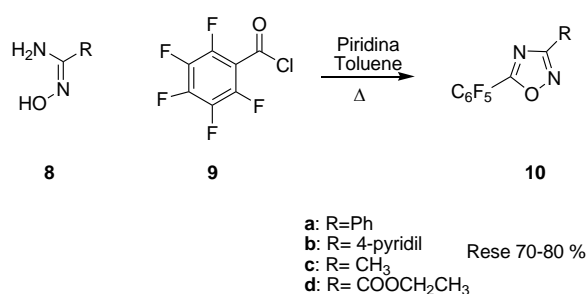


Figura 2.1. Composti che hanno ottenuto il migliore score all'IFD su M^{pro} di SARS-CoV2

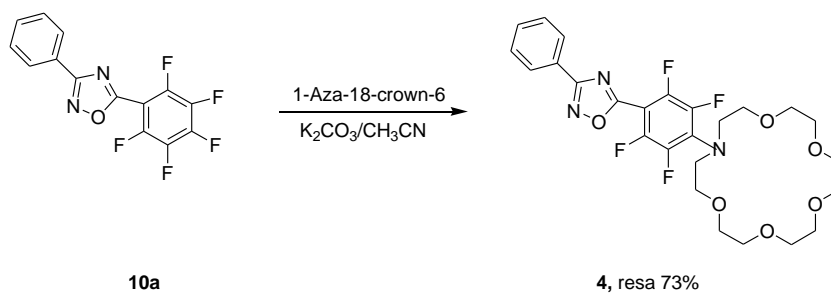
4.2.1 Sintesi dei composti 1, 3,4,5 e 7

I composti **1**, **3**, **4**, **5** e **7**, che hanno ottenuto il migliore score all'Induced Fit docking sulla M^{pro} di SARS-CoV-2, sono stati sintetizzati usando come substrato di partenza il 5-pentafluorofenil-1,2,4-ossadiazolo **10** (Schema 2.1). Quest'ultimo è stato prodotto seguendo la via di sintesi classica del nucleo 1,2,4-ossadiazolico che prevede la reazione tra l'ammidossima variamente sostituita **8** e il pentafluorobenzoilcloruro **9**, in presenza di piridina come base e toluene come solvente di reazione.



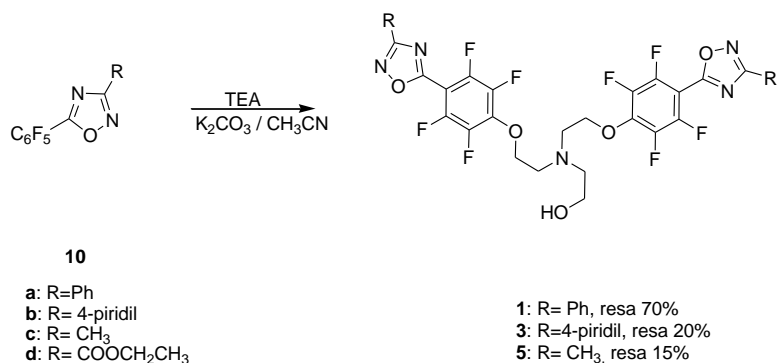
Schema 2.1

Il composto **4** (Schema 2.2) è stato ottenuto tramite sostituzione nucleofila aromatica (S_NAr) dell'1-Aza-18-crown-6 sulla posizione para del 5-pentafluorofenil-1,2,4-ossadiazolo. La reazione è stata condotta in acetonitrile ed in presenza di K₂CO₃ come base.



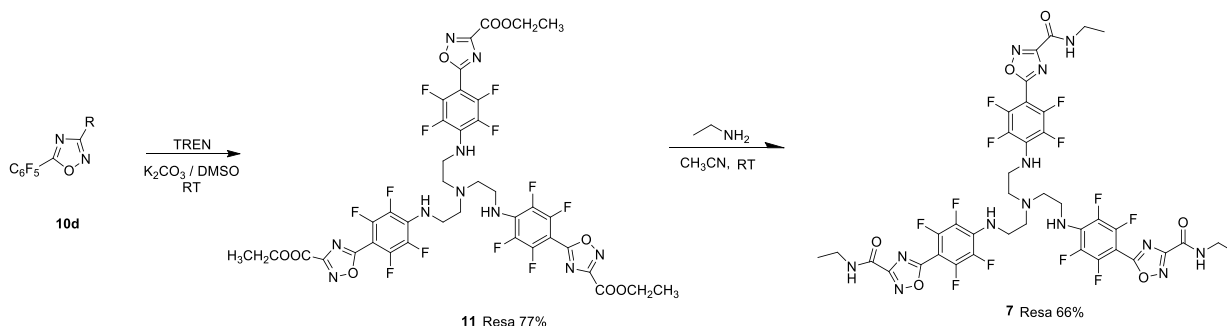
Schema 2.2

La reazione di S_NAr del 5-pentafluorofenil-1,2,4-ossadiazolo variamente sostituito con la trietanolammina, nel rapporto molare di 3:1, ha consentito di ottenere i composti di interesse **1**, **3** e **5** (Schema 2.3). La reazione è stata condotta in acetonitrile usando K₂CO₃ come base.



Schema 2.3

Il composto **7** è stato ottenuto tramite due passaggi di reazione. In un primo step, a partire dall'1,2,4-ossadiazolo **10d** e dalla *tris*(2-amminoetil)ammina (TREN), è stato sintetizzato l'estere tripodale **11** il quale è stato precedentemente riportato come sensore fluorescente di metalli pesanti.¹⁷ Nello step successivo **11** ha reagito con etilammina per dare il composto di interesse **7** (Schema 2.4).



Schema 2.4

4.2.2 Saggio di inibizione *in vitro* della M^{Pr}o di SARS-CoV-2

I composti più interessanti sono stati saggiati *in vitro* allo scopo di identificare nuovi inibitori della proteasi del SARS-CoV-2. L'attività enzimatica è stata valutata monitorando, in modalità cinetica, la fluorescenza emessa del substrato MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH₂ (λ_{ex} =320 nm, λ_{em} =405 nm). La fluorescenza, dipendente dall'attività catalitica di M^{Pr}o, subisce una variazione in presenza dei composti testati alla concentrazione di 30 μ M (**Figura 2.2**).

I derivati **2**, **4**, **5** e **7** inducono una inibizione irreversibile dell'enzima, mentre i composti **1** e **6** sono risultati inattivi. Inoltre, per i composti più attivi **2** e **7** il test di inibizione enzimatica è stato condotto in funzione della concentrazione. Le percentuali di inibizione ottenute sono

state usate per il calcolo dell'IC₅₀ sfruttando l'equazione di Hill: $p(C_1) = 100 / (1 + (IC_{50}/C_1)^n)$. I valori di IC₅₀ ottenuti sono stati $10.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ per il composto **2** e $15 \pm 2 \mu\text{M}$ per il composto **7**. Per il composto **4** non è stato possibile determinare il valore di IC₅₀ a causa dell'interferenza data dalla fluorescenza del composto stesso.

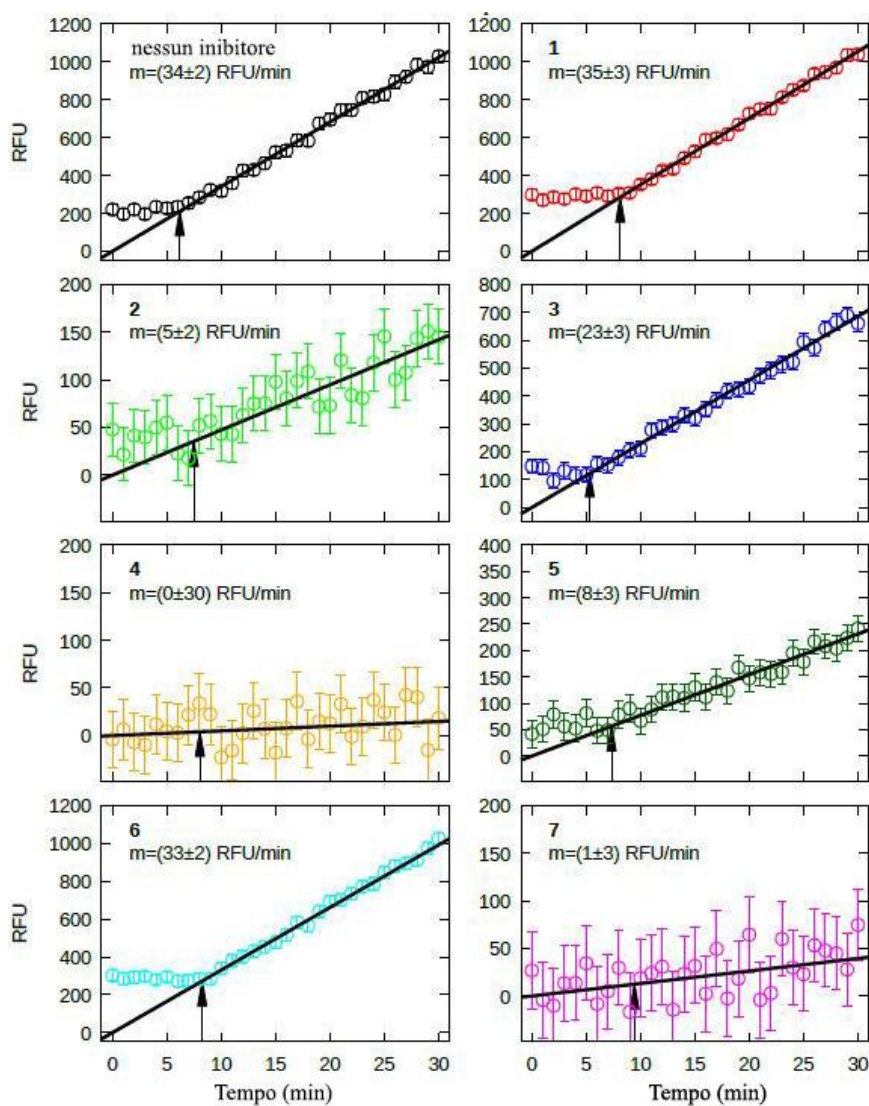


Figura 2.2. Risultati del saggio di valutazione dell'attività di M^{pro} effettuato in presenza dei composti **1-7**. Le rette riportate sono quelle che meglio si adattano ai valori di fluorescenza misurati nell'intervallo 0-30 min. Per ciascun composto è indicata la pendenza *m* della retta.

4.2.3 Valutazione dell'equilibrio dimero-monomero di M^{pro} in presenza degli inibitori

L'equilibrio dimero-monomero della proteasi M^{pro} è stato analizzato usando la spettroscopia CD (Circular Dichroism) (**Figura 2.3**) e il SAXS (Small Angle X-ray scattering) (**Figura 2.4**) che ha fornito l'importante valore della costante di dissociazione del dimero della M^{pro} in presenza dei sette inibitori (**Tabella 1**).

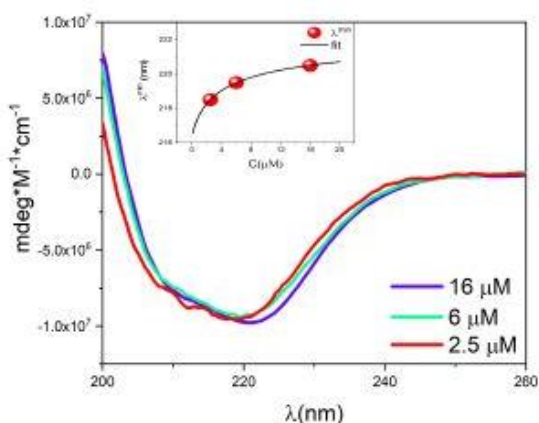


Figura 2.3. Spettro CD della M^{pro} di SARS-CoV-2 a tre differenti concentrazioni.

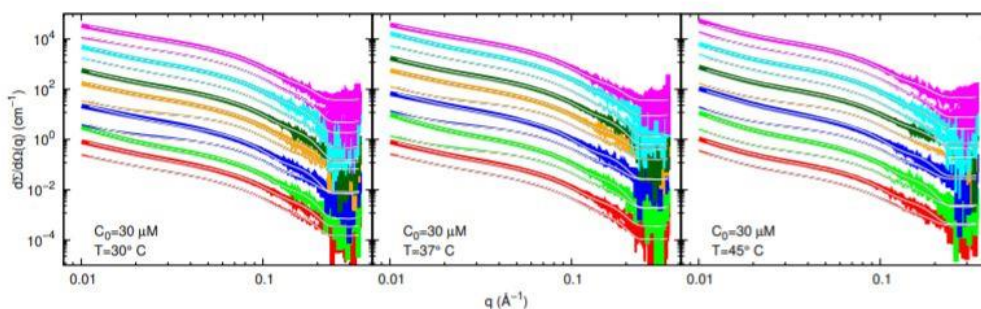


Figura 2.4. Risultati del SAXS effettuato sulla M^{pro} di SARS-CoV-2 con gli inibitori a differenti concentrazioni e temperature. Ciascun pannello riporta le curve alla stessa temperatura. Gli inibitori **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7** sono indicati rispettivamente con i colori rosso, verde, blu, arancione, verde-scuro, ciano e magenta. La linea sottile e spessa si riferiscono rispettivamente agli inibitori alla concentrazione di 30 e 60 μM.

30 μM Inibitore		1	2	3	4	6	7	
K_D°	(μM)	14±1	8±3	7±2	6±2	15±3	14±3	
60 μM Inibitore		1	2	3	4	5	6	7
K_D°	(μM)	26±4	8±6	7±4	5±4	19±7	30±10	30±10

Tabella 1. Costanti di dissociazione derivanti dall'analisi SAXS eseguita sulla M^{pro} di SARS-CoV-2 in presenza degli inibitori.

Il composto **7** ha una K_D relativa all'equilibrio dimero-monomero molto elevata paragonabile al composto **6**, ma a differenza di quest'ultimo, si è rilevato molto attivo anche nel saggio di inibizione enzimatica. La mappa dei contatti con i residui amminoacidici della proteasi ha messo in luce 12 interazioni di cui 6 legami a idrogeno. Di rilevante importanza sono il legame a idrogeno con l'amminoacido Glu166, importante per la dimerizzazione e la formazione del sito di legame del substrato, e con l'His 41 del sito catalitico (**Figura 2.5 a**). Invece, il composto **4**, risultato molto attivo nel saggio in vitro, ha dato una K_D prossima a quella dell'enzima non inibito. La mappa delle interazioni ha evidenziato che il composto **4** interagisce con Glu166 del monomero ma non forma con esso legame a idrogeno. L'unico legame a idrogeno che spiega l'elevato effetto inibitorio del composto **4** è quello con His 41 del sito catalitico (**Figura 2.5 b**)

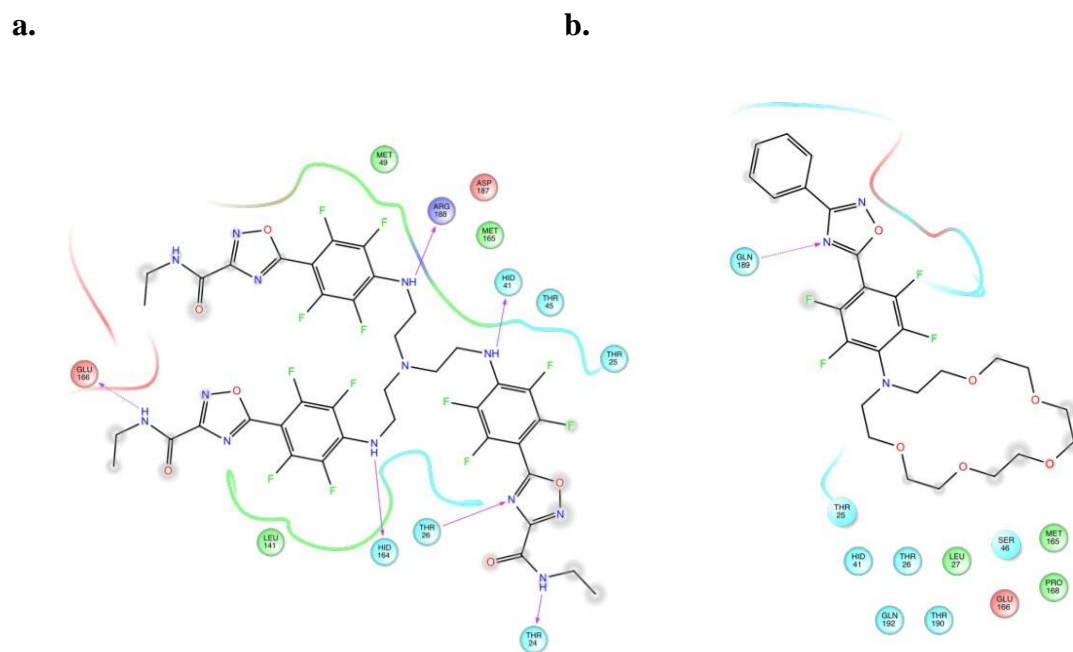


Figura 2.5. Mappa delle interazioni dei composti **7** (**a**) e **4** (**b**) con gli amminoacidi della tasca catalitica del monomero di M^{pro} . Il cut-off di interazione è stato settato a 3 Å

Nel complesso i risultati hanno mostrato che i derivati 1,2,4-ossadiazolici possono dare un effetto inibitorio sulla proteasi ma non sempre modificano l'equilibrio dimero-monomero. Così come alcuni composti pur provocando una dissociazione del dimero non sempre esercitano un'attività inibitoria sulla proteasi. I risultati complessivi sono riassunti nella **Figura 2.6** in cui viene riportato il grado di inibizione enzimatica (rappresentato dalla pendenza m della curva di inibizione) in funzione della costante di dissociazione dell'equilibrio dimero-monomero. Per i composti segnati in rosso, come previsto, l'attività inibitoria sulla proteasi si è rivelata essere proporzionale alla costante di dissociazione. Maggiore è la dissociazione del dimero attivo e

maggiore è l'effetto inibitorio osservato. Al contrario i composti segnati in blu hanno dato un andamento opposto: l'aumento della K_D non ha dato un incremento dell'inibizione di M^{pro} . Quest'ultimo risultato può essere interpretato considerando che in tutti i casi l'equilibrio di dissociazione è debole e in presenza di composti che alterano l'equilibrio dimero-monomero, ma che non interferiscono con il legame del substrato vi saranno sempre dimeri attivi che agiscono sul substrato disponibile.

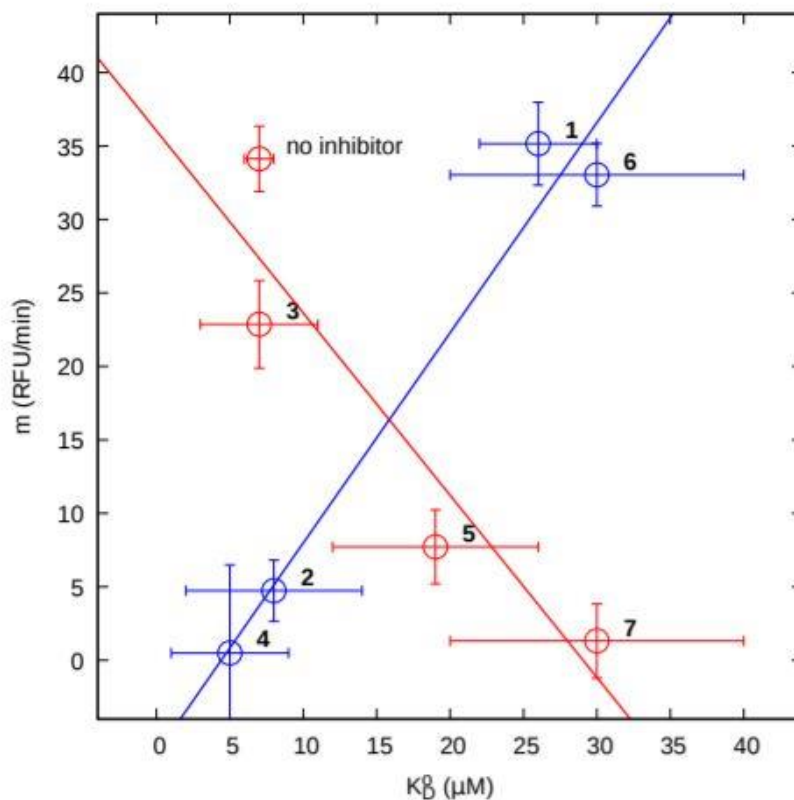


Figura 2.6. Correlazione tra l'attività catalitica di M^{pro} , rappresentata dalla pendenza della retta di inibizione, e la costante di dissociazione del dimero in presenza dei sette inibitori.

4.3 CONCLUSIONI

Gli esperimenti riportati evidenziano la correlazione tra inibizione della M^{pro} e la dissociazione del dimero. Inoltre, per la prima volta in questo campo, è stato usato il SAXS che ha consentito di ottenere preziose informazioni strutturali sulla proteasi in soluzione e in presenza di possibili inibitori. I derivati 1,2,4-ossadiazolici fluorurati **4,7** ed il calix-[4]-arene **2** hanno mostrato un'importante attività inibitoria sulla proteasi del SARS-CoV2 e possono essere considerati validi candidati per lo sviluppo di composti utili al trattamento del COVID-19 e in generale delle epidemie causate da coronavirus. In particolare, il derivato **7** è il primo inibitore noto della M^{pro} in grado di favorire la scissione del dimero attivo della proteina. Si potrebbe ipotizzare che tali derivati fluorurati leghino la proteasi grazie a una sostituzione nucleofila operata dal gruppo SH della cisteina catalitica sugli atomi di fluoro aromatici. Quindi, i composti potrebbero agire come “cysteine-reactive warheads”. La verifica di tale ipotesi, così come studi ulteriori sull'attività di tali inibitori sono attualmente in corso.

4.4 MATERIALI E METODI

Tutti i solventi e reagenti sono stati acquistati e usati senza ulteriore purificazione. Le reazioni sono state monitorate tramite cromatografia su strato sottile (Merk KGaA, Darmstadt, Germany). I composti sintetizzati sono stati purificati attraverso cromatografia flash usando silice (Merck, 0.040-0.063 mm) e un mix di etile acetato ed etere di petrolio in varie proporzioni come eluenti. Il punto di fusione è stato determinato con un apparato Reichart-Thermovar Hostage su piastra Kofler. $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati utilizzati per verificare la struttura e la purezza dei composti sintetizzati. L' $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati registrati con spettrometro Bruker 300 Avance alla frequenza di 300 MHz per $^1\text{H-NMR}$ e 62.5 MHz per il $^{13}\text{C-NMR}$; il $\text{DMSO-}d_6$ o CDCl_3 sono stati usati come solventi e il TMS come standard interno. Gli spettri di massa sono stati acquisiti tramite apparato HPLC-massa (6540 UHD Accurate Mass Q-TOF LC/MS – Agilent Technologies) equipaggiato con sorgente Dual AJS ESI.

Procedura generale per la sintesi dei 5-pentafluorofenil-1,2,4-ossadiazoli **10**

Un mix dell'appropriata ammidossima (10 mmol), di piridina (0.88g, 11 mmol) e del pentafluorobenzoilcloruro (2.54 g, 11 mmol) in toluene anidro (100 ml) è stato posto a reagire a refluxo per 8 ore. Dopo l'allontanamento del solvente con evaporatore rotante, il residuo è stato trattato con acqua ed estratto con etile acetato. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 ed evaporata. Il residuo è stato separato in colonna cromatografica usando una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (10: 1). I dati spettroscopici relativi ai composti **10 a-d** sono consistenti con quelli riportati in letteratura.¹⁸⁻²⁰

Procedura per la sintesi dell'inibitore **4**

L'ossadiazolo **10a** (312mg, 1mmol) è stato disciolto in acetonitrile (5 ml). Successivamente 1-Aza-18-crown-6 (289 mg, 1.1 mmol) e K_2CO_3 (152 mg, 1.1 mmol) sono stati aggiunti e la sospensione è stata posta ad agitare a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione è stata monitorata attraverso TLC. Il solvente di reazione è stato allontanato sottovuoto e il residuo è stato trattato con H_2O (50 ml) prima di essere estratto con etile acetato per tre volte (50 ml per volta). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e tirata a secco con rotavapor. Il residuo ottenuto è stato ulteriormente purificato per cristallizzazione in EtOH.

Resa: 73%. p.f.: 60-62 °C. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 3.68-3.80 (m, 24H, overlapped $-\text{CH}_2-$ signals), 7.51-7.54 (m, 3H, Ar), 8.16-8.20 (m, 3H, Ar). FTIR (Nujol) 1647, 1529, 1518 cm^{-1} ; HRMS-ESI [(M+H)+]: m/z teorica per $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_6$: 556.2060; sperimentale, 556.2046

Procedura generale per la sintesi dei composti **1**, **3**, **5** e **11**

Ad una soluzione di trietanolanmina (0.075 g, 0.5 mmol) in acetonitrile anidro (10ml) sono stati aggiunti K₂CO₃ (0.621g, 4.5 mmol) e l'ossadiazolo **10** (1.5 mmol di **10b-d** o 1 mmol di **10a**). Il mix di reazione è stato posto ad agitare a temperatura ambiente. Dopo evaporazione del solvente di reazione il residuo è stato trattato con acqua ed estratto con etile acetato. La fase organica è stata essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata sottovuoto. La separazione cromatografica del residuo usando la miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (2:1) ha consentito di ottenere il prodotto desiderato. I dati spettroscopici relativi ai composti **1**, **3**, **5**, e **11** sono consistenti con quelli riportati in letteratura.^{16,18}

Procedura generale per la sintesi del composto **7**

L'ossadiazolo **11d** (101 mg, 0.1 mmol) è stato disciolto in acetonitrile (3 ml). Una soluzione metanolica di etilammina 2M (150 µl, 0.3 mmol) è stata aggiunta alla soluzione di ossadiazolo e il mix è stato posto ad agitare a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione è stata monitorata tramite controllo TLC. Il solvente di reazione è stato allontanato tramite evaporatore rotante e il residuo è stato trattato con H₂O (50 ml) prima di essere estratto per tre volte con etile acetato (50 ml per volta). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata sottovuoto. Il residuo ottenuto è stato ulteriormente purificato attraverso cromatografia su colonna usando una miscela eluente costituita da etere di petrolio ed etile acetato (10:1).

Resa: 66%. p.f: 188-189 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.18 (t, 9H, J = 6.9 Hz, CH₃), 2.85 (bs, 6H, NCH₂CH₂NH-), 3.34-3.48 (m, 6H, CH₃CH₂NH-), 3.56 (bs, 6H, NCH₂CH₂NH-), 6.91 (bs, 3H, NCH₂CH₂NH-), 9.02 (t, 3H, J = 5.7 Hz, NHCH₂CH₃). FTIR (Nujol) 3325, 1701, 1680, 1647 cm⁻¹; HRMS-ESI [(M+H)⁺]: m/z teorica per (C₃₉H₃₄F₁₂N₁₃O₆)⁺: 1007.2485; sperimentale, 1007.2518.

Il derivato **6** è stato preparato come descritto precedentemente in letteratura.²¹

4.5 BIBLIOGRAFIA

1. Yang, Y., Peng, F., Wang, R., *et al.* *J Autoimmun* **2020**, *109*, 102434
2. Wang, C., Horby, P.W., Hayden, F.G., Gao, G.F. *Lancet* **2020**, *395*, 470-473
3. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., *et al.* *Nature* **2020**, *579*, 265-269
4. Lu, G., Wang, Q., Gao, G.F. *Trends Microbiol* **2015**, *23*, 468-478
5. Schechter, I., Berger, A. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *27*, 157-162
6. Zhang, L., Lin, D., Sun, X., *et al.* *Science* **2020**, *368*, 409-412
7. Hilgenfeld, R. *FEBS J* **2014**, *281*, 4085-4096
8. Ullrich, S., Nitsche, C. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30*, 127377
9. Shi, J., Song, J. *FEBS J* **2006**, *273*, 1035-1045
10. Anand, K., Palm, G.J., Mesters, J.R., Siddell, S.G., Ziebuhr, J., Hilgenfeld, R. *EMBO J* **2002**, *21*, 3213-3224
11. Goyal, B., Goyal, D. *ACS Comb Sci* **2020**, *22*, 297-305
12. Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., *et al.* *Science* **2020**, *368*, 409-412
13. Jin, Z., Du, X., Xu, Y., *et al.* *Nature* **2020**, *582*, 289-293
14. Dai, W., Zhang, B., Su, H., *et al.* *Science* **2020**, *368*, 1331-1335
15. Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., *et al.* *Nat Struct Mol Biol* **2020**, *27*, 529-532
16. Lauria, A., Mannino, S., Gentile, C., Mannino, G., Martorana, A., Peri, D. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 1562-1569
17. Pibiri, I., Palumbo Piccionello, A., Calabrese, A., Buscemi, S., Vivona, N, Pace, A. *Eur J Org Chem* **2010**, 4549-4553
18. Buscemi, S., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Pibiri, I., Vivona, N. *Heterocycles* **2004**, *63*, 1619-1628
19. Buscemi, S., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., Vivona N. *J Fluo Chem* **2006**, *127*, 1601-1605
20. Palumbo Piccionello, A., Pace, A., Pibiri, I, Buscemi, S, Vivona, N. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8792-8797
21. Martorana, A., Palumbo Piccionello, A., Buscemi, S., Giorgi, G., Pace, A. *Org Biomol Chem* **2011**, *9*, 491-496

Curriculum Vitae

Paola Marzullo

INFORMAZIONI PERSONALI

Luogo e data di nascita: Palermo, 07/01/1992

Indirizzo: Piazza Europa 22, 90020 Castellana Sicula, Palermo, Italia

e-mail: paola.marzullo@unipa.it; paola.marzullo7@gmail.com

Recapiti telefonici: +393392227043; +390921642144

FORMAZIONE

- Novembre 2017 – Dicembre 2021

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari (33° ciclo)

Università degli Studi di Palermo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

Titolo del progetto: *1,2,4-ossadiazoli: utili scaffold nel design di nuovi farmaci*

Tutor: Prof. Antonio Palumbo Piccionello (Università degli Studi di Palermo)

Co-tutor: Prof.ssa Sonya Vasto (Università degli Studi di Palermo)

- Settembre 2019 – Marzo 2020

PhD Visiting Student - University of Texas of Medical Branch

Mitchell Center for Neurodegenerative Diseases - Galveston (TX)

Progetto: Valutazione dell'attività biologica di potenziali modulatori delle Heat Shock Proteins

Mentor: Dr. Rakez Kayed

- Dicembre 2017

Abilitazione alla professione dell'esercizio di Farmacista

Università degli Studi di Palermo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

- 19/07/2017

Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche. Voto:110/110 e lode - Università degli Studi di Palermo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

- Luglio 2016 – Luglio 2017

Tesi sperimentale - Università degli Studi di Palermo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

Tutor: Prof. Antonio Palumbo Piccionello (Università degli Studi di Palermo)

Co-tutor: Prof.ssa Sonya Vasto (Università degli Studi di Palermo)

- 05/07/2011

Maturità Scientifica

Liceo Scientifico G. Salerno – Gangi (PA) – Italia

ESPERIENZA PROFESSIONALE

- Aprile 2016 – Gennaio 2017

Tirocinio Pratico-Professionale

Farmacia Dott.re Restivo – Castellana Sicula (PA) – Italia

- Novembre 2017- Novembre 2020

Supervisione agli studenti dei corsi di laurea in Farmacia e Chimica e Tecnologia Farmaceutiche durante l'attività di tesi sperimentale

Università degli Studi di Palermo

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

COMPETENZE TECNICHE E PROFESSIONALI

- Buona padronanza nella pianificazione dell'attività di ricerca e nella gestione di spazi e risorse del laboratorio

Competenze acquisite durante il periodo di tesi sperimentale e di dottorato:

- Sintesi chimica di molecole organiche

- Isolamento dei composti di interesse (Estrazione, Cromatografia, Cristallizzazione)
- Caratterizzazione di composti organici (Punto di fusione, UV, Spettrofluorimetria, IR, ^1H e ^{13}C NMR, GC-MS)
- Utilizzo della strumentazione HPLC-UV-MS (Agilent Technologies) a scopi analitici e preparativi

Competenze acquisite durante l'esperienza estera presso il Dipartimento di Neurologia dell'University of Texas Medical Branch (Galveston):

- Colture cellulari e saggi di vitalità cellulare (MTS, LDH, PrestoBlue assay)
- Applicazione delle principali tecniche di biologia molecolare: BCA assay, Elettroforesi su gel di poliacrilammide, Western Blotting, Odyssey (Imaging system for Western Blotting), ELISA
- Saggi di inibizione enzimatica in vitro
- Utilizzo di lettori di piastra BioTeK per assorbanza, fluorescenza o luminescenza
- Utilizzo del microscopio ottico a fluorescenza (Kayence BZ-800) per i saggi di immunofluorescenza e PLA (Proximity Ligation Assay)

PUBBLICAZIONI

- **Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting**
C. Campanella, A. Pace, C.C. Bavisotto, **P. Marzullo**, A. Marino Gammazza, S. Buscemi, A. Palumbo Piccionello. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, 2603
- **Hsp60 inhibitors and modulators**
A. Palumbo Piccionello, **P. Marzullo**, S. Buscemi, A. Pace. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*, **2019**, 18, 27-39
- **Recent advances on 1,2,4-oxadiazoles: from synthesis to reactivity and pharmaceuticals application**
P. Marzullo, A. Pace, I. Pibiri, A. Palumbo Piccionello, S. Buscemi. *Target in Heterocyclic System*. (ASAP article - doi: <http://dx.medra.org/10.17374/targets.2021.24.376>)
- **Curcumin as scaffold in drug discovery for neurodegenerative diseases**
F. Lo Cascio, **P. Marzullo**, R. Kayed, A. Palumbo Piccionello. *Biomedicines*, **2021**, 9, 173

- **What's Curcumin's Mind? The potential role of Curcuminoids in the treatment of Alzheimer's disease**

P. Marzullo, S. Buscemi. *EuroMediterranean Biomedical Journal*, **2021**, 16, 1-4

- **Dimer-monomer equilibrium of SARS-CoV2 main protease as affected by small molecule inhibitors: a biophysical investigation**

L. Silvestrini, N. Belhaj, L. Comez, Y. Gerelli, A. Lauria, V. Libera, P. Mariani, **P. Marzullo**, M.G. Ortore, A. Palumbo Piccionello, C. Petrillo, L. Savini, A. Paciaroni, F. Spinozzi. *Scientific Report* (Under Review)

In progress:

- **Synthesis and biological evaluation of quinazolin-4-ones and (di)-acylguanidines obtained from reduction of 1,2,4-oxadiazoles**

P. Marzullo, M. Di Carlo, S. Vasto, A. Palumbo Piccionello

- **Synthesis and biological evaluation of new modulators of Hsp60 and Hsp70 activity**

P. Marzullo, F. Lo Cascio, M. Montalbano, R. Kayed, A. Palumbo Piccionello

POSTER E COMUNICAZIONI A CONGRESSO:

- **P. Marzullo**, L. Cristaldi, A. Pace, M. Di Carlo, S. Buscemi, S. Vasto, A. Palumbo Piccionello. Synthesis and biological evaluation of quinazolin-4-ones from reduction of 1,2,4-oxadiazoles. Meeting MedChemSicily 2018, Palermo 17-20 Luglio
- A. Palumbo Piccionello, F. Lo Cascio, **P. Marzullo**, S. Buscemi, A. Pace, R. Kayed. Synthesis and Evaluation of Curcumin-like derivatives able to modulate Tau Oligomers toxicity. Meeting MedChem Sicily 2018, Palermo 17-20 Luglio

- A. Palumbo Piccionello, F. Lo Cascio, **P. Marzullo**, S. Buscemi, A. Pace, R. Kayed. Novel Curcumin like derivatives can modulate toxic Tau Oligomers. XXXVIII Convegno nazionale della Divisione di Chimica Organica della SCI, Milano 9-13 Settembre 2018
- A. Palumbo Piccionello, **P. Marzullo**, S. Buscemi, S. Vasto, M. Di Carlo. Synthesis of quinalzolin-4-ones with potential anti-diabetic activity, through reductive rearrangement of 1,2,4-oxadiazoles. East West Chemistry Conference, Palermo 13-15 Novembre 2019