



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE
Indirizzo Scienze Farmaceutiche
XXV Ciclo

**Sintesi e studi SAR di nuove piattaforme tricicliche a struttura
pirazolo-isochinolinica e pirazolo-naftiridinica come inibitori
dell'enzima fosfodiesterasi 10A (PDE10A)**

Dottorando:
Dott. Antonio Dore

Direttore della Scuola:
Prof. Stefano Enzo

Supervisore:
Dott.ssa Battistina Asproni

Triennio Accademico 2010-2012

Sommario

CAPITOLO 1	3
Trasduzione del segnale.....	4
Fosfodiesterasi	7
Struttura delle fosfodiesterasi.....	9
Fosfodiesterasi 10A (PDE10A).....	13
Ruolo fisiologico della PDE10A.....	15
Inibitori della PDE10A e progettazione delle molecole oggetto della tesi	19
CAPITOLO 2	26
Analisi Retrosintetica	27
Sintesi del sistema pirazolo[5,1- <i>a</i>]isochinolinico A.....	28
Sintesi dei sistemi pirazolo[5,1- <i>f</i>][1,6]naftiridina B e pirazolo[5,1- <i>a</i>][2,6]naftiridina C.	30
Ottimizzazione della sintesi del nucleo base pirazolo[1,5- <i>a</i>]piridinico	31
Sintesi dei prodotti Aa-1, Aa-2, Ba-1, Ba-2, Bb-1, Bb-2, Da-1, Da-2.....	37
Ottimizzazione sintesi di derivati della piattaforma B.....	39
Strategia di sintesi percorsa per l'ottenimento delle piattaforme C ed E.....	41
CAPITOLO 3	42
Risultati Biologici	43
Studio di Docking molecolare	45
Scelta del modello cristallografico e protocollo di docking utilizzato	47
Conclusioni	52
CAPITOLO 4	53
Procedure generali.....	54
Materiali e Metodi per il saggio di inibizione enzimatica.....	156
Materiali e Metodi impiegati nel docking	157
BIBLIOGRAFIA	160

CAPITOLO 1

Trasduzione del segnale e ruolo delle Fosfodiesterasi

Trasduzione del segnale

Quando un ligando extracellulare interagisce e attiva un recettore posto sulla superficie di una cellula determina in essa una specifica risposta intracellulare. Questo processo viene designato come *trasduzione del segnale*.

Ormoni e neurotrasmettitori sono considerati primi messaggeri e, ad eccezione degli ormoni steroidei, molti di questi non possono, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, permeare la membrana cellulare e pertanto generano un segnale nella cellula bersaglio mediante vie di trasduzione che coinvolgono specifici recettori di membrana e tramite questi possono indurre una risposta intracellulare che può coinvolgere diversi distretti come ad esempio il nucleo. La trasduzione del segnale si traduce in un aumento della concentrazione citoplasmatica di secondi messaggeri intracellulari.¹

Il primo secondo messaggero, identificato da *Sutherland* e *Rall* già nel 1956 mentre studiavano l'effetto dell'adrenalina sulla glicogeno-fosforilasi,² è stato l'*adenosina 3',5'-monofosfato ciclico* (*AMP ciclico* o *cAMP*, **Fig. 1**) e risulta uno dei secondi messaggeri più studiati.

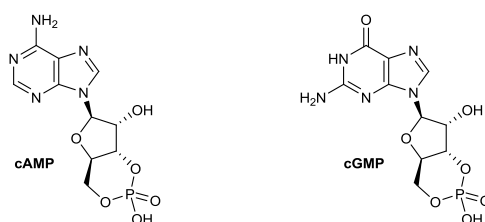


Figura 1. Nucleotidi ciclici cAMP e cGMP.

I livelli intracellulari di cAMP sono strettamente regolati a livello della sua sintesi e della sua degradazione attuate rispettivamente da due enzimi: l'enzima di membrana *Adenilato Ciclasi* (*AC*) e le fosfodiesterasi dei nucleotidi ciclici (*PDE*). Entrambi questi enzimi sono codificati da un gran numero di geni che differiscono per espressione e meccanismo di regolazione. La cascata del cAMP è causata dall'attivazione dell'*AC* tramite le proteine G. Nei mammiferi esistono nove forme di *AC*,³ e sono modulate dalla subunità $\beta\gamma$ di due tipologie di proteine G: G_s per la stimolazione e G_i per l'inibizione.

Quando uno specifico ligando interagisce e stimola un recettore accoppiato a proteine G (*G-protein coupled receptor* o *GPCR*) induce a livello della subunità α lo scambio GDP/GTP e il suo distacco dal complesso $\beta\gamma$,⁴ di conseguenza va ad agire sull'*AC* che catalizza la conversione di una molecola di ATP in cAMP e quindi un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. Il cAMP può quindi attivare diverse proteine come la *proteina chinasi cAMP-dipendente* (*PKA*), i canali ionici nucleotidi ciclici-dipendenti (*CNGs*, **Fig. 2**) e le proteine di scambio attivate dal cAMP (*EPAC*), l'attivazione

di quest'ultime regola anche le *MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*). La PKA, attraverso la diretta fosforilazione di vari fattori come *CREB* (*cAMP-responsive element-binding protein*) e *CREM* (*cAMP-response element modulator*), modula anche l'espressione genica.

Un altro importante secondo messaggero è il nucleotidico *guanosina 3',5'-monofosfato ciclico* o *cGMP* (**Fig. 1**) isolato nel 1963 da Ashman e Pride come prodotto naturale nelle urine di ratto.⁵ È sintetizzato dall'enzima *Guanilato Ciclasi* (*GC*) a partire dal GTP. Esistono due tipologie di questo enzima, la prima, localizzata nel citosol (*sGC*, **Fig. 2**), attivata dall'*ossido nitrico* (*NO*) e la seconda, ancorata sul versante interno del plasmalemma (*pGC*), attivata dai peptidi natriuretici (*ANP*), dalle guaniline e dall'enterotossina *Escherichia coli* termostabile.⁶

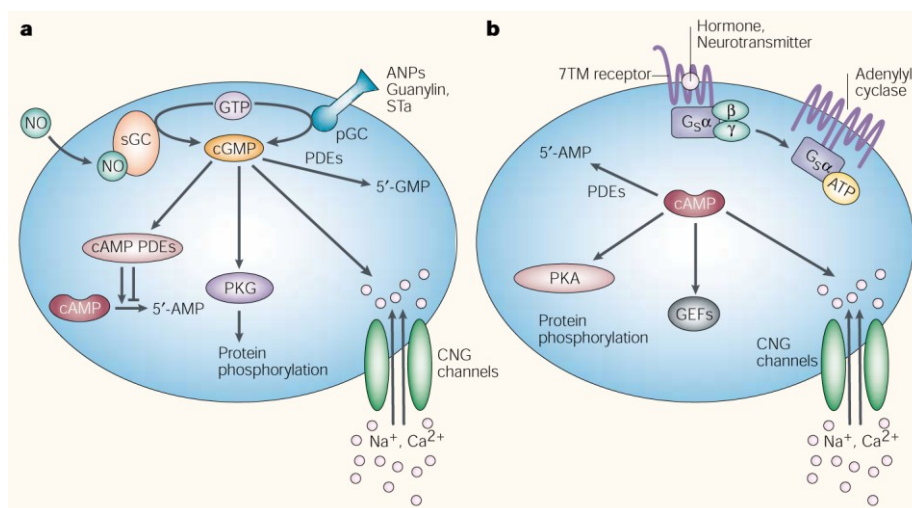


Figura 2. Sintesi e regolazione dei secondi messaggeri cGMP (a) e cAMP (b).⁷

La generazione di cGMP porta all'attivazione di una serie di proteine cGMP-dipendenti, tra cui chinasi, fosfodiesterasi e alcuni canali di membrana. La stimolazione delle *proteinchinasi cGMP-dipendenti* (*G chinasi* o *PKG*) è importante nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} ; la G chinasi, infatti, riduce l'attività delle fosfolipasi C_β e C_γ , fosforila e quindi inattiva il recettore per l' IP_3 , inibisce l'ingresso di Ca^{2+} e stimola l'estruzione del catione dal citosol attivando lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} e le Ca^{2+} -ATPasi del reticolo e della membrana plasmatica; il suo ruolo quindi è quello di modulare negativamente la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} .

Il cGMP agisce anche in modo non mediato da G chinasi; esso infatti stimola o riduce direttamente l'attività idrolitica di alcune PDE, attive sia nell'idrolizzare il cGMP stesso che il cAMP, a livello di una regione chiamata *GAF* (*cGMP-specific and -stimulated PDEs*, *Anabaena adenyl cyclases*, *Escherichiacoli transcription factor FhlA*).⁸

I nucleotidi ciclici cAMP e cGMP rappresentano i principali secondi messaggeri

intracellulari aventi un ruolo chiave in diverse risposte cellulari mediate da vari ormoni e neurotrasmettitori.⁹ Di conseguenza le loro concentrazioni citoplasmatiche sono modulate a livello della loro sintesi e della loro degradazione da parte delle PDE che hanno la funzione di spegnere il segnale generato dai nucleotidi ciclici. Questa regolazione influisce su una miriade di processi fondamentali quali la trascrizione, la proliferazione, l'apprendimento e la memoria, la risposta visiva e l'apoptosi.¹⁰

Fosfodiesterasi

Le fosfodiesterasi sono enzimi in grado di idrolizzare un legame fosfodiesterico di una molecola recante un gruppo fosfato. A livello dei nucleotidi ciclici cAMP e cGMP agisce una tipologia di fosfodiesterasi, indicata con la sigla PDE, queste catalizzano la conversione dei secondi messaggeri nei corrispettivi aciclici AMP e GMP idrolizzando il legame tra l'ossidrilico in 3' e il gruppo fosfato in 5'. Le PDE sono indicate anche come enzimi ione metallico-dipendenti. Si può dedurre, quindi, che le fosfodiesterasi giochino un ruolo chiave nelle dinamiche spazio-temporali di cAMP e cGMP. Inoltre, la presenza di domini GAF conferisce loro la proprietà di effettori del cGMP.

Le PDE appartengono a una superfamiglia di enzimi; sono state identificate e clonate 11 famiglie con oltre 50 isoforme espresse da 21 differenti geni, alcune di queste isoforme sono state isolate dal cervello dei ratti già nei primi anni '70.^{11,12} Alcune PDE idrolizzano selettivamente il cAMP (PDE4, 7 e 8), altre solo il cGMP (PDE5, 6 e 9), infine vi sono fosfodiesterasi che agiscono su entrambi i nucleotidi ciclici (PDE1, 2, 3, 10 e 11) come indicato in **Fig. 3**.

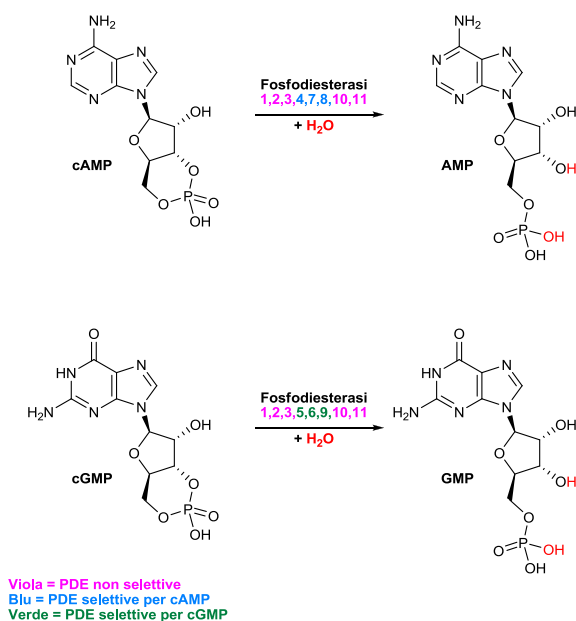


Figura 3. Idrolisi di cAMP e cGMP mediata dalle PDE che conduce rispettivamente ad AMP e GMP. Modificata da *Chappie et al.* 2012.¹³

Negli anni '90 Beavo fu tra i primi ricercatori a stabilire una nomenclatura ufficiale per le PDE vista l'enorme mole di dati a riguardo.¹⁴ Per esempio se si prende la sigla "HSPDE4B2B": le prime due lettere indicano la specie, HS sta per *Homo sapiens*. Le tre lettere successive assieme a uno o due numeri indicano la famiglia della PDE. La successiva lettera indica il gene individuale appartenente a quella determinata famiglia. Infine l'ultimo numero arabo rappresenta la *splice variant* e la lettera finale consente alla *GenBank* di assegnare un unico riferimento per voci che abbiano sequenze in conflitto o

incomplete basandosi sul momento in cui il dato è stato inserito.¹⁵ Le PDE sono state classificate in base alla loro sequenza amminoacidica, specificità di substrato, cinetica enzimatica, proprietà regolatorie e distribuzione nei tessuti (vedi **Tab. 1**).

Fosfodiesterasi	Cromosoma	Substrato	Modulatore di attività	Inibitori rappresentativi	Distribuzione prevalente nel SNC	Potenziati indicazioni in patologie del SNC
PDE1						
PDE1A	2q32.1	cGMP > cAMP	Ca ²⁺ /calmodulina	Vinpocetina e IC224	Corteccia e ippocampo	—
PDE1B	12q13	cGMP > cAMP	Ca ²⁺ /calmodulina	Vinpocetina e IC224	Striato e ippocampo	ADHD* e Morbo di Parkinson (PD)
PDE1C	7p15.1-p14.3	cGMP = cAMP	Ca ²⁺ /calmodulina	Vinpocetina e IC224	Neuroepitelio olfattivo	—
PDE2						
PDE2A	11q13.1-q14.1	cAMP e cGMP	Stimolata dalla cGMP	EHNA**e BAY 60-7550	Ippocampo, corteccia e	Cognizione e neurodegenerazione
PDE3						
PDE3A, PDE3B	12p12.2, 11p15.2	cAMP > cGMP	Inibita dalla cGMP	Milrinone e cilostamide	Striato e ippocampo	—
PDE4						
PDE4A	19p13.2	cAMP	Fosforilazione	Rolipram	Corteccia e ippocampo	Cognizione, psicosi, depressione e neurodegenerazione
PDE4B	1p31	cAMP	Fosforilazione	Rolipram	Corteccia e ippocampo	Cognizione, psicosi, depressione e neurodegenerazione
PDE4C	19p13.11	cAMP	Fosforilazione	Rolipram	Nessuna	—
PDE4D	5q12	cAMP	Fosforilazione	Rolipram	Striato, corteccia, ippocampo e	Cognizione, psicosi, depressione e neurodegenerazione
PDE5						
PDE5A	4q27	cGMP	cGMP / fosforilazione	Sildenafil, vardenafil e tadalafil	Midollo spinale e cervelletto	Cognizione e depressione
PDE6						
PDE6A, PDE6B, PDE6C	5q31.2-q34, 4p16.3, 10q24	cGMP	cGMP	—	Retina	Degenerazione della retina
PDE7						
PDE7A	8q13	cAMP	—	—	Ippocampo	—
PDE7B	6q23-q24	cAMP	—	—	Striato, ippocampo e	PD e psicosi
PDE8						
PDE8A	15q25.3	cAMP	—	—	Corteccia	Morbo di Alzheimer
PDE8B	5q14.1	cAMP	—	—	Striato e	—
PDE9						
PDE9A	21q22.3	cGMP	—	BAY 73-6691	Diffuso in tutto il	Cognizione e neurodegenerazione
PDE10						
PDE10A	6q26	cGMP/cAMP	cAMP / fosforilazione	Papaverina e PQ-10	Striato	Schizofrenia, Corea di Huntington e PD
PDE11						
PDE11A	2q31.3	cAMP/cGMP	cGMP	Tadalafil	—	—

* ADHD. Deficit di attenzione con disordine iperattivo. ** EHNA, eritro-9-(2-idrossi-3-nonil)-adenina.

Tabella 1. Elenco delle classi delle PDE e loro distribuzione a livello del SNC. Modificata da *Menniti et al.* 2006.¹⁶

Struttura delle fosfodiesterasi

Le fosfodiesterasi sono costituite tipicamente da tre domini funzionali: le due porzioni *N*- e *C*-terminale possiedono siti con funzione regolatoria dell'enzima, il dominio centrale invece è rappresentato dal sito catalitico costituito da un arrangiamento compatto di circa 16 α -eliche (verde chiaro in **Fig. 4**).

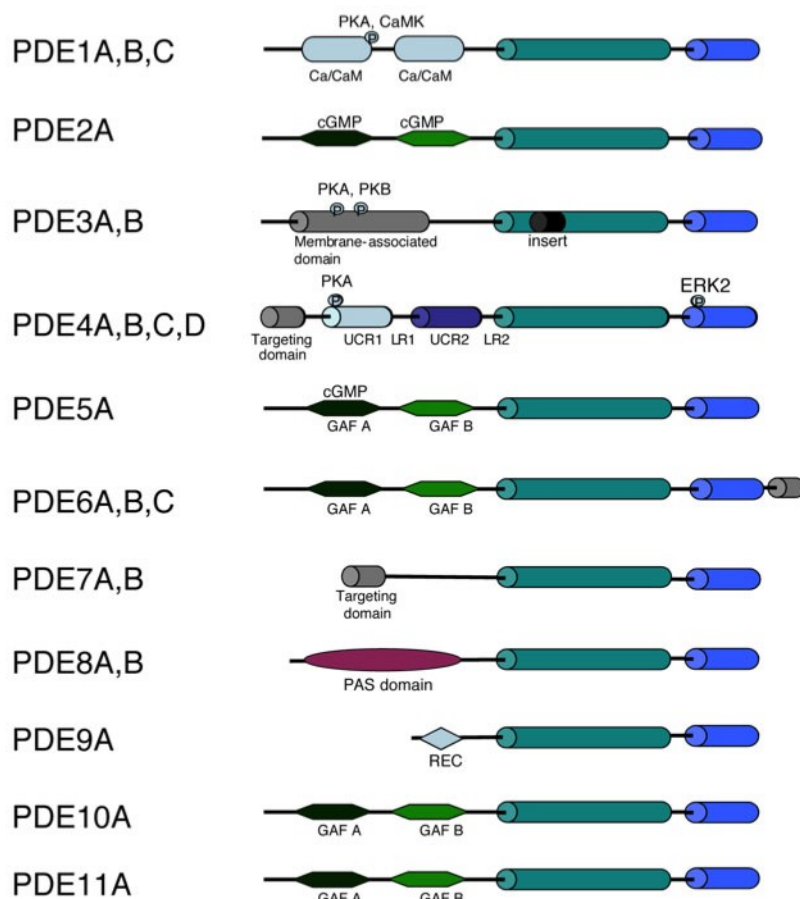


Figura 4. Strutture delle differenti famiglie di PDE. $^{15}Ca/CaM$ (dominio Calcio/Calmodulina), *UCR* (Upstream Conserved Region), *PAS* (Period clock protein, Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation, Single-minded protein), *REC* (response regulator receiver).

Diverse PDE appartenenti alla stessa famiglia possono mostrare una notevole divergenza della sequenza amminoacidica, ma rimangono funzionalmente correlate.¹⁷ Le porzioni *N*-terminale delle PDE includono sequenze conservate all'interno di una stessa famiglia e corrispondono a presunte o accertate caratteristiche funzionali. Tra queste sequenze sono inclusi siti di interazione proteina-proteina, siti di fosforilazione per chinasi, siti di legame allosterici per piccole molecole (come il dominio GAF), oppure siti implicati nel processo di localizzazione subcellulare delle PDE. Sono pochi invece gli studi che hanno esplorato i domini conservati nella porzione *C*-terminale ed è stato suggerito che in questa regione possono essere presenti siti di dimerizzazione e altri siti di regolazione come i siti di fosforilazione per le chinasi.¹⁸ I domini catalitici sono costituiti da circa 270 amminoacidi e mostrano un'alta omologia nelle varie famiglie con

una percentuale d'identità di sequenza amminoacidica che varia dal 35% a più del 50%. Studi finalizzati all'individuazione delle strutture di varie isoforme enzimatiche hanno rilevato nel sito catalitico la conservazione di 11 amminoacidi comuni. Per chiarezza nella **Fig. 5** è mostrata la sovrapposizione del complesso di AMP/GMP con 19 differenti isoforme di PDE che evidenzia la presenza invariata di detti amminoacidi.

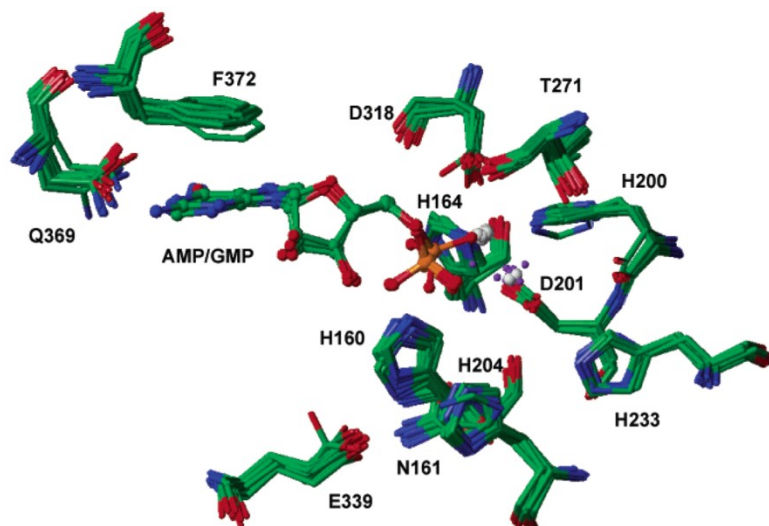


Figura 5. Sovrapposizione del sito catalitico di 19 differenti PDE che dimostra la presenza invariata di 11 amminoacidi. Inoltre è mostrata la locazione dei prodotti AMP e GMP e il loro orientamento. Il residuo di glutammina (Q369) interagisce tramite ponti idrogeno con i sostituenti dell'anello pirimidinico del nucleotide mentre il residuo di fenilalanina (F372) crea interazioni idrofobiche π - π con l'anello aromatico dei prodotti. Modificata da *Manallack et al.* 2005.⁹

Il sito attivo delle PDE si può suddividere in quattro regioni: un sito del metallo (M), una tasca centrale o *corepocket* (Q), una tasca idrofobica piatta o *P-clamp* (H) e infine una regione *lid* (L).

Nel *sito M* sono presenti due siti di legame per due ioni metallici: il *sito 1* lega selettivamente uno ione Zn^{2+} (**Metal 1** in **Fig. 6**), fondamentale per l'attività dell'enzima,¹⁹ mentre il *sito 2* lega preferenzialmente uno ione Mg^{2+} o Mn^{2+} (**Metal 2**). Nel *sito 1* due residui di aspartato (**D318** e **D201**), due istidine (**H164** e **H200**) e due molecole d'acqua fanno parte della sfera di coordinazione ottaedrica dello ione Zn^{2+} , il residuo **D201** e una molecola d'acqua coordinano entrambi i metalli. Nel *sito 2* il

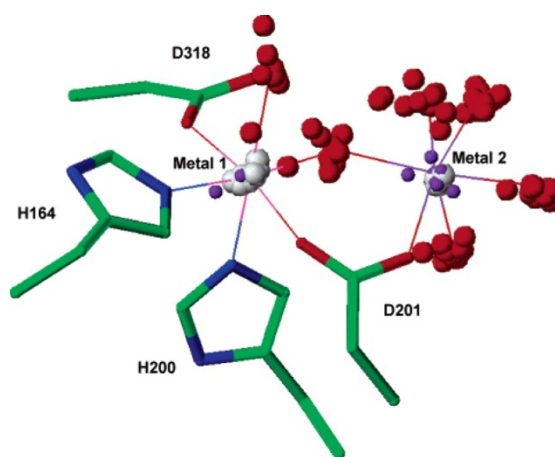


Figura 6. L'immagine mostra il cluster di molecole d'acqua attorno ai due ioni metallici, comuni nelle PDE, nel sito attivo. I residui di istidina (H) e aspartato (D) mostrati derivano dal *PDB1PTW* e rappresentano gli amminoacidi conservati in tutte le PDE che interagiscono con i due ioni metallici. Modificata da *Manallack et al.* 2005.⁹

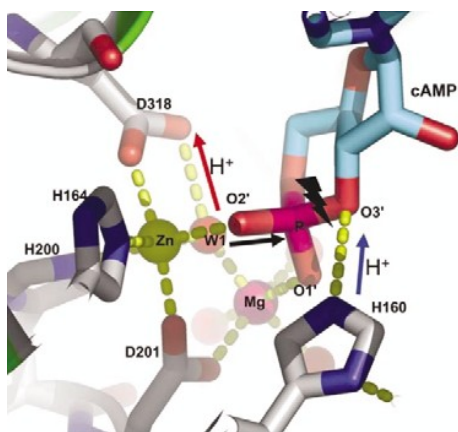


Figura 7. Meccanismo di idrolisi del nucleotide ciclico cAMP legato alla PDE4D. Modificata da Houslay et al. 2005.²¹

secondo ione metallico è coordinato quindi dall'aspartato **D201** e da 5 molecole d'acqua.²⁰ I residui di questo sito sono altamente conservati in tutte le PDE. In questa regione si instaurano legami fra i due ioni metallici e il gruppo fosfato del substrato.

Il meccanismo di idrolisi di un nucleotide ciclico nella PDE4D è mostrato nella **Fig 7**. Il residuo di aspartato **D318** deprotona l'acqua **W1** condivisa tra i due ioni metallici per generare uno ione idrossido che attacca il gruppo fosfato, mentre il residuo di istidina **H160** protona l'ossigeno **O3'** dello zucchero attivandolo come gruppo uscente.²¹ Il ruolo dei due ioni metallici è quello di attivare e stabilizzare la struttura di uno ione idrossido necessario per l'idrolisi del legame fosfodiesterico.

La tasca *Q* è rivestita da alcuni amminoacidi altamente conservati quali glutammina (**Q369** in **Fig. 5**), fenilalanina (**F372**), valina e tirosina, e ha la funzione di ospitare l'anello purinico del nucleotide. A questo livello il gruppo ammidico della glutammina forma un legame a idrogeno bidentato con i sostituenti dell'anello purinico: nel cAMP l' N_1 dell'adenina lega il gruppo NH_2 ammidico della glutammina e l'ammino-gruppo in 6 interagisce con l'ossigeno carbonilico del residuo; nel cGMP il gruppo N_1H e il carbonile in C6 interagiscono con il carbonile e l'ammino-gruppo glutammिनico rispettivamente. La capacità del gruppo ammidico della glutammina di comportarsi contemporaneamente come donatore e accettore di legami idrogeno conferisce al residuo un ruolo chiave nella discriminazione di cAMP e cGMP (**Fig. 8**).

La tasca idrofobica piatta *H* è chiamata anche *P-clamp* perché sono presenti due residui di fenilalanina sopra e sotto il piano dell'anello purinico che lo ancorano come una "morsa" con interazioni idrofobiche π - π di tipo *face-to-face* sopra e *edge-to-face* sotto.

La regione *L* funge da "coperchio" restringendo l'ingresso al sito attivo. Quest'ultima regione sembra essere una caratteristica strutturale unica della PDE5.²⁰

Come mostrato in precedenza, alcune PDE presentano una specificità di substrato. Questa proprietà è dovuta alla conservazione di un residuo di glutammina nel sito catalitico, determinante per la selettività è l'orientamento del suo gruppo ammidico.²² Difatti, come rappresentato in **Fig. 8**, la disposizione spaziale del gruppo

ammidico è influenzata, nelle varie isoforme, dall'intorno chimico, in particolare da una complessa rete di ponti a idrogeno, i quali si instaurano con i vari residui amminoacidici che descrivono la tasca enzimatica e che indirettamente conferiscono la sua selettività. È semplice intuire che la mancanza di queste interazioni con la glutammina (Q369, Q817 e Q421 in Fig. 8A, B, e C-D) conducono alla libera rotazione del suo gruppo ammidico, indicata come *switch della glutammina*, e conduce alla perdita di selettività adattandosi quindi ad ogni substrato nucleotidico ciclico.

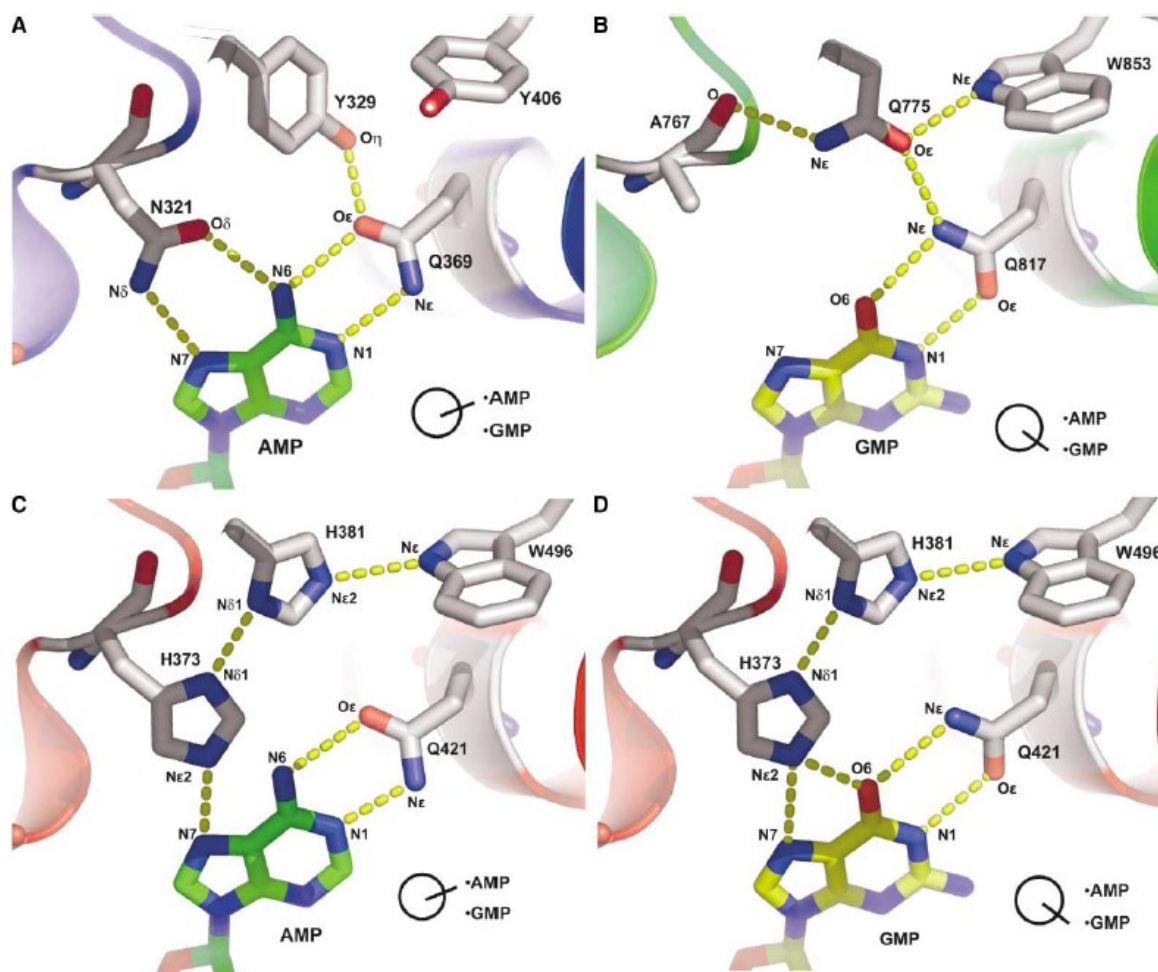


Figura 8. Rappresentazione delle interazioni presenti nel sito catalitico tra i residui che conferiscono una diversa libertà di rotazione della glutammina (Q), conferendo una perdita (PDE1B, in C e D) o una marcata selettività (PDE4D in A e PDE5A in B) per il cAMP e il cGMP.²²

Fosfodiesterasi 10A (PDE10A)

La PDE10A è un'isoforma a doppia specificità poiché catalizza l'idrolisi di cAMP e cGMP. Soltanto recentemente è stata clonata e caratterizzata, durante lo stesso periodo, da tre gruppi differenti.^{23,24,25}

La PDE10A ha mostrato valori di K_m di 0.26 e 7.6 μ M rispettivamente per cAMP e cGMP, e una V_{max} per l'idrolisi del cGMP circa il doppio rispetto al cAMP. Inoltre cAMP e cGMP inibiscono reciprocamente la loro idrolisi con valori di IC_{50} di 0.39 e 14 μ M rispettivamente, questo indica perciò che l'idrolisi del cGMP è potentemente inibita dal cAMP. Di conseguenza la PDE10A può essere definita come una cAMP-PDE e una cGMP-PDE inibita dal cAMP.

La PDE10A è codificata da un unico gene (nell'uomo è localizzato nel cromosoma 6q26-27)²⁴ ma sono state isolate 18 *splicevariants* (PDE10A1-18)²⁶ che differiscono nella regione *N*-terminale e variano nelle varie specie mammifere, tra queste la PDE10A2 è conservata nell'uomo, nel topo e nel ratto. La sequenza amminoacidica è costituita da 779 amminoacidi (circa 88kDa).

Nella regione *N*-terminale sono presenti siti di fosforilazione e i due domini allosterici GAF-A e GAF-B (vedi **Fig. 9**) per il legame con i nucleotidi ciclici, attivi anche nella regolazione dell'attività catalitica della PDE. In contrasto con le altre famiglie di fosfodiesterasi, il dominio GAF-A apparentemente lega solo il cAMP,²⁷ al contrario sembrerebbe che non intervenga nell'attivazione della PDE10A tramite il dominio GAF-B.

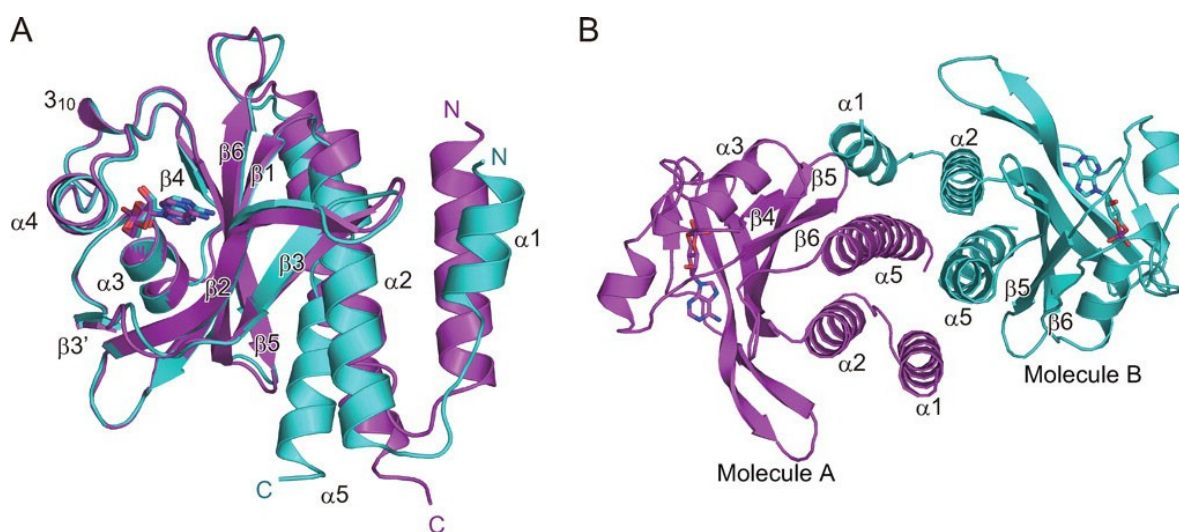


Figura 9.A. Visualizzazione *ribbon* di una sovrapposizione di due domini GAF-B di due molecole di PDE10A complessate con il loro ligando cAMP presenti in un'unità cristallografica asimmetrica. La molecola A e la molecola B sono colorate rispettivamente in magenta e ciano, le due molecole di cAMP sono rappresentate in *stick models* con ossigeno, azoto e fosforo colorati in rosso, blu e viola. **B.** Visualizzazione dell'interazione delle molecole A e B. Modificata da *Handa et al.* 2008.²⁸

Nella zona C-terminale si trova il dominio catalitico che mostra un'omologia di sequenza con le altre PDE tra il 16 e il 47%. Analisi cristallografiche dell'enzima co-cristallizzato con diversi ligandi, come il prodotto endogeno AMP e numerosi inibitori noti, hanno consentito a *Chappie et al.* di generare una mappa riguardante i siti utili come possibili target per la progettazione di nuovi inibitori della PDE10A (**Fig. 10**).¹³

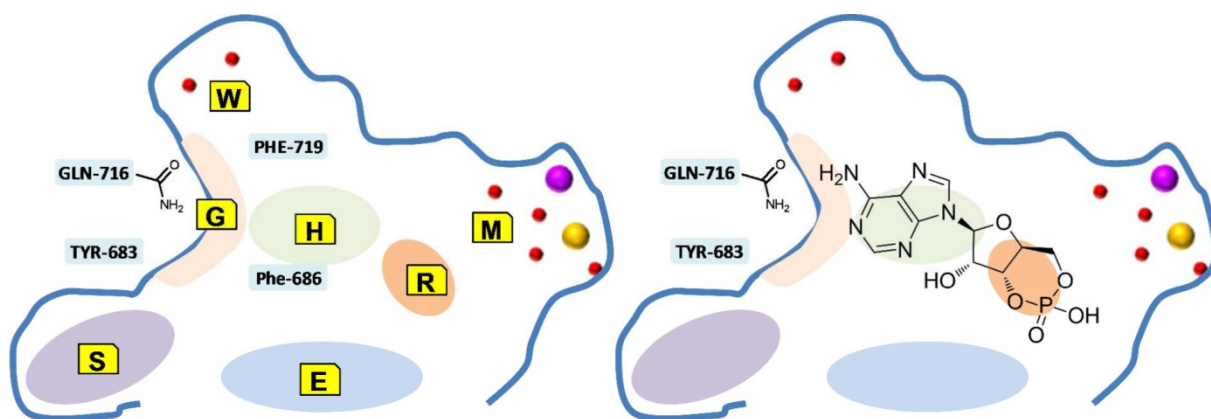


Figura 10. A sinistra è mostrata la rappresentazione bidimensionale del sito catalitico con evidenziate le regioni importanti per l'inibizione della PDE10A. Le lettere sono definite di seguito: **G** (interazione con la glutammina), **S** (tasca di selettività), **H** ("pinza" idrofobica o *P-clamp*), **W** (molecole residue di acqua), **M** (sito del metallo), **R** (regione del ribosio), **E** (regione esterna di legame). A destra è rappresentata la posizione del substrato endogeno cAMP nel sito catalitico della PDE10A.¹³

Tra le varie *splicevariants*, la PDE10A2, la principale isoforma espressa nello striato, è associata alla membrana mentre la variante PDEA10A1 è presente nel citosol. La PDE10A2 possiede un sito di fosforilazione nella regione N-terminale in cui la PKA agisce a livello della **Thr16** inducendo la traslocazione dalla membrana al citosol in modo da modulare il segnale cAMP/PKA riducendo la concentrazione di cAMP quando questa è elevata. In presenza di bassi livelli intracellulari di cAMP, lo stesso enzima è palmitoilato nella **Cys11** per l'ancoraggio alla membrana e il suo trasferimento negli assoni o dendriti in modo da regolare il segnale dei neurotrasmettitori.^{29,30} Altre varianti di splicing sono state identificate nell'ippocampo e si pensa che svolgano un ruolo critico nel *LTP* (*long-term potentiation*) e processi cellulari associati all'apprendimento e alla memoria.³¹

Ruolo fisiologico della PDE10A

L'elevato numero di varianti di PDE espresse in distinte aree del *SNC* suggerisce il loro contributo specifico nelle funzioni dei neuroni serotonergici, dopaminergici e glutammatergici che risultano rispettivamente alterate nella *depressione*, nella *schizofrenia* e nella *Corea di Huntington (HD)*.

Rispetto a tutte le altre famiglie di PDE, la PDE10A presenta una distribuzione molto più ristretta. Difatti l'mRNA della PDE10A è altamente espresso nel cervello e in misura minore nei testicoli.³² In particolare a livello cerebrale, si ha una sua sovraespressione a livello striatale principalmente nei neuroni gabaergici spinosi di medie dimensioni (*Medium-sized Spiny Neurons* o *MSNs*) appartenenti alla *via diretta* e *indiretta*, che comprendono il 90% della popolazione neuronale.³³ L'enzima è distribuito all'interno dei *MSNs* in tutto il corpo cellulare, dendriti e assoni, mentre non è espresso a livello degli interneuroni.^{34,35}

Lo striato è costituito dal nucleo caudato e dal putamen e rappresenta il centro di elaborazione dei gangli della base. Oltre al suo ruolo nella regolazione della funzione motoria è coinvolto nei processi cognitivi di ordine superiore a causa delle sue connessioni con le aree corticali.³⁶

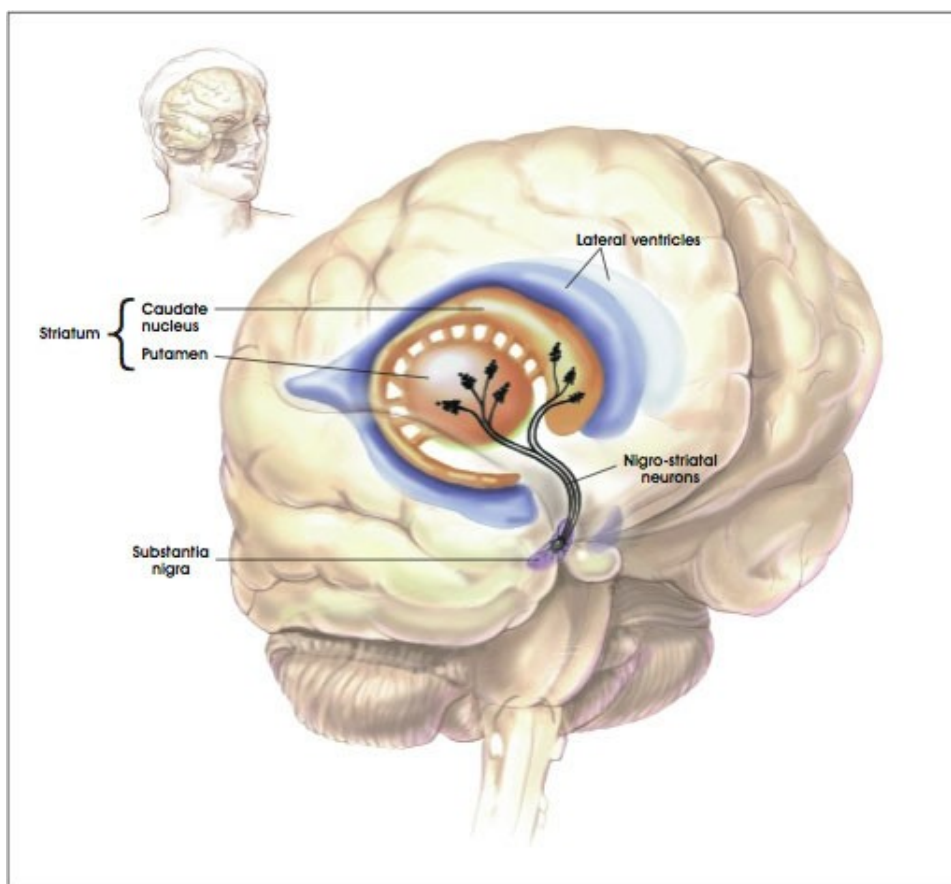


Figura 11. Localizzazione del corpo striato nel SNC.

La dopamina ha un ruolo critico nella regolazione delle funzioni psicomotorie³⁷ ed agisce tramite due tipi di GPCRs: D₁-like (D₁ e D₅) e D₂-like (D₂, D₃, D₄) che stimolano o inibiscono rispettivamente l'attività dell'AC. Nello striato, l'espressione di questi due recettori è confinata nei due tipi di MSNs, essendo i D₁ localizzati nei neuroni della via diretta e i D₂ in quelli della via indiretta.³⁸

Tra le varie PDE, la PDE10A, PDE4 e PDE1B sono espresse a livello dei neuroni gabaergici appartenenti alle due vie, di conseguenza la loro inibizione incrementa in entrambi i tipi di neuroni la cascata indotta dal cAMP/PKA (**Fig. 12**). Se l'attività della PDE è predominante nella via diretta (ad es. PDE1B), la sua inibizione si traduce in un aumento della cascata cAMP/PKA e quindi un maggior tono gabaergico di questi neuroni. Questo agisce negativamente sull'output inibitorio di GPi/SNpr (*globus pallidus interna/substantia nigra pars reticulata*) e si traduce in un'attivazione dei circuiti motori talamo-corticali. Viceversa, se l'attività fosfodiesterasica è maggiore nella via indiretta (PDE10A e PDE4), la sua inibizione aumenta il tono gabaergico dei neuroni striatali sul GPe (*globus pallidus externa*) e conseguentemente verrà meno il controllo sui neuroni glutammatergici del STN (*subthalamic nucleus*). Questa azione determina quindi un aumento del tono glutammatergico sul GPi/SNpr e quindi una maggiore inibizione talamocorticale con riduzione della funzionalità motoria.

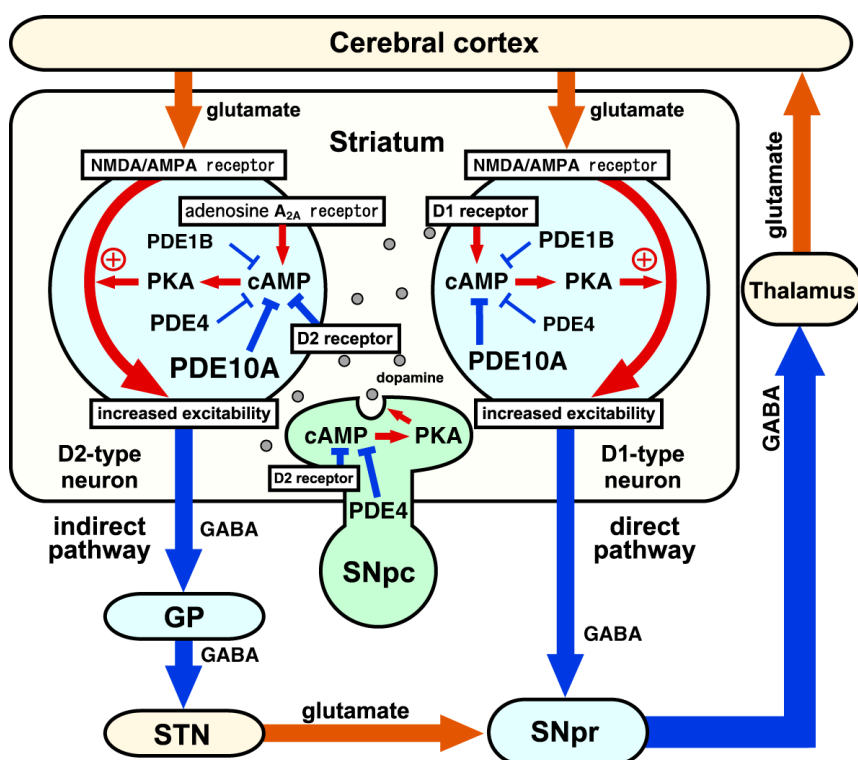


Figura 12. Ruolo delle fosfodiesterasi nel controllo del circuito gangli della base-talamocorticale. GP (globus pallidus), SNpc (substantia nigra pars compacta), SNpr (substantia nigra pars reticulata), STN (subthalamic nucleus).³⁹

Le due vie, diretta e indiretta, mostrano quindi effetti opposti sulle aree motorie

del talamo e della corteccia, pertanto gli inibitori che attivano prevalentemente la via diretta si comporteranno come agonisti D₁ accentuando le funzioni motorie. Al contrario se la loro azione è predominante nei neuroni della via indiretta, potenzieranno contemporaneamente il segnale dell'adenosina sui recettori A_{2A} e agiranno come antagonisti D₂ riducendo così la funzione motoria. Il bilanciamento dell'azione degli inibitori delle PDE sugli output della via diretta e indiretta determinerà gli effetti comportamentali.³⁹ Da studi condotti su strisce neo-striatali di topo, si è riscontrato che l'effetto dell'inibizione indotta dalla papaverina e da altri inibitori sulla PDE10A è molto più accentuato nei neuroni della via indiretta e questo si traduce in una riduzione dell'attività motoria.

La PDE10A, come molte delle PDE presenti a livello centrale, è in grado di controllare in modo critico più vie di segnalazione intracellulari necessarie per la normale funzionalità dell'attività cerebrale e, per via del suo ruolo a livello striatale, casi di deficit della PDE10A possono essere correlati ai sintomi clinici associati alla schizofrenia e HD.

La schizofrenia è una malattia psicologica cronica debilitante che colpisce circa una persona su 100 caratterizzata da sintomi classificati come positivi, negativi e cognitivi. Tra i sintomi positivi rientrano allucinazioni, deliri e disturbo del pensiero che sono indicate generalmente come psicosi; i sintomi negativi invece sono rappresentati da appiattimento emotivo, povertà di linguaggio e isolamento sociale; infine i sintomi cognitivi sono caratterizzati da difficoltà a seguire istruzioni e di concentrazione, pensieri disorganizzati e problemi di memoria. Mentre i sintomi positivi rispondono molto bene al trattamento farmacologico con i neurolettici tipici e atipici, quelli negativi e cognitivi sono molto resistenti e questo comportamento è associato all'invalidità a lungo termine. In pazienti affetti da schizofrenia i recettori D₂ mostrano una maggiore attività rispetto ai recettori D₁, riducono i livelli di cAMP a livello della corteccia frontale e temporale e questo si traduce in deficit cognitivi e psicosi. L'utilizzo di antipsicotici tipici, come l'aloiperidolo, non ha mostrato effetti sulle funzioni cognitive.⁴⁰ Per via dell'elevata espressione della PDE10A e la sua peculiare localizzazione, è stato ipotizzato l'impiego di suoi inibitori per il trattamento terapeutico della schizofrenia.

La papaverina, un alcaloide oppiaceo, usato principalmente contro gli spasmi viscerali e vasali, è stata impiegata in studi clinici negli anni '60-'70 per il trattamento della demenza senile e la discinesia tardiva, esibendo un'inibizione selettiva della PDE10A con valori di IC₅₀ di 36nM. In molti studi preclinici si è confermato che i suoi

effetti sono specificamente attribuibili all'inibizione della PDE10A perché nei topi knockout questi effetti sono assenti.^{41,42} Ad esempio, la papaverina non induce catalessia, ma somministrata insieme all'aloiperidolo, antagonista dei recettori D₂, potenzia l'effetto del neurolettico confermando la sua azione a livello dei MSNs striatali. È stata quindi impiegata per esplorare il ruolo fisiologico della PDE10A nella regolazione delle funzioni striatali. Nel topo, somministrazioni intraperitoneali di papaverina hanno incrementato i livelli di cGMP nello striato e lo stato di fosforilazione di CREB e *ERK* (*extracellular signal-regulated kinase*), due importanti proteine per la funzionalità striatale. Il CREB svolge un ruolo chiave nell'apprendimento e nella formazione della *LTM* (*long-term memory*), tanto che la perdita del gene che esprime il fattore di trascrizione porta a un peggioramento della LTM lasciando inalterati apprendimento e *STM* (*short-time memory*).⁴³ Inibitori selettivi della PDE10A, pur mostrando efficacia sulla funzione cognitiva, potrebbero risultare utili nel trattamento delle psicosi. L'impiego terapeutico degli inibitori selettivi delle PDE rappresenterebbe un nuovo meccanismo non *receptor-based* per la riduzione delle psicosi e il miglioramento della memoria evitando così gli effetti collaterali indotti dall'antagonismo del recettore dopaminergico.

È stata riscontrata una diminuzione dei livelli di CREB e della *CBP* (*CREB-binding protein*) nella HD, dovuto appunto ad una diminuzione dei livelli di cAMP a livello dello striato.^{44,45,46,47} L'inibizione della PDE10A, quindi, potrebbe essere il principale bersaglio per la terapia della HD.

La HD è una malattia ereditaria debilitante caratterizzata da una degenerazione progressiva dello striato, nello specifico una perdita dei neuroni MSNs gabaergici. I sintomi includono movimenti involontari, perdita del controllo motorio, la perdita di funzioni cognitive e disturbi emotivi, e di solito appaiono negli adulti nella terza o quarta decade di vita.⁴⁸ Questa malattia è caratterizzata anche da un'alterazione della trascrizione di una proteina, indicata come *huntingtina*, che risulta tossica per i neuroni. Questa proteina, da recenti studi, sembra alterare l'espressione della PDE10A nell'uomo e nel topo. Un dubbio sollevato da *Hebb et al.* è se la riduzione dell'attività fosfodiesterasica nello striato sia o meno dannosa per la funzione cerebrale.⁴⁹ Nel caso in cui lo fosse allora gli inibitori della PDE10A potenzierebbero i sintomi in pazienti affetti da HD. Al contrario, gli inibitori sarebbero di utile applicazione, nelle prime fasi della malattia, se la diminuzione della PDE10A fosse dovuta ad un tentativo dell'organismo di ristabilire un equilibrio delle attività dei nucleotidi ciclici.⁵⁰

Inibitori della PDE10A e progettazione delle molecole oggetto della tesi

L'alcaloide papaverina **1** è stato riportato dalla *Pfizer* come il primo potente inibitore relativamente selettivo della PDE10A (IC_{50} : 36nM). La papaverina è stata utilizzata con successo in esperimenti condotti su modelli animali della schizofrenia. Tali risultati incoraggianti hanno stimolato la comunità scientifica a sviluppare nuovi inibitori selettivi della PDE10A come nuovo approccio terapeutico. L'impiego di analisi cristallografiche applicato a complessi enzima-ligando ha permesso di definire meglio la struttura del sito catalitico e, assieme a tecniche di drug-design, è stata possibile la sintesi di una miriade di composti attivi, alcuni di questi in fase di sperimentazione preclinica. Date le notevoli diversità strutturali di tali composti, recentemente, *Hoefgen et al.* hanno suddiviso gli inibitori in tre classi catalogandoli in base al tipo di interazioni che questi contraggono con i residui del dominio catalitico della PDE10A, ossia i *glutamine binders*, i *tyrosine binders*, e i *dual glutamine-tyrosine binders*.⁵¹ Sono elencati di seguito alcuni rappresentanti di queste classi dei quali è stato depositato il dato cristallografico del complesso enzima-inibitore nel *Protein Data Bank (PDB)*.

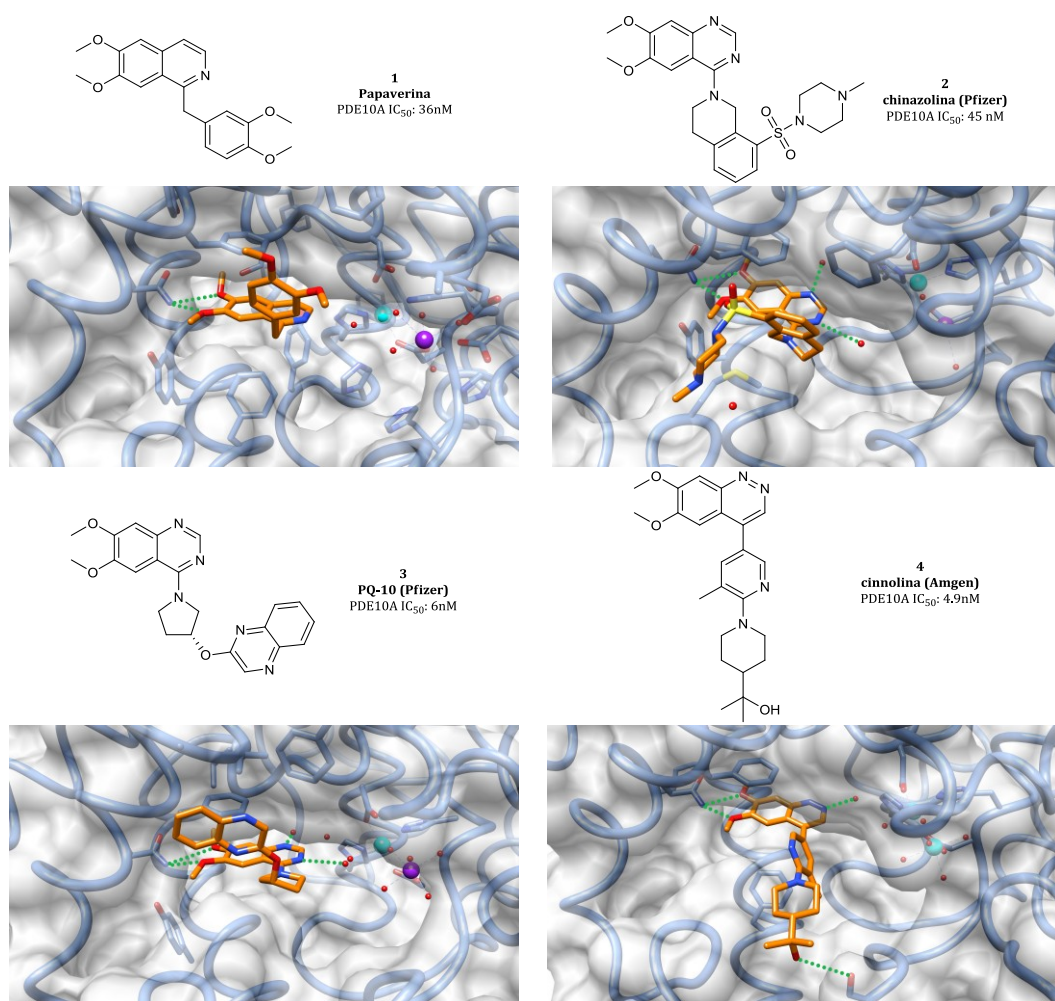


Figura 13. *Glutamine binders*. Strutture chimiche dei composti **1**, **2**, **3** e **4** con i relativi valori di inibizione per la PDE10A. Sotto i composti sono illustrate le strutture cristallografiche del sito attivo dell'enzima co-cristallizzato rispettivamente con i composti **1** (PDB 2WEY), **2** (208H), **3** (20VY), **4** (4DDL).

Dore Antonio, Sintesi e studi SAR di nuove piattaforme tricicliche a struttura pirazolo-isochinolinica e pirazolo-naftiridinica come inibitori dell'enzima fosfodiesterasi 10A (PDE10A). Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXV ciclo), Università degli Studi di Sassari.

Nella prima classe (*glutamine binders*) sono incluse le prime molecole sintetizzate come inibitori della PDE10A (**Fig. 13**). Queste mostrano caratteristiche strutturali molto simili alla papaverina per la capacità di conservare l'interazione con la glutamina, la prima ancora del sito catalitico di tutte le famiglie delle PDE. Infatti, i derivati appartenenti a questa classe presentano il sistema dialcossilico per l'interazione a ponte idrogeno bidentato con la glutamina, e un sistema biarilico fuso per l'interazione idrofobica nella *P-clamp* come riscontrato per la papaverina. Una delle prime strutture pubblicate è stata quella della dimetossi-chinazolina **2** (*Pfizer*) che ha mostrato un valore di IC₅₀ di 45nM.⁵² Come il composto **2**, i derivati **3** e **4** mostrano rispettivamente ottimi valori di inibizione enzimatica di 6nM e 4.9nM rispettivamente. I derivati dialcossilici hanno un'applicabilità ridotta poiché soffrono di una bassa selettività nei confronti delle PDE3.^{51,53}

Inoltre, rientrano nella classe dei *glutamine binders* strutture tricicliche come i composti lineari della Merck (**5** e **6**), e i sistemi triciclici angolari tra cui l'imidazo-pirido-pirazina **7**(**WEB-3**) della Biotie/Wyeth e l'imidazochinossalina **8** della *Biocrea/Pfizer* (**Fig. 14**).

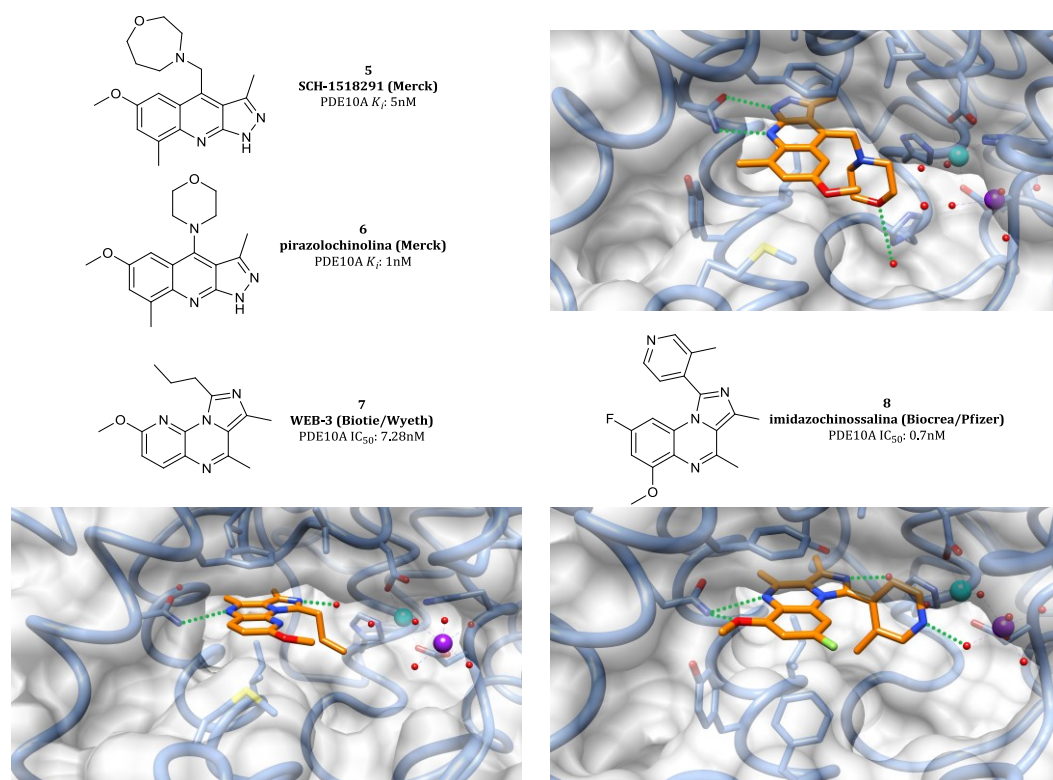


Figura 14. Sistemi triciclici lineari e angolari appartenenti alla classe *glutaminebinders*. PDB code: **6** (3UI7), **7** (3LXG), **8** (3SN7).

I composti **5** e **6** della *Merck* mantengono il legame bidentato con la glutamina in maniera differente dalla papaverina ed analoghi, coinvolgendo in questo caso l'azoto piridico e il gruppo NH pirazolico, i quali interagiscono rispettivamente con il gruppo

NH₂ e con l'ossigeno carbonilico del residuo glutammico.

Diversamente, nel composto **WEB-3 (7)** della *Biotie/Wyeth* è solo l'azoto pirazinico che interagisce mediante ponte a idrogeno con il gruppo NH₂ glutammico. In questo composto è possibile riscontrare una seconda importante interazione coinvolgente una molecola d'acqua e l'azoto imidazolico compreso tra i due gruppi alchilici.⁵⁴

La molecola **8** della *Biocrea/Pfizer* esibisce un valore di IC₅₀ di 0.7nM nei confronti della PDE10A e un'elevata selettività che è maggiore di 150 volte per la PDE2 e maggiore di 3000 volte nei confronti degli altri tipi di PDE.⁵⁵ L'imidazo-chinossalina **8** interagisce con la glutammina tramite un legame bidentato che coinvolge, oltre l'azoto pirazinico, anche il gruppo metossilico in qualità di accettori di legame a idrogeno. Inoltre, tale composto crea legami a idrogeno con due molecole d'acqua, una di queste appartiene alla sfera di coordinazione del magnesio e interagisce con l'azoto piridico, mentre la seconda lega l'azoto imidazolico.

Nella seconda classe rientrano i *tyrosine binders* (**Fig. 15**) caratterizzati dall'interazione con la **Tyr683**. Tale residuo è mantenuto solo nella PDE10A e nella PDE2A.

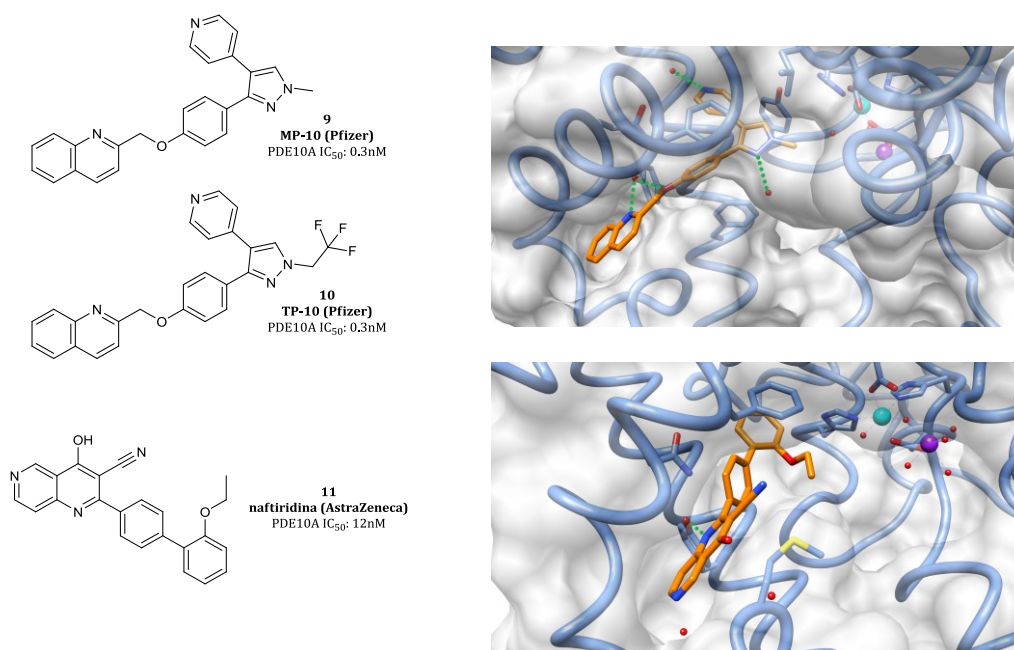


Figura 15. Strutture e orientamento assunto nel sito catalitico dei *tyrosinebinders*. PDB code: 3HRL (**9**), 4AEL (**11**).

Tra i composti appartenenti a questa classe, i più potenti e selettivi sono **MP-10 (9)** e **TP-10 (10)** della *Pfizer* che hanno mostrato un valore di IC₅₀ di ben 0.3nM e una selettività maggiore di 1000 e 3000 volte rispettivamente nei confronti delle altre famiglie di PDE. **MP-10** e **TP-10**, mediante l'azoto chinolinico, interagiscono con la **Tyr683** presente nella tasca idrofobica Q₂ della PDE10A, conformazione unica tra le varie PDE e che conferisce selettività. Questi due composti presentano un'ulteriore

interazione tra l'azoto dell'anello piridinico e una molecola d'acqua trattenuta nella tasca Q_1 dell'enzima. Il composto **MP-10** è in fase di sperimentazione clinica come nuovo approccio terapeutico nel trattamento della schizofrenia.⁵⁶

Un ultimo composto appartenente a questa classe intermedia è la naftiridina **11**, prodotta dall'AstraZeneca, che presenta un sistema 1,6-naftiridinico. Anche questo composto non ha interazioni con la glutammina; l' N_1 della funzione naftiridinica si comporta come accettore di legami a idrogeno, analogamente a quanto riscontrato con l'azoto chinolinico presente nel **MP-10**, interagendo con l'OH della tirosina. In questo modo la naftiridina occupa la tasca di selettività ancorandosi alla **Tyr683**.⁵⁷

Infine, l'ultima classe di composti, indicata come *dual glutamine-tyrosine binders* (**Fig. 16**), deriva da successive ottimizzazioni strutturali apportate ai composti appartenenti alle precedenti classi. Infatti, i composti in esame, interagiscono sia con la glutammina **Q716** sia con la tirosina **Y683** raggiungendo un elevato grado di selettività rispetto alla prima classe. In questa categoria si richiamano le strutture dei composti **12** della *Lundbeck* **13** della *Pfizer*.

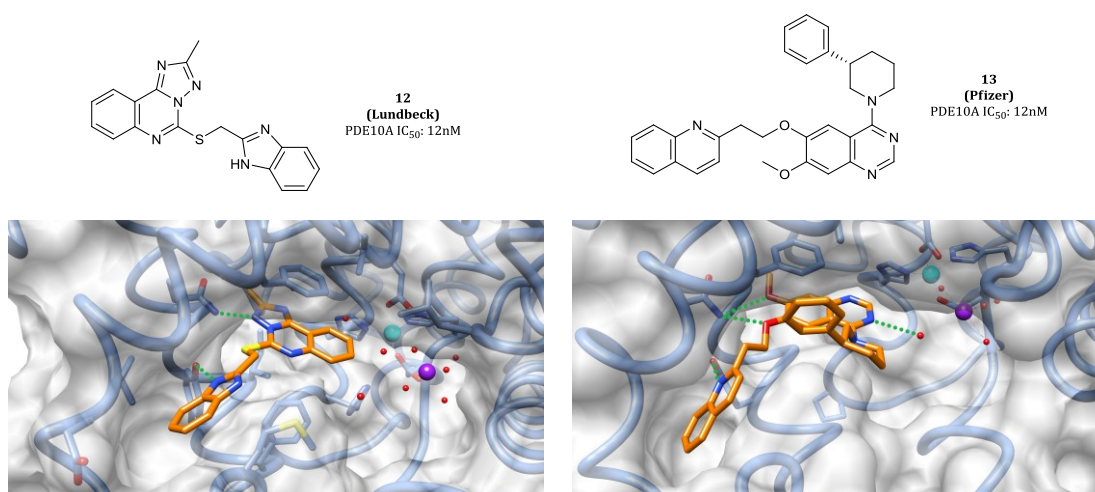
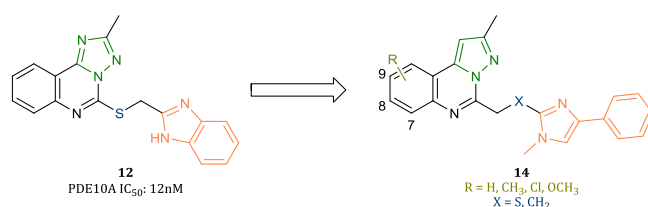


Figura 16. Strutture bidimensionali e modalità di legame nel sito catalitico dei composti **12** (PDB code: 2Y0J) e **13** (3QPP).

Nella triazolochinazolinone **12** (IC_{50} : 12nM), gli atomi interessati nei legami a idrogeno con l'enzima sono l'azoto N_2 dell'anello triazolico e l' N_3 del benzimidazolo che interagiscono come accettori rispettivamente con la glutammina e con l'OH tirosinico.⁵⁸ Differentemente, nella dialcossi-chinazolinone **13** (IC_{50} : 12nM) è possibile evidenziare il legame bidentato dei primi inibitori con la **Gln716** e, in aggiunta, l'interazione con la **Tyr683** che si comporta da donatore sull'azoto del pendaglio chinolinico.⁵²

Recentemente sono stati pubblicati i risultati di uno studio di relazioni struttura-attività (*SAR*) di molecole di formula generale **14** riguardanti la capacità inibente la PDE10A (**Schema 1**).



Schema 1. Modifiche apportate alla struttura **12** nella progettazione del composto **14**.

Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza di un sistema tricyclico pirazolo[1,5-*c*]chinazolinico sostituito, legato in posizione 5, tramite un linker metil-sulfanilico o etilenico, ad una porzione fenilimidazolica.⁵⁹ Tali molecole deriverebbero da modifiche strutturali apportate alla triazolochinazolina **12** della Lundbeck, precedentemente discussa, sulla base di una attenta analisi ai raggi X della struttura co-cristallizzata con il sito catalitico della PDE10A (**Fig. 16**). In particolare, le modifiche apportate hanno riguardato la sostituzione dell'anello 1,2,4-triazolico con il deaza-analogo pirazolico, la conversione della porzione benzimidazolica con un sistema più flessibile fenilimidazolico, l'inversione dello *spacer* sulfanil-metilenico o la sua sostituzione con un *spacer* di tipo etilenico. Inoltre, lo studio *SAR* è stato esteso all'introduzione di vari sostituenti come Cl, CH₃, OCH₃ nell'anello benzenico della nuova piattaforma tricyclica.

I risultati di tale studio sono elencati in **Tabella 2** che elenca i valori di IC₅₀ delle molecole in esame. Brevemente, come si evince dalla tabella, i dati di affinità mostrano come tali composti mantengano un valore di affinità per molti di essi paragonabile a quella della triazolochinazolina di partenza, malgrado le numerose modifiche strutturali apportate. Questo andamento è messo in evidenza quando si confronta il composto **12** (IC₅₀: 12 nM) con il composto **14a** (IC₅₀: 48 nM) e il composto **14i** (IC₅₀: 50 nM). Tali dati indicano che la presenza dell'atomo di zolfo nello *spacer* e dell'N₁ nella triazolochinazolina non sono elementi cruciali per l'affinità.

I valori di IC₅₀ illustrati evidenziano inoltre un ampio margine di tollerabilità a seguito dell'introduzione di vari sostituenti a carico dell'anello benzenico. Infatti, sia l'introduzione di sostituenti elettronattrattori che elettron-donatori nelle posizioni 7, 8 e 9 non determinano una sostanziale variazione di affinità, forse con l'eccezione del CH₃ e Cl in posizione 9, in combinazione con lo *spacer* etilenico, che dà i due composti più attivi della serie, **14l** e **14q** (IC₅₀: 16nM). Prove successive evidenziavano per il composto **14l**, analogamente alla triazolochinazolina **12**, un'eccellente selettività verso le altre isoforme di fosfodiesterasi con valori di IC₅₀ maggiori di 10.000nM.

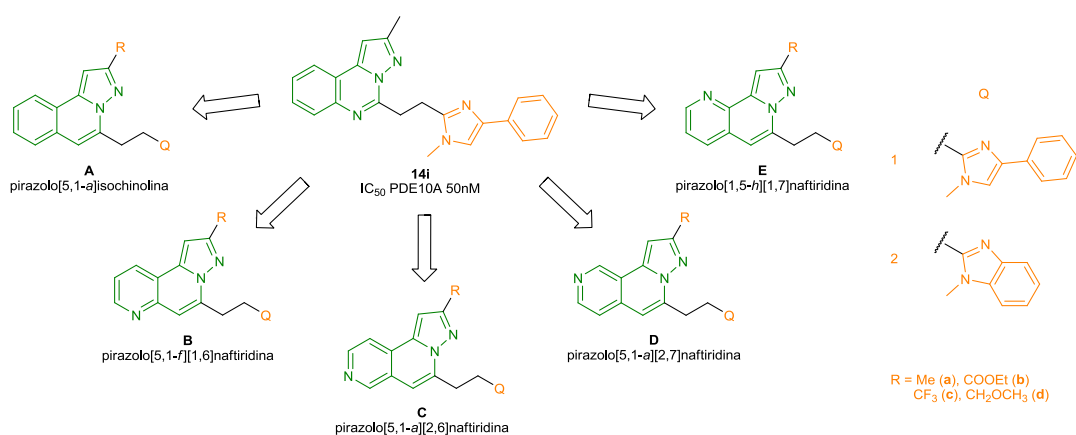
Prove farmacologiche condotte *in vivo* hanno inoltre evidenziato per il composto **14i** un miglioramento della biodisponibilità nell'attraversamento della barriera

ematoencefalica (BEE), con valore B/P *ratio* pari a 0.65, rispetto alla triazolochinazolina **12**, caratterizzata dall'incapacità di permeare la BEE (B/P *ratio* < 0.04).

Comp.	X	R	PDE10A IC ₅₀ (nM±30%)	Compd	X	R	PDE10A IC ₅₀ (nM±30%)
14a	S	H	48	14i	CH ₂	H	50
14b	S	7-Cl	73	14j	CH ₂	7-Cl	52
14c	S	8-Cl	130	14k	CH ₂	8-Cl	50
14d	S	9-Cl	110	14l	CH ₂	9-Cl	16
14e	S	7-OCH ₃	83	14m	CH ₂	7-OCH ₃	37
14f	S	8-OCH ₃	100	14n	CH ₂	8-OCH ₃	31
14g	S	7-CH ₃	160	14o	CH ₂	9-OCH ₃	430
14h	S	9-CH ₃	76	14p	CH ₂	7-CH ₃	78
12	-	-	12	14q	CH ₂	9-CH ₃	16

Tabella 2. Struttura delle molecole **14a-q** e affinità per l'enzima PDE10A misurata come IC₅₀.

Sulla base dei risultati dello studio precedentemente esposto, il composto **14i** è stato pertanto identificato come nuova molecola guida sulla quale apportare modifiche strutturali al fine di un ulteriore studio SAR (**Schema2**). Le modifiche strutturali sono state apportate inizialmente a carico del sistema tricyclico pirazolo[1,5-*c*]chinazolinico che, attraverso l'approccio bioisosteroico, fornisce piattaforme tricycliche di formula **A-E** quali nuovi *templati*, mantenendo invariata la porzione fenilimidazolica e il gruppo 2-metilpirazolo.

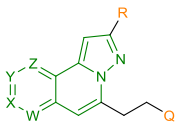


Schema 2. Disegno dei sistemi tricyclici pirazolo-condensati di formula generale **A-E** derivati dal composto **14i**.

Ulteriori modifiche strutturali sono state successivamente apportate sulle nuove piattaforme, a livello del gruppo 2-metile, mediante la sua sostituzione con il gruppo bioisostero $-CF_3$, o con altri gruppi come $-COOC_2H_5$, $-CH_2OCH_3$, e sostituendo la porzione fenilimidazolica con quella benzimidazolica, in analogia alla triazolochinazolina **12**. Molte delle molecole progettate (**Tab. 3**) mantengono quasi invariato, rispetto a **14i**, sia

il peso molecolare sia la lipofilia, parametri importanti nell'influenzare la biodisponibilità di un composto nella capacità di permeazione della BEE. ^{60,61}

Le nuove strutture progettate sono oggetto di sintesi di questa tesi di dottorato.



Piattaforma	Sigla	R	Q	P.M	LogP (o/w)
A W,X,Y,Z=CH	Aa-1	Me	1	366,4680	4,72
	Aa-2	Me	2	340,4300	4,45
B W=N; X,Y,Z=CH	Ba-1	Me	1	367,4560	3,45
	Ba-2	Me	2	341,4180	3,18
	Bb-1	COOEt	1	425,4920	3,44
	Bb-2	COOEt	2	399,4540	3,16
	Bc-1	CF ₃	1	421,4260	4,09
	Bd-1	CH ₂ OCH ₃	1	397,4820	3,24
C W,Y,Z=CH; X=N	Bd-2	CH ₂ OCH ₃	2	371,4440	2,97
	Ca-1	Me	1	367,4560	3,49
D W,X,Z=N; Y=CH	Da-1	Me	1	367,4560	3,49
	Da-2	Me	2	341,4180	3,22
E W,X,Y=CH; Z=N	Ea-1	Me	1	367,4560	3,65

Tabella 3. Elenco e sigle delle molecole progettate. I valori di LogP sono stati ottenuti con MOE® calcolando le cariche parziali mediante il *force field* PM3.

CAPITOLO 2

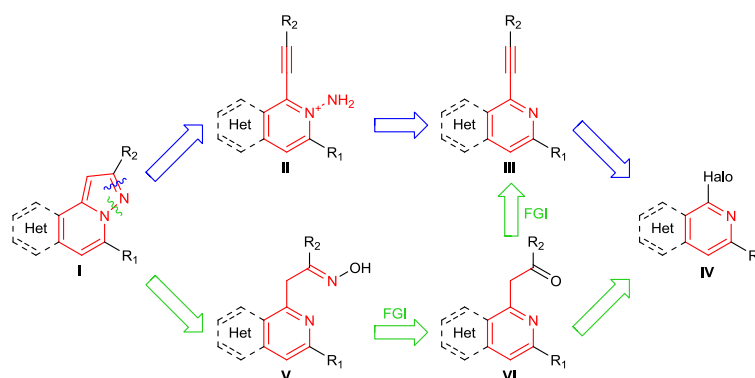
Chimica

Analisi Retrosintetica

Durante i tre anni di dottorato le difficoltà sintetiche hanno riguardato la costruzione dei nuclei triciclici, con numerosi tentativi volti alla sintesi e all'ottimizzazione delle rese che hanno richiesto la maggior parte del tempo.

Per motivi di chiarezza sono di seguito elencate le varie strategie di sintesi impiegate per l'ottenimento delle piattaforme tricicliche mostrate nel progetto, successivamente sono discusse le vie sintetiche che hanno permesso di ottenere i prodotti finali.

La sintesi delle molecole progettate è stata preceduta da uno studio retrosintetico, illustrato nello **Schema 3**, in cui l'attenzione è stata rivolta alla costruzione del nucleo base pirazolo[1,5-*a*]piridinico, struttura comune presente in tutte e cinque le piattaforme tricicliche. La retrosintesi prevede due possibili percorsi in cui vi è la formazione dell'anello pirazolico **I** a partire da un'appropriata *o*-alogenopiridina **IV**, intermedio chiave delle due vie.



Schema 3. Possibili percorsi retrosintetici per la sintesi del nucleo base pirazolo[1,5-*a*]piridinico.

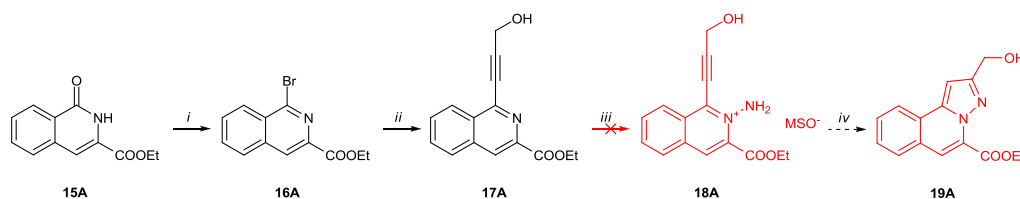
Un primo approccio (sequenza in blu) suggerisce come tappa fondamentale una reazione di cicloadizione intramolecolare di un sale di *N*-amminopiridinio **II** recante, in posizione orto all'azoto, un opportuno alchino sostituito. Tale composto si otterrebbe per reazione di *N*-amminazione sulla corrispondente *o*-alchinilpiridina **III**, la quale può essere ottenuta tramite una reazione di Sonogashira tra l'*o*-alogenopiridina **IV** e un alchino terminale.

Nel secondo percorso, il sistema pirazolopiridinico **I** può essere ottenuto mediante l'attivazione e successiva ciclizzazione a pirazolo dell'ossima **V**, la quale è ottenibile dal chetone **VI**. Quest'ultimo può derivare dall'idratazione dell'alchino **III**, e quindi da qui riunirsi al primo percorso, oppure direttamente dall'alogeno-piridina **IV** per reazione di coupling con un opportuno chetone.

La preparazione delle *o*-alopiridine è stata ottenuta mediante diversi approcci sintetici in base al tipo di substrato di partenza, diverso per ogni piattaforma desiderata.

Sintesi del sistema pirazolo[5,1-*a*]isochinolinico A

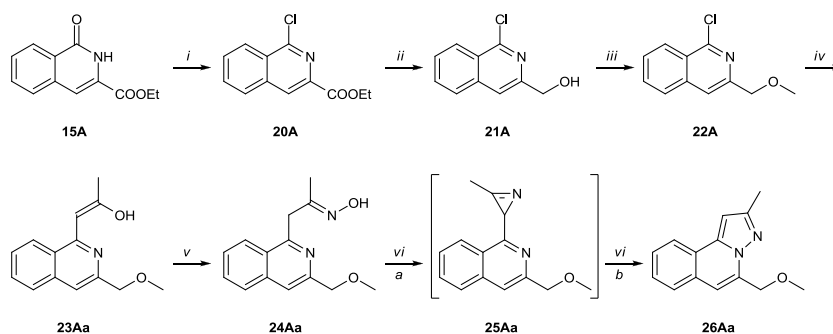
La sintesi della piattaforma **A** inizia con la preparazione dell'isochinolone **15A** a partire dall'acetale della *o*-bromobenzaldeide⁶ seguendo quanto descritto in letteratura.⁶²



Schema 4. Tentativo di sintesi della piattaforma **A** mediante reazione di *N*-aminazione. Reagenti e condizioni: *i*: POBr₃, K₂CO₃, CH₃CN, reflux, 90 min; *ii*: alcol propargilico, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, Et₃N, DMF, t.a.; *iii*: *O*-mesetilensulfonilidrossilamina/DCM 0°C; *iv*: K₂CO₃, DMF, t.a.

L'intermedio **15A** è stato trattato con POBr₃ per dare la bromo-isochinolone **16A**⁶³ che, sottoposta alla reazione di *Sonogashira*, ha fornito l'alchinil-isochinolone **17A**. Il tentativo di convertire il composto **17A** nel corrispondente sale di imminoisochinolone **18A** con *MSH* (*O*-mesetilensulfonilidrossilammina) falliva. L'ottenimento del sale **18A** avrebbe consentito di isolare la pirazolo-isochinolone **19A** mediante ciclizzazione con K₂CO₃ in DMF (**Schema 4**) analogamente a quanto descritto da *Tsuchiya et al.*⁶⁴

Dati i risultati negativi ottenuti seguendo il primo approccio retrosintetico, è stata seguita la seconda via. Pertanto, alternativamente l'isochinolone **15A** è stato convertito con POCl₃ ottenendo con buone rese l'intermedio **20A**⁶³ (**Schema 5**).



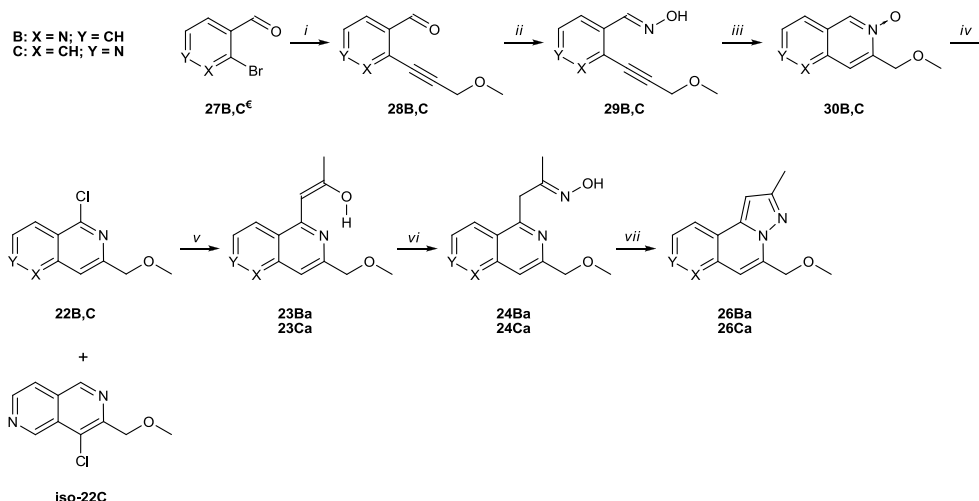
Schema 5. Reagenti e condizioni: *i*: POCl₃, reflux, 14h; *ii*: NaBH₄, EtOH, reflux, 2h; *iii*: a) NaH, THF, 5-10°C, 30min; b) MeI, 5°C-t.a., 2h; *iv*: isopropenil acetato, toluene, PhDavePhos, *n*Bu₃SnOMe, Pd₂(dba)₃, 100°C, overnight; *v*: NH₂OH·HCl, AcONa·3H₂O, EtOH, t.a., 2h; *vi*: a) TFAA, TEA, DME, 0°C a t.a.; b) FeCl₂, 75°C.

L'estere **20A** è stato ridotto con NaBH₄ per fornire l'alcol **21A** (80%) in metanolo a riflusso. La protezione di **21A** con ioduro di metile ha consentito di isolare l'etere **22A** che, sottoposto a reazione di coupling con isopropenil acetato/Pd₂(dba)₃/PhDavePhos in presenza di *n*-Bu₃SnOMe fornisce l'acetonyl-derivato **23Aa** (57%). Il composto **23Aa** è stato convertito con NH₂OH·HCl in etanolo, in mezzo tamponato con AcONa·3H₂O, ottenendo l'ossima **24Aa** (83%). Infine, l'attivazione dell'ossima **24Aa** in atmosfera inerte con anidride trifluoroacetica/trietilammina a 0 °C, e il successivo trattamento con FeCl₂ in DME a 75°C, ha permesso di isolare il triciclo desiderato **26Aa** con una resa del

28%. E' interessante notare che la reazione decorre attraverso la formazione di un intermedio azirinicico di formula **25Aa**.

Sintesi dei sistemi pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina **B** e pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridina **C**.

La via di sintesi utilizzata per la preparazione dei sistemi triciclici pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina **B**, pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridina **C** è illustrata nello **Schema 6** e prevede come reazione finale la conversione delle ossime **23Ba** e **23Ca** nelle pirazolo-naftiridine desiderate **26Ba,26Ca**.



Schema 6. Reagenti e condizioni: *i*: metil propargil etere, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, Et₃N, DMF, N₂, t.a., 1h; *ii*: NH₂OH·HCl, AcONa·3H₂O, EtOH, t.a., 2h; *iii*: K₂CO₃, EtOH, t.a.; *iv*: POCl₃, 80°C, 2h; *v*: isopropenil acetato, toluene, PhDavePhos, *n*Bu₃SnOMe, Pd₂(dba)₃, N₂, 100°C, overnight; *vi*: NH₂OH·HCl, AcONa·3H₂O, EtOH, t.a., 2h; *vii*: a) TFAA, TEA, DME, N₂, da 0°C at.a.; b) FeCl₂, 75°C.

Pertanto, utilizzando l'esperienza acquisita nella sintesi del sistema triciclico **A** illustrata nello **Schema 5**, le piattaforme **B** e **C** sono state sintetizzate impiegando gli aza-analoghi di **22A**. Gli intermedi **22B,C** sono stati preparati dalle naftiridine-*N*-ossido **30B,C** per trattamento con POCl₃. Le naftiridine-*N*-ossido **30B,C** sono state ottenute in maniera analoga a quanto descritto da Numata *et al.*⁶⁵ Le *o*-Br aldeidi **27B,C^ε** sono state sottoposte ad una reazione di Sonogashira ottenendo gli intermedi alchidici **28B,C** in buone rese. Le *o*-alchinilaldeidi **28B,C** sono state trattate con idrossilammina cloridrata fornendo le ossime **29B,C**, che per successivo trattamento con K₂CO₃ in etanolo a t.a. hanno fornito le naftiridine-*N*-ossido **30B,C** (85 e 86% di resa rispettivamente). L'azione del POCl₃ sugli intermedi *N*-ossido ha condotto alle cloro-naftiridine **22B,C** (63 e 56% di resa rispettivamente). In quest'ultima reazione, nel caso in cui si utilizzi l'*N*-ossido **30C** si osserva anche la formazione dell'isomero strutturale **iso-22C** in cui l'atomo di cloro entra in posizione 4 (14%). La reazione di *coupling* di **22B,C** con isopropenil acetato/Pd₂(dba)₃/PhDavePhos in presenza di *n*-Bu₃SnOMe, ha consentito di isolare gli enoli **23Ba** (87%) e **23Ca** (57%). Gli enoli sono stati trasformati nelle corrispondenti ossime **24Ba** e **24Ca**, con buone rese che per reazione in atmosfera inerte con TFAA/TEA in DME a 0°C e per successivo trattamento con FeCl₂ a 75°C ha consentito di isolare i composti triciclici desiderati **26Ba** (41%) e **26Ca** (11%).

Ottimizzazione della sintesi del nucleo base pirazolo[1,5-a]piridinico

L'elevato numero di passaggi delle sequenze sintetiche precedentemente illustrate e le rese complessive per l'ottenimento dei composti **26Aa,26Ba,26Ca** ha spinto all'individuazione di una nuova strategia di sintesi.

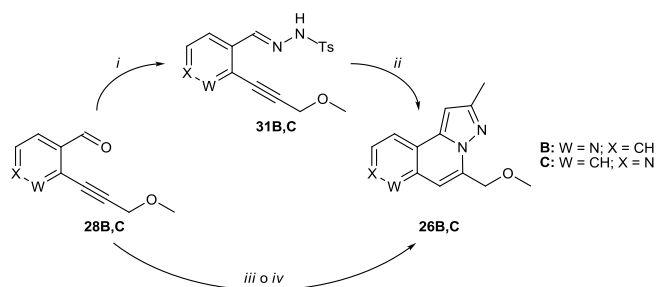
Sono note in letteratura diverse metodiche per la preparazione di derivati isochinolinici-3-sostituiti, in cui si utilizza un'*o*-alchinilaldeide come prodotto di partenza. Su questo tipo di substrato, l'atomo di azoto è introdotto convertendo l'aldeide in un gruppo imminico impiegando un'opportuna ammina o un suo derivato. Il trattamento del derivato *o*-alchinilimminico con uno o più acidi di Lewis o in ambiente basico porta alla ciclizzazione dell'azoto imminico sul triplo legame dell'alchino formando un anello isochinolinico.^{66,67} Ad esempio, l'utilizzo dell'idrossilammina come derivato amminico porta all'ottenimento di *N*-ossidi isochinolinici e naftiridinici come illustrato nel paragrafo precedente.

Questi approcci sintetici, variando le condizioni di reazione, permettono di compiere una sostituzione in posizione *orto* all'azoto isochinolinico, ottenendo così derivati 1,2-diidroisochinolinici.⁶⁸ Tali metodiche sono state applicate anche alla sintesi di strutture naftiridiniche.^{69,70,71} Nella sintesi di sistemi isochinolinici e naftiridinici, *Asao et al.* hanno proposto un meccanismo di reazione in cui quantità catalitiche di argento triflato, mediando la ciclizzazione di una *o*-alchinilimmina a *N*-arilisoquinolinio, potenziano il carattere elettrofilo del carbonio imminico. Successivamente, lo stesso carbonio subisce l'attacco di un pro-nucleofilo, cioè una sostanza che possiede idrogeni mobili e che può enolizzare, come ad esempio l'acetone, fornendo in questo caso una 1-acetonil-1,2-diidroisochinolina.⁷² Un miglioramento di tale sintesi è stato attuato da *Wu et al.* in cui attuano il concetto di doppia attivazione dell'elettrofilo e del nucleofilo. Tale strategia prevede la ciclizzazione dell'*o*-alchinilimmina in derivato *N*-arilisoquinolinico, come descritto in precedenza, e il sinergico potenziamento della nucleofilia di un metilchetone convertendolo nell'enammina corrispondente mediante l'utilizzo della prolina.⁷³

Recentemente, lo stesso gruppo di ricerca ha sviluppato diverse strategie di sintesi per sistemi pirazolo[5,1-*a*]isochinolinici da *N'*-(2-alchinilbenzelen)idrazidi.^{74,75} In tale contesto sono state impiegate varie specie elettrofile (AgOTf, Br₂, I₂, ICl) per catalizzare la formazione dell'anello isochinolinico. L'isochinolinio-tosilammide che ne deriva subisce, in posizione *orto* all'azoto, l'attacco del nucleofilo silil enoletere formando in un primo momento una 1-acetonil-1,2-diidroisochinolina. Tale substrato, in presenza di

una base, ciclizza a diidropirazolo, mentre la fuoriuscita del gruppo tosilico porta all'aromatizzazione del sistema fornendola pirazolo[5,1-*a*]isochinolina.⁷⁶

In analogia ai lavori svolti sia da *Asao* sia da *Wu*, nel presente lavoro di tesi, sono state condotte reazioni in diverse condizioni per ottenere le piattaforme analoghe azotate **B** e **C**. Lo studio di queste reazioni si è quindi fondato sull'utilizzo dei composti **28B,C** come substrati di partenza (**Schema 7**).



Schema 7. Reagenti e condizioni: *i*: TsNHNH₂, EtOH_{dry}, HCl_{conc}, t.a., 98% (**31B**) e 95% (**31C**); *ii*: a) AgOTf, acetone anidro, L-prolina, EtOH_{an.}, 50-60°C; b) Na₂CO₃, r.t., overnight, 75% (**26Ba**) e 0% (**26Ca**); *iii*: a) TsNHNH₂, AgOTf, DL-Prolina, EtOH, t.a., 20min; b) acetone anidro, 50-60°C, 30'; c) Na₂CO₃, t.a., 24h, 75% (**26Ba**); *iv*: a) TsNHNH₂, AgOTf, DCM_{an.}, t.a., 10'; b) 70°C, MW, 1h; c) DBU, acetone, t.a., 30' 29% (**26Ca**).

Inizialmente le *o*-alchinilaldeidi **28B,C** sono state convertite nei corrispettivi tosilidrazoni **31B,C** impiegando tosilidrazide in EtOH assoluto in presenza di HCl_{conc}. (98% e 95% rispettivamente). In seguito **31B,C** sono stati trattati con acetone anidro in presenza di quantità catalitiche di un acido di Lewis, AgOTf o CuI, in diverse condizioni di reazione (**Tab.4, entry 1-15**) per ottenere la loro conversione a pirazolo-naftiridina **26Ba** e **26Ca**.

In un primo momento l'idrazone **31B** è stato trattato con 10% mol di AgOTf a 90°C mediante microonde impiegando acetone anidro come reattivo e solvente. In queste condizioni è stato possibile isolare per la prima volta il composto **26Ba** con una resa del 30% (**Tab. 4, entry 1**).

In analogia a quanto descritto da *Wu*, per la sintesi delle *N*-aril-1,2-diidroisochinoline a partire dalle *o*-alchinilimmine, è stata impiegata la stessa strategia con l'idrazone **31B**, impiegando AgOTf (10%), L-prolina (10% mol) in EtOH a 50-60°C in presenza di 10eq. di acetone anidro. Il trattamento successivo con Na₂CO₃ (3eq.) a t.a. per 12h conduceva all'intermedio **26Ba** con rese del 53% (52% a partire dall'aldeide **28B**, **Tab. 4, entry 3**).

Utilizzando direttamente l'aldeide **28B** come prodotto di partenza, è stata condotta la reazione di ciclizzazione a **26Ba** in differenti condizioni. In soluzione etanolica è stato prodotto *in situ* l'idrazone **31B** impiegando **28B**, tosilidrazide (1.05eq.), AgOTf (10% mol), DL-prolina (10%). L'aggiunta di acetone anidro (10eq.) a 50-60°C per 30' e l'impiego di Na₂CO₃ (6eq.) a t.a hanno permesso di isolare l'intermedio desiderato

26Ba 75% di resa (**Tab. 4, entry5**). A confronto, la via illustrata nello **Schema 6**, permette di isolare con un 15% il composto **26Ba** da **28B**.

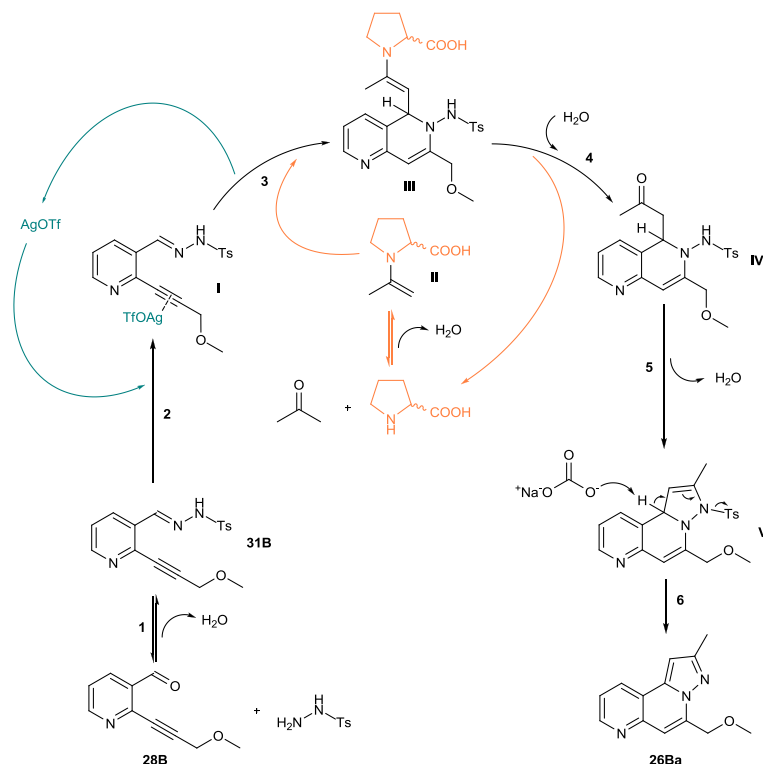
Entry	Condizioni di reazione	Resa	Resa Totale	Substrato	Prodotto
1	10% AgOTf, acetone _{an.} (solvente), 90°C, MW, 7h	30%	29%	31B	26Ba
2	10% AgOTf, 5eq. acetone _{an.} , 10% L-prolina, EtOH _{an.} , N ₂ , 50-60°C	36%	35%		
3	1. 30% AgOTf, 10eq. acetone _{an.} , 10% L-prolina, EtOH _{an.} , 50-60°C 2. 3eq. Na ₂ CO ₃ , r.t. overnight	53%	52%		
4	1. 1.05eq. TsNHNH ₂ , 10% CuI, DMF _{an.} , N ₂ , r.t., 20' 2. 100°C, 50' 3. 10% DL-prolina, 10eq. acetone _{an.} , EtOH _{an.} (3 x vol. DMF), 50-60°C, 30' 4. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t., 24h	66%	66%	28B	
5	1. 1.05eq. TsNHNH ₂ , 10% AgOTf, 10% DL-prolina, EtOH _{an.} , N ₂ , r.t., 20' 2. 10eq. acetone _{an.} , 50-60°C, 30' 3. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t., 24h	75%	75%		
6	1. 10% AgOTf, 10% DL-prolina, 10eq. acetone _{an.} , EtOH _{an.} , N ₂ , 50-60°C 2. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t. overnight	tracce	tracce	31C	
7	1. 30% AgOTf, DCM, 70°C, 1h, MW 3. 5eq. acetone _{an.} , 3eq. DBU, r.t.	10%	9.5%		
8	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 10% AgOTf, 10% DL-prolina, CHCl ₃ , N ₂ , r.t., 2. 5eq. acetone _{an.} , 50-60°C 3. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t.	nr	nr		
9	1. 1.05eq. TsNHNH ₂ , 10% CuI, DMF _{an.} , N ₂ , r.t., 20' 2. 100°C, 50' 3. 10% DL-prolina, 10eq. acetone _{an.} , EtOH _{an.} (3 x vol. DMF), 50-60°C, 30' 4. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t., 24h	nr	nr		
10	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 10% AgOTf, 10% DL-prolina, EtOH _{an.} , r.t., 2. 5eq. acetone _{an.} , 80°C, MW, 1h 3. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t.	nr	nr		
11	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 10% AgOTf, 10% DL-prolina, DMF _{an.} , r.t., 2. 5eq. acetone _{an.} , 50-60°C 3. 5eq. Na ₂ CO ₃ , r.t.	nr	nr	28C	
12	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 5% AgOTf, CHCl ₃ , N ₂ , r.t., pochi min. 2. 50°C, 72h, 3. 10% DL-prolina, 10eq. acetone _{an.} , 50-60°C 4. 6eq. Na ₂ CO ₃ , r.t.	nr	nr		
13	1. 1.1eq. TsNHNH ₂ , DCM, r.t., 5' 2. 10% AgOTf, 3eq. DBU, 5eq. acetone _{an.} , 60°C, 1h	nr	nr		
14	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 24% AgOTf, MS 4Å, DCM _{an.} , r.t., 30' 2. 70°C, MW, 1h 3. 10% DL-prolina, 10eq. acetone _{an.} , 60°C, 30' 4. 6eq. Na ₂ CO ₃ , EtOH, r.t.	16%	16%		
15	1. 1eq. TsNHNH ₂ , 30% AgOTf, DCM _{an.} , r.t., 10' 2. 70°C, MW, 1h 3. 3eq. DBU, 5eq. acetone _{an.} , r.t., 30'	29%	29%		

Tabella 4. Condizioni di reazione esplorate per l'ottenimento degli intermedi **26Ba** e **26Ca**. Nella colonna **Resa Totale** sono indicate le rese in percentuali della sintesi del prodotto **26B,C** a partire dal substrato **28B,C**. **nr**: nessuna reazione.

Nello **Schema 8** è mostrato il meccanismo di reazione proposto per la reazione *one-pot* nelle condizioni appena discusse.

Come nelle precedenti condizioni, l'aldeide **28B** con tosildrazide genera l'idrazone **31B**. La DL-prolina invece attiva l'acetone convertendolo nell'enammina **II**. L'argento triflato attiva il triplo legame dell'idrazone **31B**, quest'ultimo, subendo un attacco nucleofilo da parte dell'enammina **II** sul carbonio idrazonico, ciclizza a diidronaftiridina generando l'addotto **III**. L'intermedio **III** perde prolina, che può quindi riprendere il ciclo catalitico, ed evolve nel chetone **IV**. Il chetone **IV** perde acqua formando il diidropirazolo **V**. Il trattamento di quest'ultimo con Na₂CO₃ porta alla perdita del tosile come gruppo uscente e permette l'aromatizzazione del sistema conducendo a **26Ba**. Le stesse metodiche, esplorate per **26Ba**, sono state applicate all'isomero **28C** ma

non hanno permesso di ottenere la piattaforma **26Ca**. Di conseguenza sono state esplorate altre metodiche, impiegando l'aldeide **28C** e l'idrazone corrispondente, **31C** nel tentativo di isolare **26Ca**.



Schema 8. Meccanismo di reazione proposto per **26Ba** nelle condizioni indicate in **Tabella 4entry5**.

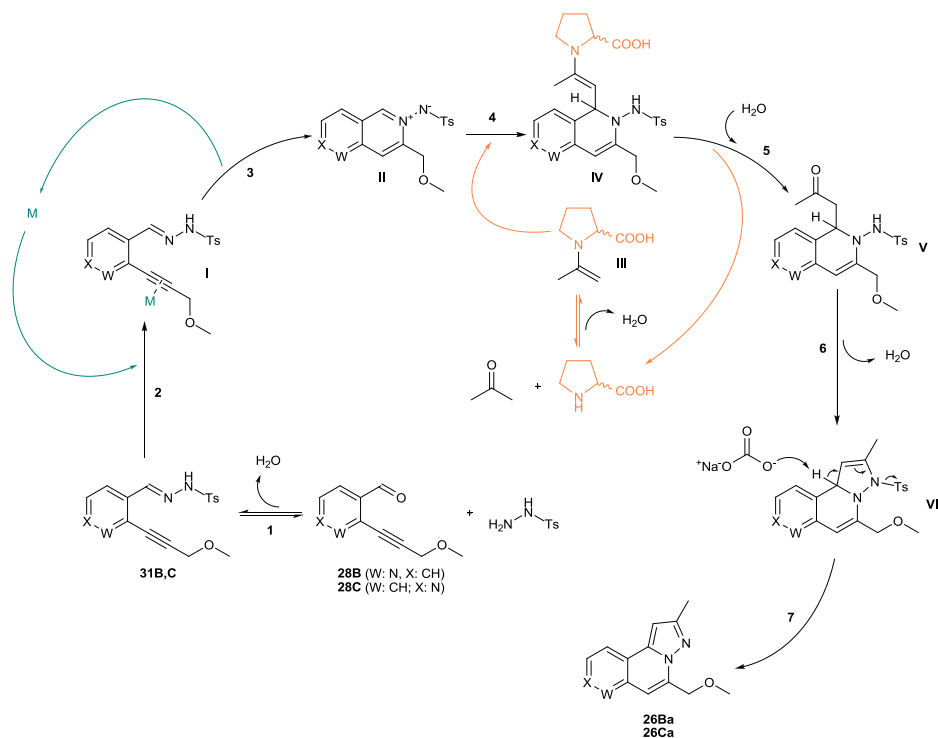
Una strategia prevedeva l'impiego di CuI come acido di Lewis, reattivo utilizzato in letteratura per la ciclizzazione di *o*-alchinil-*t*-butylimmine nei corrispondenti eterocicli azotati piridinici.⁶⁶ La reazione è stata condotta su entrambe le aldeidi **28B,C**. Il meccanismo proposto di tale reazione è presentato nello **Schema 9**.

Tali aldeidi sono state convertite nei corrispettivi idrazoni **31B,C** in DMF sotto azoto. Successivamente gli idrazoni **31B,C** sono stati sottoposti a ciclizzazione a naftiridinio-tosilammide **II** alla temperatura di 100°C . Tale substrato è l'elettrofilo su cui agirebbe l'enammina **III** a $50\text{-}60^\circ\text{C}$ per dare l'addotto **IV**, da questo punto il percorso è lo stesso di quello già descritto nello schema precedente. Con tale metodica è stato possibile isolare solo l'isomero **26Ba** al 66% (**Tab. 4, entry4 e 9**).

In virtù di tali risultati è stato sostituito il CuI con l' AgOTf . La reazione è stata condotta in DCM sull'idrazone **31C** impiegando il 30% mol di AgOTf a 70°C per 1h al microonde. Dopodiché è stato aggiunto acetone (5eq.) e DBU come base (3eq.) ottenendo **26Ca** al 10% (9.5% a partire da **28C**, **Tab. 4entry7**). In queste condizioni il meccanismo di reazione dovrebbe essere simile a quello mostrato nello **Schema 9**.

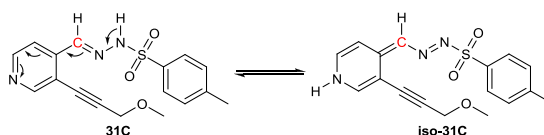
Lo studio è stato proseguito per migliorare le rese a partire dall'aldeide **28C**. Tra le varie prove, quella più efficace in termini di resa è stata quella indicata in **entry15**. Tale

metodica prevedeva una prima ciclizzazione a naftiridinio in DCM a 70°C per 1h mediante microonde impiegando il 24% di AgOTf. In seguito la miscela è stata trattata con acetone (5eq.) e DBU (3eq.) a t.a. per ottenere **26Ca** al 29% di resa. Il risultato ottenuto si può considerare buono poiché, nella sintesi mostrata nello **Schema 6**, la resa complessiva a partire dall'o-alchinilaldeide **28C** era solo del 2%.



Schema 9. Meccanismo alternativo di reazione proposto per **26Ba,Ca** nelle condizioni indicate in **Tabella 4** entry 6, 9, 12, 14 e 15.

I due idrazoni **31B,C**, nelle prove effettuate, hanno mostrato notevole differenza di reattività. Questa caratteristica potrebbe essere spiegata tramite un'ipotetica prototropia dell'idrazone **31C**, dovuta anche alla mobilità dell'idrogeno solfonammidico, in cui il carbonio imminico, che subisce l'attacco da parte del chetone, non è più l'elettrofilo ideale come nel caso del substrato **31B** (**Schema 10**).



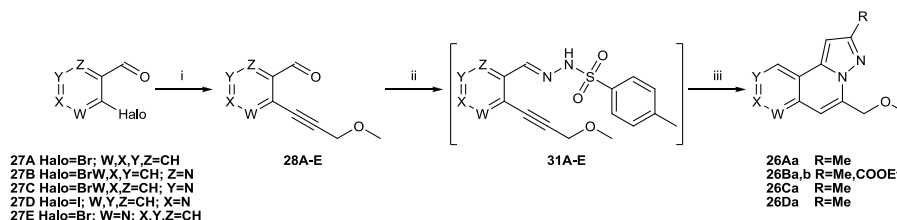
Schema 10. Ipotetica prototropia dell'idrazone **31C** che spiegherebbe la sua bassa reattività.

Per preservare la caratteristica di elettrofilo del carbonio idrazonico, ed evitare quindi il problema della prototropia, è stata condotta una reazione di *N*-ossidazione dell'azoto piridinico sia sull'aldeide **28C** sia sull'idrazone **31C** ma senza ottenere l'isolamento del corrispettivo *N*-ossido derivato. In seguito quest'ultimo sarebbe stato impiegato come substrato di partenza nella reazione *one-pot* per la formazione della piattaforma **C**.

Le metodiche che hanno dato migliori risultati in termini di resa sono quindi state applicate per ottenere le piattaforme **A-E** e i prodotti finali.

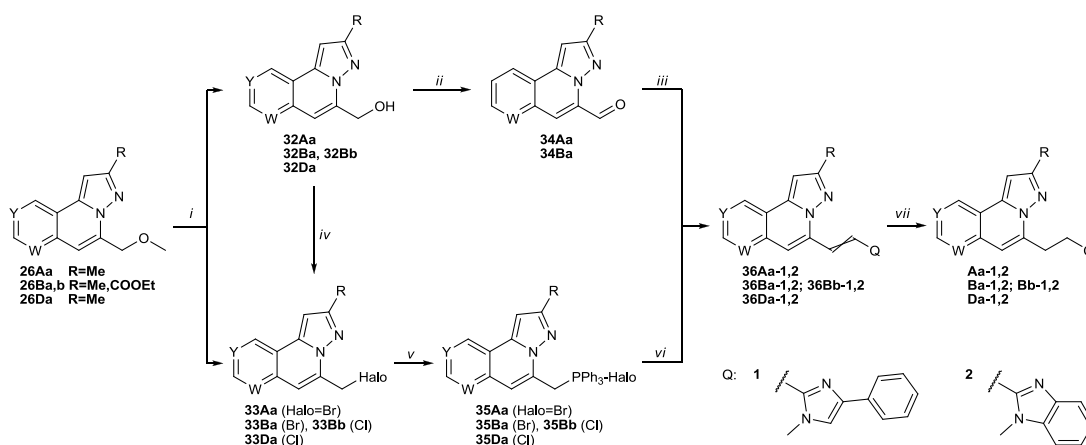
Sintesi dei prodotti Aa-1, Aa-2, Ba-1, Ba-2, Bb-1, Bb-2, Da-1, Da-2

Le aldeidi **27A-C,E** sono commercialmente disponibili, mentre la **27D** è stata ottenuta per trans-alogenazione dalla 4-cloronicotinaldeide⁶ impiegando sodio ioduro e acetil cloruro e conducendo la reazione in acetonitrile anidro a 0°C.



Schema 11. Applicazione della metodica *one-pot* per l'ottenimento delle piattaforme **A-E**. Reagenti e condizioni: *i*: metil propargil etere, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, TEA, DMF_{and}, 50°C, 20', MW; *ii*: PTSH, AgOTf, DL-Prolina, EtOH_{and}, N₂, t.a., 20'; *iii*: a) CH₃CO-R, 50-60°C, 30', MW; b) Na₂CO₃, t.a., 12h.

A partire dalle *o*-alogenoaldeidi **27A-E** è stata effettuata la reazione di Sonogashira impiegando come alchino il metil propargil etere, isolando così le *o*-alchinilaldeidi **28A-E**. Questa reazione è stata condotta a 50°C in 15 minuti al microonde (MW), ottenendo buone rese e una maggiore velocità di purificazione dei prodotti grezzi, rispetto alla stessa reazione condotta per 1h a temperatura ambiente descritta nello **Schema 6**. I composti **28A-E** sono stati dapprima convertiti nei corrispettivi tosilidrazoni **31A-E** (non isolati) in etanolo, in presenza di argento triflato e DL-Prolina, successivamente trattati con un metilchetone (acetone per le piattaforme **A-E**, ed etile piruvato solo per la piattaforma **B**) a 50°C al MW e poi con Na₂CO₃ a t.a. sino a completa formazione dei tricyclidi **26Aa, 26Ba, 26Bb, 26Da** in ottime rese (**Schema 11**).



Schema 12. Reagenti e condizioni: *i*: BBr₃, DCM_{and}, N₂, da -78°C a 0°C; *ii*: DMP, DCM, t.a.; *iii*: NaH, Q_{1,2}-PPh₃-Halo, DMF_{and}, 0°C; *iv*: SOCl₂, t.a.; *v*: PPh₃, MeCN_{and}, refluxo, 12h; *vi*: NaH, Q_{1,2}-CHO, DMF_{and}, 0°C; *vii*: PTSH, DMF_{and}, N₂, 120°C, 4-6h.

Il tricyclo **26Ca** è stato isolato solo in tracce (16%), mentre il composto **26Ea** non è stato isolato. Questo è dovuto all'azione dell'AgOTf che non attiva il triplo legame dell'alchino, come visto in precedenza, ma per via della posizione della funzione idrazonica rispetto all'azoto piridico, catalizza specificamente la ciclizzazione

dell'idrazone **31E**, con conseguente perdita del gruppo tosilico, evolvendo verso la formazione di una [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina (**50E** nella Parte Sperimentale).

Nello **Schema 12** è mostrata la sintesi che ha permesso l'ottenimento dei composti finali **Aa-1, Aa-2, Ba-1, Ba-2, Bb-1, Bb-2, Da-1, Da-2**. Gli intermedi **26Aa, 26Ba, 26Bb** e **26Da** sono stati sottoposti a reazione di demetilazione con BBr_3 in DCM anidro a -78°C per ottenere gli alcoli **32Aa, 32Ba, 32Bb** e **32Da** e come prodotti secondari i bromuri alchilici **33Aa** e **33Ba**.

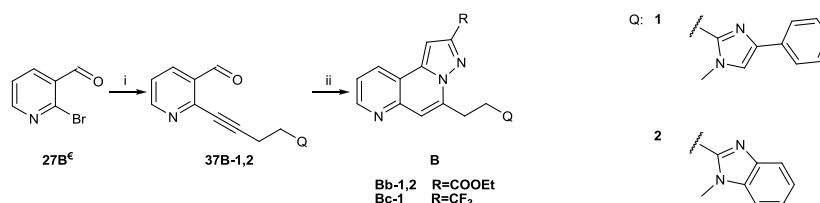
Gli alcoli **32Aa** e **32Ba** sono stati convertiti nelle aldeidi **34Aa** e **33Ba** impiegando DMP (Dess-Martin Periodinano) ottenendo buone rese di conversione. Impiegando come base NaH e il sale di fosfonio **51** (vedi parte sperimentale), le aldeidi **34Aa** e **34Ba**, sottoposte ad una reazione di Wittig, hanno prodotto gli alcheni **36Aa-1** e **36Ba-1**. Diversamente gli alcoli **32Bb** e **32Da**, per trattamento con cloruro di tionile, hanno condotto ai cloruri alchilici **33Bb** e **33Da**.

I bromo- e i cloro-derivati **33Aa, 33Ba, 33Bb, 33Da** sono stati convertiti nei corrispettivi sali di fosfonio **35Aa, 35Ba, 35Bb, 35Da**. Nella stessa condizione di reazione descritta per l'ottenimento degli alcheni **36Aa-1** e **36Ba-1**, impiegando la 4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-carbaldeide⁷⁷, sono stati ottenuti gli alcheni **36Aa-1, 36Bb-1, 36Da-1**.

Procedendo invece con la 1-metil-1*H*-benzimidazolo-2-carbaldeide⁶ sono stati isolati **36Ba-2, 36Bb-2, 36Da-2**. Infine tutti gli alcheni sono stati ridotti tramite tosilidrazide (*PTSH*) a 120°C in DMF anidra sotto N_2 per dare i prodotti finali **Aa-1, Aa-2, Ba-1, Ba-2, Bb-1, Bb-2, Da-1, Da-2**.

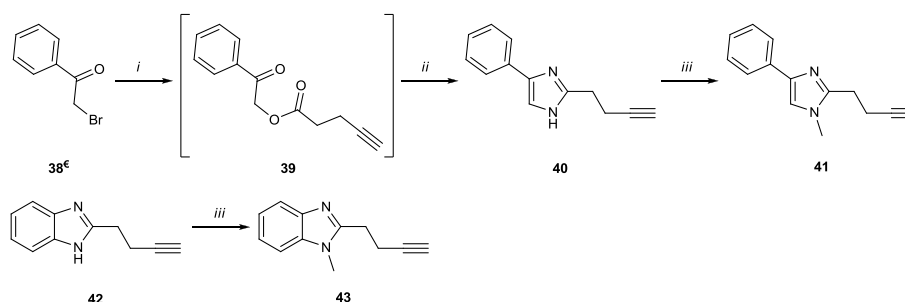
Ottimizzazione sintesi di derivati della piattaforma B

Sono state apportate delle modifiche alla via sintetica mostrata nello **Schema 11** per l'ottenimento di prodotti finali incorporanti nella loro struttura la piattaforma **B**. La strategia sintetica, illustrata nello **Schema 13**, prevede l'utilizzo di alchini terminali già recanti la porzione etilen-fenilimidazolica o etilen-benzimidazolica nella reazione di Sonogashira, consentendo così in soli due passaggi ed in ottime rese l'ottenimento dei prodotti finali desiderati.



Schema 13. Ottimizzazione della sintesi dei composti finali **B**. Reagenti e condizioni. *i*: **41** o **43**, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, TEA, DMF_{and}, 50°C, 20', MW; *ii*: a) PTSH, AgOTf, DL-Prolina, EtOH_{and}, N₂, t.a., 20'; b) CH₃CO-R, 50-60°C, 30'; c) Na₂CO₃, t.a., 12h.

La via sintetica illustrata nello **Schema 13** ha permesso di ripreparare più rapidamente i prodotti finali **Bb-1**, **Bb-2** e il nuovo composto **Bc-1**. A partire da **27B** sono state sintetizzate le *o*-alchinilaldeidi **37B-1**, **37B-2** impiegando come alchino il butinil-fenilimidazolo **41** ed il butinil-benzimidazolo **43**. Le *o*-alchinilaldeidi **37** sono state convertite nei prodotti finali **Bb-1**, **Bb-2**, **Bc-1** secondo la procedura *one-pot* descritta nello **Schema 11** per la sintesi dei composti di formula generale **26**, impiegando come metilchetoni l'etile piruvato per **Bb-1,2** e l'1,1,1-trifluoroacetone per **Bc-1**.

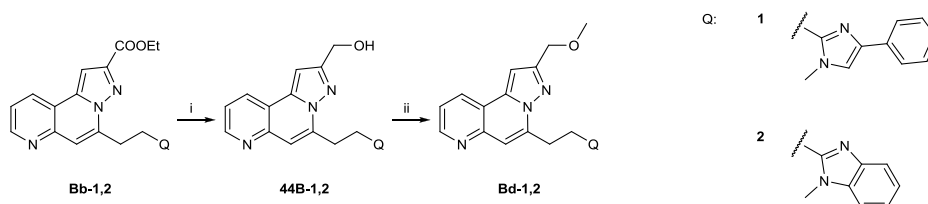


Schema 14. Sintesi degli alchini **41** e **43**. Reagenti e condizioni. *i*: a) 4-PA, Cs₂CO₃, DMF_{and}, b) **38**; *ii*: NH₄OAc, xylene, riflusso; *iii*: a) NaH, DMF_{and}, 0°C, 30'; b) MeI.

Le catene alchiniche necessarie per la sintesi degli intermedi **37B-1** e **37B-2** (**Schema 13**) sono state sintetizzate come illustrato nello **Schema 14**. La catena **41** è stata sintetizzata a partire dall'acido 4-pentinoico[€] (*4-PA*). Il *4-PA* è stato convertito facilmente nel sale di cesio impiegando Cs₂CO₃ in DMF anidra. In un secondo momento il sale è stato trattato con il 2-bromoacetofenone[€]**38** per dare il cheto-estere **39**. Quest'ultimo è stato convertito nell'imidazolo **40** con ammonio acetato in xylene a

riflusso usando una trappola di Dean-Stark. Il composto **40** è stato poi metilato, impiegando sodio idruro in THF anidro a 0°C e ioduro di metile, conducendo così all'alchino **41**. Analogamente a quanto descritto per l'alchino **41**, **43** è stato sintetizzato per metilazione del benzimidazolo **42**, quest'ultimo ottenuto a partire dalla fenilendiammina⁶ e dal 4-PA secondo quanto descritto in letteratura⁷⁸.

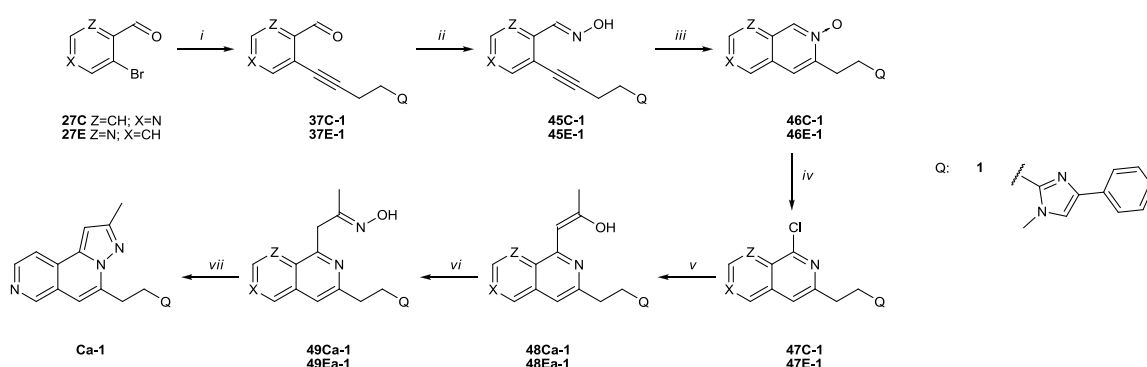
Inoltre, è stata modificata la funzione esterea dei composti **Bb-1**, **Bb-2** per ottenere i derivati metossimetilenici **Bd-1**, **Bd-2**(**Schema 15**). A partire quindi dagli esteri **Bb-1**, **Bb-2** è stata condotta una riduzione con NaBH₄ in etanolo a riflusso che ha fornito gli alcoli **44B-1** e **44B-2**. Il trattamento preliminare degli alcoli con sodio idruro in THF anidro a 0°C e la successiva aggiunta di ioduro di metile hanno permesso di isolare i due metileteri **Bd-1** e **Bd-2**.



Schema 15. Sintesi dei prodotti **Bd-1,2**. Reagenti e condizioni. *i*: NaBH₄, EtOH, riflusso; *ii*: a) NaH, DMF_{and}, 0°C, 30'; b) MeI.

Strategia di sintesi percorsa per l'ottenimento delle piattaforme C ed E.

La via sintetica illustrata nello **Schema 11** per la sintesi dei tricicli pirazolici **A**, **B** e **D** ha consentito di isolare l'intermedio triciclico **26Ca** con rese piuttosto basse, rendendo molto arduo il percorso sintetico per l'ottenimento dei prodotti finali desiderati. Inoltre tale procedura sintetica non ha consentito la preparazione dell'intermedio triciclico desiderato **26Ea**. Per tali ragioni, è stata adottata una nuova via di sintesi illustrata nello **Schema 16** nell'intento di preparare i prodotti finali incorporanti nella loro struttura le piattaforme **C** ed **E**. La strategia sintetica prevede la preparazione delle *o*-alchinilaldeidi **37C-1** e **37E-1** in analogia a quanto descritto per le *o*-alchinilaldeidi **37B-1,2** nello **Schema 13**.



Schema 16. Strategia sintetica seguita per la sintesi dei nuclei **C** ed **E**. Reagenti e condizioni. *i*: **41**, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, TEA, DMF_{and}, 50°C, 20', MW; *ii*: NH₂OH·HCl, AcONa·3H₂O, EtOH_{and}, t.a.; *iii*: K₂CO₃, EtOH_{and}; *iv*: POCl₃, MeCN, refluxo; *v*: isopropenil acetato, PhDavePhos, *n*Bu₃SnOMe, Pd₂(dba)₃, toluene_{and}, N₂, 100°C, 12h; *vi*: NH₂OH·HCl, AcONa·3H₂O, EtOH, t.a., 2h; *vii*: a) TFAA, TEA, DME_{and}, N₂, 0°C a t.a.; b) FeCl₂, 75°C.

Le *o*-alchinilaldeidi **37C-1** e **37E-1** così ottenute sono state trattate con idrossilammina cloridrato e sodio acetato in etanolo a t.a. per dare le corrispondenti ossime **45C-1** e **45E-1**. Queste sono state sottoposte a reazione di ciclizzazione a naftiridina-*N*-ossido **46C-1**, **46E-1** impiegando potassio carbonato in etanolo anidro. I composti **46** per trattamento con POCl₃ hanno consentito di isolare le cloronaftiridine **47C-1** e **47E-1** con rese soddisfacenti. Impiegando isopropenil acetato con tributil stagno metossido, PhDavePhos in toluene e catalizzando la reazione con Pd₂(dba)₃ a 100°C in atmosfera inerte è stato possibile convertire le cloronaftiridine **47** nei corrispondenti enoli **48Ca-1** e **48Ea-1**. Gli enoli **48**, sono stati convertiti nelle corrispondenti ossime **49Ca-1** e **49Ea-1**. L'ossima **49Ca-1** per trattamento con TFAA in DME anidro e TEA a 0°C in atmosfera d'azoto, e in seguito con FeCl₂ a 75°C, è stata convertita nel composto finale **Ca-1**. L'ossima **49Ea-1** sottoposta alle stesse condizioni di reazione non ha condotto purtroppo all'ottenimento del prodotto finale desiderato **Ea-1**. Attualmente si stanno sperimentando nuove condizioni di reazione.

CAPITOLO 3

Risultati Biologici e Docking molecolare

Risultati Biologici

La struttura e la relativa sigla delle molecole sintetizzate durante il periodo di dottorato sono elencate nella **Tabella 5**. Tali prodotti sono stati inviati alla Società *Lundbeck* per la valutazione della capacità inibente l'enzima PDE10A.

La capacità delle molecole di inibire l'idrolisi del cAMP, mediata dalla PDE10A, è stata misurata impiegando il ^3H -cAMP in un sistema *SPA* (*Scintillation Proximity Assay*) che prevede l'utilizzo di perle di silicato di ittrio. In questo test si sfrutta la maggiore affinità del prodotto di idrolisi ^3H -AMP rispetto al ^3H -cAMP per il silicato. La misurazione della radioattività residua delle perle di silicato di ittrio è stata quindi messa in correlazione con la potenza inibitoria, indicata come valori di IC_{50} , delle molecole testate a varie concentrazioni.

Al fine di valutare la selettività delle nuove molecole verso le altre forme di PDE, lo *screening* farmacologico è stato esteso anche ad altre 10 isoforme enzimatiche: PDE1B, PDE1C, PDE2, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE7B, PDE8A, PDE9, PDE11. Nella **Tabella 5** sono elencati i risultati preliminari e parziali di tale screening. Come si evince dalla tabella, la capacità inibente delle molecole testate verso tutte le isoforme in esame è stata valutata come percentuale di inibizione ad una determinata concentrazione e successivamente come IC_{50} per la sola isoforma PDE10A.

Considerando i valori relativi alle percentuali di inibizione, si evidenzia come le molecole testate esibiscano un notevole grado di selettività verso la PDE10A con percentuali di inibizione oscillanti tra il 73 ed il 102% alla concentrazione di $2\ \mu\text{M}$. Al contrario, alla concentrazione di $10\ \mu\text{M}$, nella maggior parte dei casi le molecole mostrano percentuali di inibizione inferiori al 50% verso tutte le altre isoforme, eccetto la PDE2A, verso cui alcune molecole (**Ba-1** e **Bb-2**) pare esibiscano una certa affinità (60 e 67% di inibizione a $2\ \mu\text{M}$).

Considerando i valori di IC_{50} delle molecole testate sulla PDE10A, è possibile delineare le prime considerazioni *SAR* su questa nuova classe di molecole. I composti **Ba-1** e **Da-1**, quali isomeri strutturali della molecola guida **14i**, esibiscono valore di IC_{50} molto simile a **14i** (**14i**: IC_{50} : 50 nM; **Ba-1**, IC_{50} : 40 nM; **Da-1**, IC_{50} : 55 nM). Questi risultati preliminari potrebbero indicare che la presenza dell'azoto chinazolinico nel sistema tricyclico **14i** non è fondamentale per l'attività, come potrebbe non esserlo l'azoto dell'anello piridinico presente nelle due pirazolo-naftiridine testate.

La sostituzione del gruppo CH_3 nel composto **Ba-1** con un gruppo COOC_2H_5 (**Bb-1**) determina una diminuzione di attività di circa 5 volte (**Ba-1** IC_{50} : 40 nM *versus* **Bb-1** IC_{50} :

220 nM). Tale comportamento potrebbe riferirsi al maggiore ingombro sterico esercitato dal voluminoso gruppo carbossietilico rispetto al gruppo metilico, oppure potrebbe essere spiegato considerando l'effetto elettronattrattore della funzione esterea sull'azoto pirazolico N₂, che in analogia alla triazolochinazolina **12** dovrebbe interagire con la **Gln716**, diminuendo così la sua capacità di accettore di legami a idrogeno. Inoltre è interessante notare come la sostituzione della porzione fenilimidazolica presente in **Ba-1** con la porzione benzimidazolica (**Ba-2**) determina una diminuzione di attività pari a circa 4 volte: **Ba-1** IC₅₀: 40 nM *versus* **Ba-2** IC₅₀: 170 nM. Un tale andamento negativo è possibile evidenziarlo, anche in modo più accentuato, confrontando i valori di IC₅₀ dei composti **Bb-1** e **Bb-2** (6 volte), **Da-1** e **Da-2** (9 volte).

Sigla	Test di inibizione su diverse isoforme (%)											PDE10A IC ₅₀ (nM)
	PDE1B 10µM	PDE1C 10µM	PDE2 2µM	PDE3A 10µM	PDE4D 10µM	PDE5A 10µM	PDE7B 10µM	PDE8A 10µM	PDE9 10µM	PDE10A 2µM	PDE11 10µM	
Aa-1	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Aa-2	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Ba-1	25	15	60	5	38	35	18	16	5	102	34	40
Ba-2	19	28	46	16	23	67	27	13	21	93	43	170
Bb-1	7	-20	2	13	45	13	-4	46	20	88	7	220
Bb-2	13	27	67	1	24	38	17	-6	-2	73	10	1300
Bc-1	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Bd-1	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Bd-2	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Ca-1	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Da-1	20	11	7	13	25	15	41	25	53	100	7	55
Da-2	18	10	52	30	15	39	-3	46	15	79	1	480

nt: non ancora testate.

Tabella 5. Risultati di inibizione enzimatica delle molecole testate espressi come percentuale di inibizione per le isoforme indicate e valori di IC₅₀ per la PDE10A.

Al fine di ottenere ulteriori informazioni relative allo studio SAR precedentemente illustrato, le molecole progettate sono state sottoposte a studi di docking molecolare sulla PDE10A.

Studio di Docking molecolare

Presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche dell'Università di Padova, nel laboratorio della Sezione di Modellistica Molecolare (MMS) di cui è responsabile il Prof. Stefano Moro, è stato effettuato un studio di docking molecolare del set di molecole presente in questo progetto di dottorato.

Un contributo nella progettazione di nuove molecole farmacologicamente attive è dato dall'utilizzo di software informatici per la predizione delle strutture tridimensionali dei complessi molecolari costituiti dal bersaglio macromolecolare, rappresentato spesso da un recettore o da un enzima, e da un ligando, una piccola molecola con attività farmacologica.

Il docking molecolare è una tecnica computazionale con cui si compie, entro certi limiti, una previsione della possibile posizione (*pose*) assunta da un ligando e dalle interazioni che quest'ultimo contrae con una macromolecola.⁷⁹

Il calcolo delle possibili *pose* avviene mediante un algoritmo di ricerca e l'ottimizzazione di una funzione matematica chiamata *scoring function*. La *scoring function* adempie due compiti: seleziona le conformazioni più probabili del complesso ligando-proteina (fase di *posing*), in seguito crea un database di conformazioni, ordinate per affinità, indicando in quale, tra i vari complessi, il ligando interagisce con la proteina nella modalità più corretta ed energeticamente più favorevole (fase di *ranking*).

Spesso non si esegue una ricerca conformazionale del ligando su tutta la superficie della proteina bersaglio, ma, anche per ridurre i tempi di calcolo, si focalizza l'attenzione su una ben determinata regione dello spazio, rappresentata soprattutto dal sito di *binding* che si presenta come una cavità o un'insenatura della superficie proteica.

Un altro aspetto che si considera è la mobilità delle strutture costituenti il complesso. Il problema è comunemente semplificato effettuando una prima approssimazione che considera la macromolecola (proteina) come un oggetto rigido. Questa condizione non rispecchia la realtà poiché il sistema *proteina* non è un sistema statico, gli atomi che la costituiscono possiedono dei gradi di libertà che dipendono principalmente dalla composizione chimica e dalla struttura spaziale della proteina e, secondariamente, anche dall'intorno chimico in cui essa è collocata.

L'energia libera di legame tra un ligando e la proteina può essere definita come differenza tra l'energia che il ligando possiede nel complesso e l'energia che invece dispone quando è solamente in contatto con il solvente. L'energia di binding può essere approssimata in una sommatoria di singoli componenti, apparentemente indipendenti

tra loro, valutati mediante funzioni a blocchi come la seguente equazione:

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{complex}^{solv} - \Delta G_{protein}^{solv} - \Delta G_{ligand}^{solv} + \Delta G_{int} - T\Delta S + \Delta\lambda$$

dove i primi tre termini rappresentano rispettivamente le energie di solvatazione del complesso proteina-ligando, della proteina e del ligando. L'elemento ΔG_{int} è l'energia di interazione tra il ligando e la proteina (interazioni di van der Waals ed elettrostatiche). Il termine $T\Delta S$ considera le variazioni entropiche del ligando e della proteina e l'ultimo termine $\Delta\lambda$ incorpora i cambi conformazionali nel ligando e nella proteina avvenuti in seguito alla formazione del complesso. In quest'ultimo parametro rientrano tutti quei contributi come le energie di legame (stretching, bending, torsionale, etc.).⁸⁰

Scelta del modello cristallografico e protocollo di docking utilizzato

Nel *Protein Data Bank* sono disponibili moltissimi dati cristallografici riguardanti la PDE10A in complessi con diverse molecole, tra cui i substrati endogeni, AMP e GMP, e con i suoi inibitori, alcuni di questi sono stati discussi nei precedenti paragrafi.

Il set di molecole presente in questo progetto di dottorato è costituito da strutture bioisosteriche della triazolochinazolina **12**, aventi quindi un volume molecolare e gradi di libertà molto simili tra loro. Conseguentemente per uno studio di docking è stato preso in considerazione solo il cristallo dell'enzima PDE10A legante il composto **12**. In particolare, è stata presa in esame la struttura del dominio catalitico dell'enzima (**Fig. 17. PDB code: 2Y0J**).

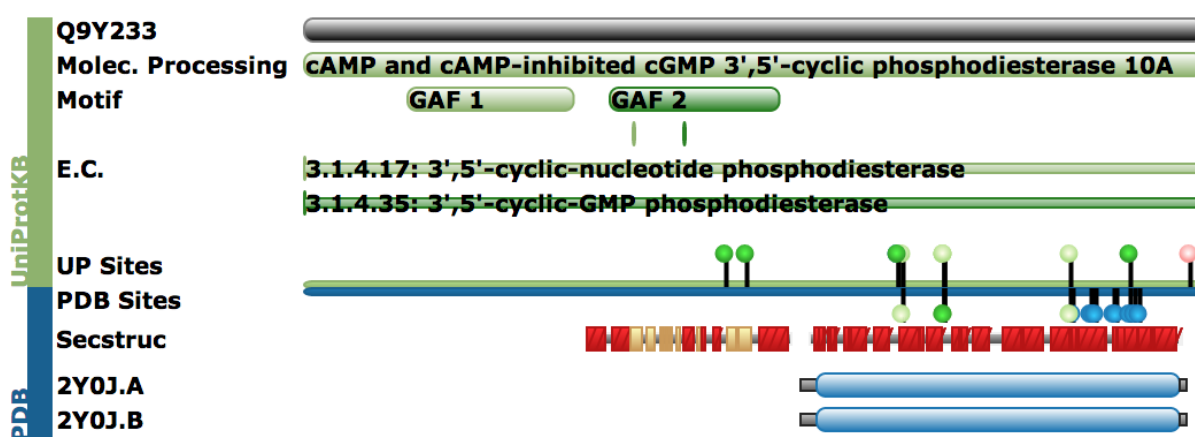


Figura 17. Descrizione molecolare della PDE10A. In basso, colorate in celeste, sono indicate le due catene **A** e **B** riguardanti i domini catalitici presenti nel file PDB **2Y0J**. Immagine modificata da <http://www.rcsb.org/pdb/protein/Q9Y233>.

Inizialmente è stato analizzato il file della proteina, le cui caratteristiche sono elencate in **Tabella 6**. Il cristallo possiede una buona risoluzione e *R-Value* e *R-Free* rientrano nei valori tipici (0.2).

PDB	Risoluzione (Å)	R-Value	R-Free	Dimensioni cella			
				Dimensioni (Å)	Angoli (°)		
2Y0J	2.43	0.224	0.284	a	49.38	α	90.00
				b	81.69	β	90.00
				c	160.62	γ	90.00

Tabella 6. Dati cristallografici del complesso *sito catalitico PDE10A-12* (PDB**2Y0J**).

Nel file PDB sono presenti due catene, **A** e **B**, in entrambe il ligando **12** è collocato all'interno della tasca enzimatica. Le due conformazioni assunte da **12** sono molto simili per quanto riguarda il sistema tricyclico della molecola, quest'ultimo, posizionandosi nella *P-clamp*, mantiene l'interazione tra l'azoto pirazolico e la **Gln716**. Le due strutture differiscono invece per la posizione assunta dal pendaglio benzimidazolico: nella catena **A** si dirige verso la regione *lid* dell'enzima, mentre nella catena **B** contrae interazioni con la **Tyr683** della tasca idrofobica Q_2 comportandosi appunto come *dual glutamine-*

tyrosine binders (**Fig. 18**). Vista la differenza tra i due complessi, sono state considerate entrambe le due conformazioni del ligando per la costruzione di un modello su cui effettuare il docking di **12**. In seguito, il protocollo di docking ottimizzato è stato applicato al set delle molecole progettate.

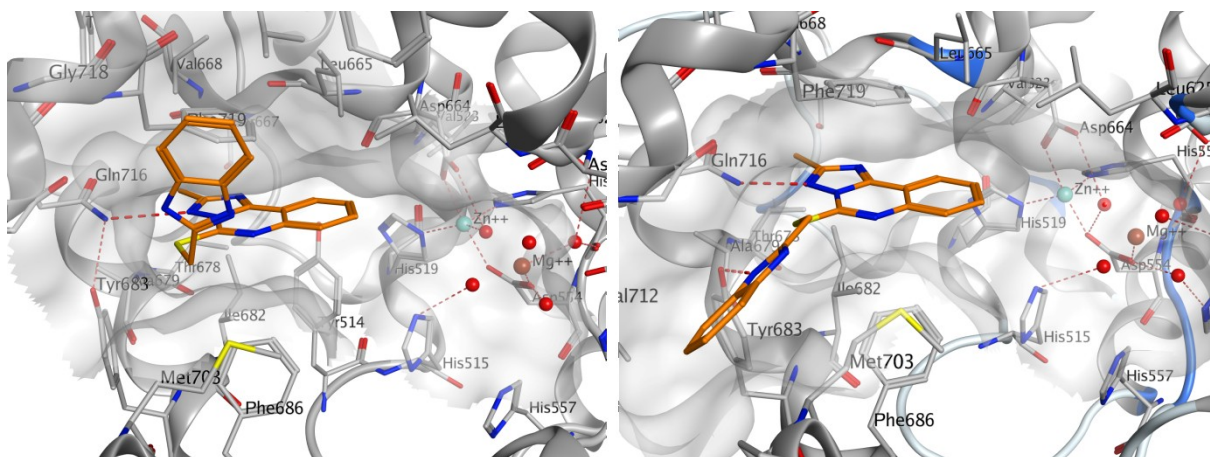


Figura 18. Conformazione del ligando **12** all'interno del sito catalitico della catena **A** (sinistra) e **B** (destra). Nella catena **A** è persa l'interazione dello spezzone benzimidazolico con la **Tyr683**, mantenuta invece nel caso della catena **B**. PDB code: **2Y0J**.

La **Figura 19** mostra il *binding mode* di una delle *pose* del composto **Ba-1**. Come si può notare anche questo composto rientrerebbe nella classe dei *dual glutamine-tyrosine binders*. Infatti, rimangono costanti le interazioni a ponte idrogeno dell'azoto N₂ pirazolico con la **Gln716** e dell'azoto N₃ imidazolico con la **Tyr683**. Nella *pose* scelta sono inoltre evidenziate anche le interazioni idrofobiche che **Ba-1** contrae con l'enzima: il sistema triciclico interagisce con la **Phe719** e l'**Ile682**, lo spezzone fenilimidazolico interagisce con la **Met703**. Infine, sono evidenziate le zone di esposizione al solvente del ligando mediante circonferenze, colorate in blu, la cui dimensione è in funzione di tale esposizione.

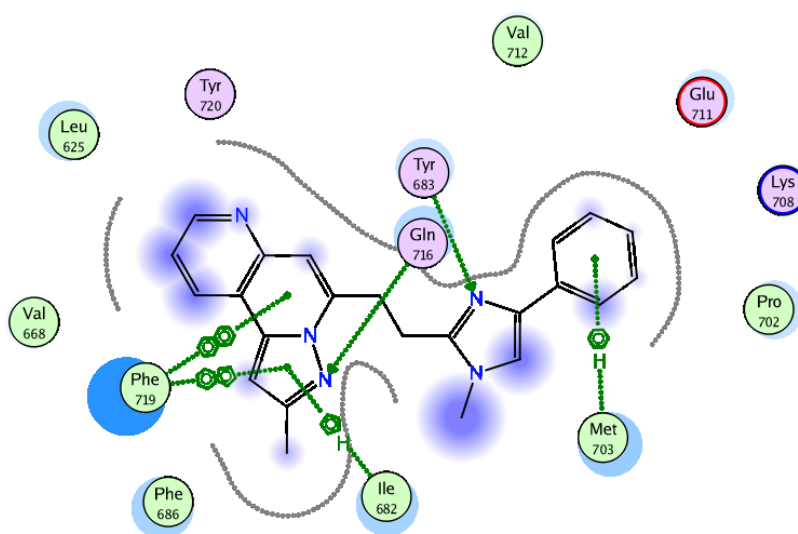


Figura 19. Modalità di legame del composto **Ba-1** nel sito catalitico della PDE10A.

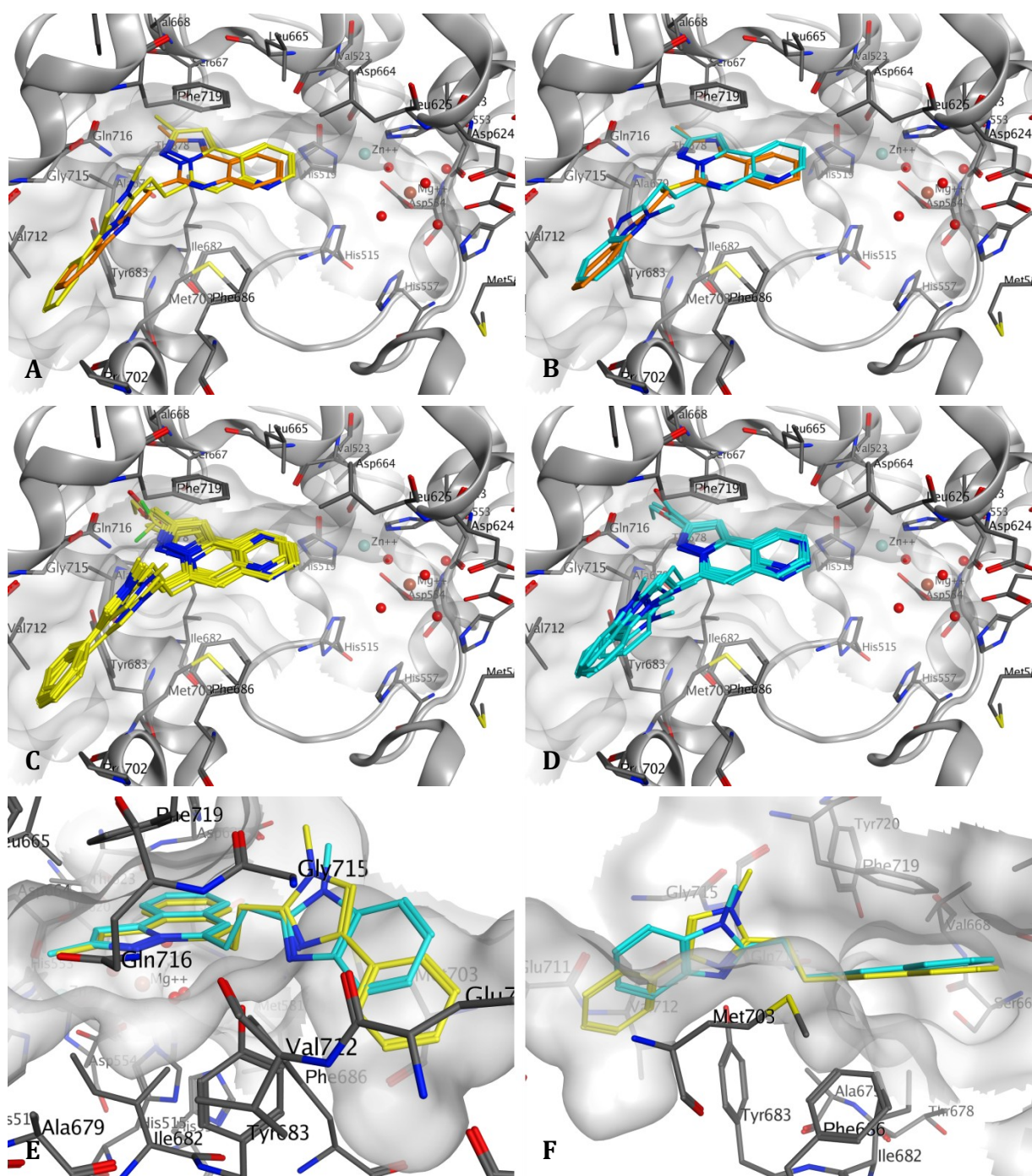


Figura 20. Sovrapposizione delle molecole progettate. In **A** e **B** sono rappresentati rispettivamente i composti **Ba-1** (giallo) e **Ba-2** (ciano) sovrapposti al ligando **12** (arancio). Al centro sono mostrate le sovrapposizioni di tutti i derivati fenilimidazolici (**C**) e benzimidazolici (**D**) progettati. Sotto, in **E** e **F**, è mostrata la differenza tra il composto **Aa-1** (giallo) e **Aa-2** (ciano) per quanto riguarda il diverso comportamento della catena fenil- e benzimidazolica nella tasca Q_2 dell'enzima.

Nella **Figura 20** sono mostrate le varie *pose* ottenute relative ai derivati fenil- e benzimidazolici. Si può vedere nei riquadri **A** e **B** che le strutture di **Ba-1** e **Ba-2** si sovrappongono molto bene alla triazolochinazolina **12**, mantenendo le interazioni con gli stessi residui: l'azoto pirazolico con la **Gln716** e l'azoto imidazolico con la **Tyr683**.

Al centro della **Figura 19** è stata effettuata anche una sovrapposizione di tutti i composti, raggruppati in derivati fenilimidazolici (riquadro **C**) e benzimidazolici (**D**). L'analisi di tali immagini evidenzia che le piattaforme **A-E** non cambiano il *binding*

moderispetto a **12**. In tutti i derivati, infatti, la piattaforma triciclica si dispone nella *P-clamp* del sito catalitico e il pendaglio imidazolico si colloca nella tasca di selettività Q_2 .

Infine, nei riquadri **E** e **F**, sono mostrate due diverse *viste* della sovrapposizione tra il derivato fenilimidazolico **Aa-1** e l'analogo benzimidazolico **Aa-2** che potrebbero spiegare la differenza nei valori di IC_{50} dei composti testati. Infatti, nel riquadro **E**, è messa in evidenza la capacità del fenile imidazolico di posizionarsi in maggiore profondità nella tasca idrofobica Q_2 . Questa caratteristica donerebbe al composto un incremento di attività per via delle maggiori interazioni idrofobiche che tale sostituente contrae con i residui che descrivono la tasca. Nel riquadro **F**, invece, si può notare la maggiore esposizione al solvente della catena benzimidazolica rispetto a quella fenilimidazolica.

Un'ulteriore analisi qualitativa delle *pose* ottenute è stata effettuata mediante MOE, usufruendo dello script *scoring.svl*, un algoritmo che permette di calcolare le percentuali di interazione a ponte idrogeno delle molecole progettate con i residui amminoacidici. Tale analisi ha consentito di riscontrare un'ulteriore possibile interazione nel caso dei derivati **Bd-1** e **Bd-2**; infatti, la catena metossimetilenica dell'anello pirazolico si comporterebbe da accettore nei confronti della **Ser667** sita nella parete posteriore alla *P-clamp* (**Fig. 21**).

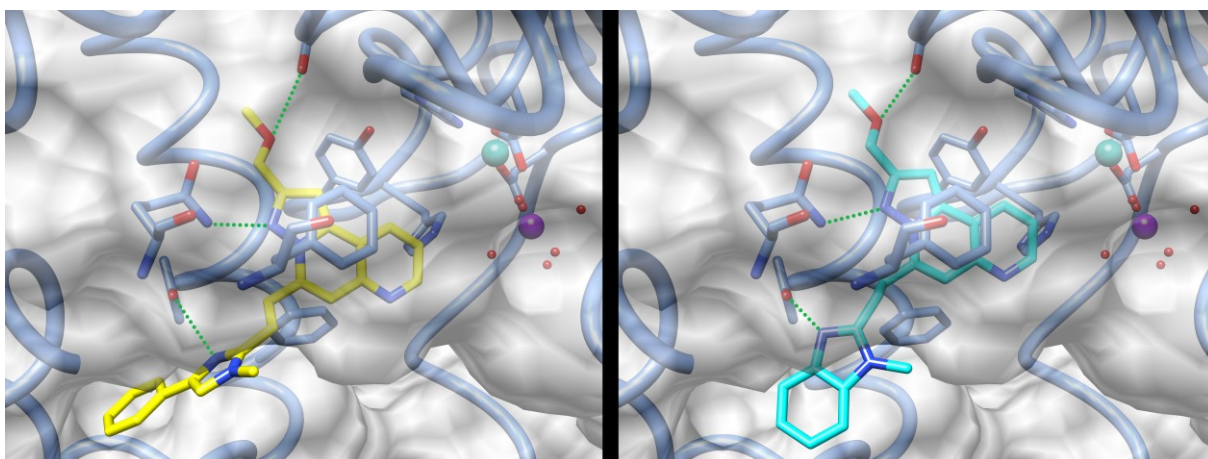


Figura 21. Visualizzazione delle interazioni a ponte idrogeno dei due derivati **Bd-1** (giallo) e **Bd-2** (ciano). Questi derivati potrebbero avere una terza interazione con il residuo **Ser667**.

Dalla **Tabella 7** si evince che tutti i derivati possiedono valori molto simili tra loro riguardanti la percentuale di interazione con la **Gln716** e la **Tyr683**, mostrando valori al di sopra dell'80% (**Tab. 7**).

Inoltre, lo stesso script, consente di *pesare* separatamente l'influenza dei legami a idrogeno (**pKi H-bond**) e delle interazioni idrofobiche (**pKi Hydroph**) che si stabiliscono tra la proteina e la *pose* generata. Infatti, in **Tabella 7**, sono elencate le

pK_i teoriche che considerano i due tipi di interazione, a ponte idrogeno e idrofobica, e da queste la possibile ***pK_i*** predittiva dell'attività dei composti considerati. Si può notare come tale parametro risenta principalmente dell'interazione idrofobica. Pertanto, ci si potrebbe aspettare che i derivati pirazolo-isochinolinici, **Aa-1** e **Aa-2** (al momento non ancora testati), avendo una maggiore ***pK_i* Hydroph.** rispetto alle analoghe pirazolo-naftiridine, dovrebbero esibire una maggiore attività. Tale predizione di attività è supportata dalla maggiore attività dei derivati fenilimidazolici (**Ba-1**, **Bb-1**, **Da-1**), in cui prevalgono le interazioni idrofobiche, rispetto agli analoghi benzimidazolici (**Ba-2**, **Bb-2**, **Da-2**).

Viceversa, nei derivati metossimetilenici **Bd-1** e **Bd-2** si ha un incremento di ***pK_i* H-bond** (1.9 contro il valore medio di 1.5), dovuto all'ulteriore interazione con la serina, suggerendo un possibile aumento di attività dei composti se confrontati con gli analoghi metilici **Ba-1** e **Ba-2**.

Composto	Interazione% Gln716	Interazione % Tyr683	Interazione % Ser667	<i>pK_i</i> H-bond	<i>pK_i</i> Hydroph	<i>pK_i</i>	IC ₅₀ (nM)
Aa-1	90	80	-	1.5	6.6	8.3	nt
Aa-2	85	79	-	1.4	5.7	8.0	nt
Ba-1	85	80	-	1.4	5.5	7.2	40
Ba-2	87	88	-	1.5	4.7	7.1	170
Bb-1	87	80	-	1.4	6.2	7.2	220
Bb-2	88	70	-	1.4	5.1	6.5	1300
Bc-1	79	62	-	1.2	6.4	7.5	nt
Bd-1	85	82	52	1.9	5.7	7.6	nt
Bd-2	85	71	59	1.9	4.7	7.1	nt
Ca-1	90	79	-	1.5	5.8	7.5	nt
Da-1	86	83	-	1.5	5.6	7.4	55
Da-2	88	75	-	1.4	4.7	6.9	480
Ea-1	90	81	-	1.5	5.5	7.2	nt

Tabella 7. Elenco delle molecole progettate con le percentuali di interazione.

Conclusioni

Il lavoro svolto nei tre anni di dottorato ha consentito di sintetizzare nuovi ligandi per l'enzima PDE10A strutturalmente caratterizzati da piattaforme tricicliche angolari a struttura pirazolo-isochinolinica e pirazolo-naftiridinica recanti una catena laterale di tipo etil-fenilimidazolico/etil-benzimidazolico.

Nello specifico, sono state adottate nuove strategie di sintesi per incrementare le rese delle reazioni e ridurre il numero totale dei passaggi nell'intento di ottenere più rapidamente i prodotti finali desiderati.

I processi sintetici adottati hanno inoltre permesso la farmacomodulazione delle piattaforme tricicliche attraverso l'introduzione di vari sostituenti.

Alcune delle molecole sintetizzate, sottoposte a studi di inibizione enzimatica, evidenziano una capacità inibente l'enzima PDE10A con valori di IC_{50} oscillanti fra 40 e 1300nM.

Inoltre, studi preliminari di docking molecolare effettuati sulle molecole progettate, forniscono utili informazioni sulla modalità di legame di tali molecole nel sito catalitico dell'enzima. Infine, tali studi sono stati utili per la predizione dell'attività di molecole non ancora testate.

CAPITOLO 4

Parte Sperimentale

Procedure generali.

I punti di fusione sono stati determinati con l'apparecchio Kofler e non sono corretti. Per la cromatografia su strato sottile sono state utilizzate lastre di gel di silice del tipo ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄.

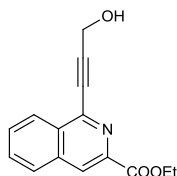
I composti sono stati purificati per flash cromatografia (FC) su gel di silice (SiO₂) Merck® 230-400 mesh (40-63µm) eluendo con appropriate miscele di solventi.

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati a temperatura ambiente con uno spettrofotometro tipo Varian Unity-200, utilizzato a 200MHz e come standard interno il TMS. I *chemicalshifts* sono stati espressi in unità δ o ppm e le costanti di accoppiamento J in Hz. Le molteplicità sono state indicate come: s (singoletto), brs (singoletto allargato), d (doppio), t (tripletto), dd (doppio doppio), dt (doppio tripletto), m (multipletto). I dati spettroscopici concordavano con le strutture attribuite.

La spettrometria di massa è stata condotta con uno spettrometro tipo Agilent 1100 series LC/MSD per iniezione diretta utilizzando una miscela MeOH:H₂O 80:20.

Tutte le reazioni che impiegavano reagenti sensibili all'aria o all'umidità sono state eseguite in atmosfera inerte di azoto o argon. Tutti i materiali, i solventi, i reagenti necessari per la preparazione dei composti finali sono stati acquistati da fornitori specializzati.

Etile 1-(3-idrossiprop-1-in-1-il)isochinolina-3-carbossilato
17A



In atmosfera inerte, ad una miscela di bromoestere **16A** (50mg, 0.178mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.016eq.), CuI (0.03eq.) in THF anidro (10mL) sono stati addizionati l'alcol propargilico (1.9eq) e TEA (60eq.). La miscela è stata agitata a t.a. per 2.5h. Il solvente è stato evaporato ed il grezzo è stato ripreso con AcOEt. La fase organica è stata successivamente lavata con acqua, soluzione satura di NaCl, anidrificata con Na₂SO₄ ed infine evaporata.

Il prodotto grezzo è stato purificato per FC (CHCl₃/CH₃OH 95:5) per ottenere il composto **17** come solido bruno.

Resa: 86%

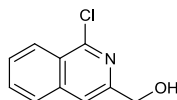
R.f. (CHCl₃/CH₃OH 95:5): 0.30

P.f.: 136-137°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.54 (s, 1H), 8.50-8.45 (m, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.80-7.77 (m, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.53 (q, J=7.2Hz, 2H), 2.70 (brs, 1H), 1.48 (t, J=7.2Hz, 3H).

API-ES m/z: 255.10 [M]⁺.

1-cloro-3-(idrossimetil)isochinolina
21A



In atmosfera inerte, ad una miscela dell'estere **20A** (0.32g, 1.36mmol) in etanolo anidro (4mL) è stato aggiunto NaBH₄ (1.14eq.) e la soluzione risultante è stata refluita per 2h. Dopo raffreddamento, la miscela è stata addizionata di una soluzione satura di NaCl ed estratta diverse volte con DCM. La fase organica è stata essicata con Na₂SO₄ ed evaporata per dare 210mg di **21A** come solido beige, utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

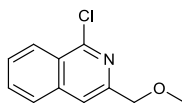
Resa: 80%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.52

P.f.: 96-97°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.32 (d, *J*=7.2Hz, 1H), 7.86-7.71 (m, 3H), 7.66 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.10 (brs, 1H).

1-cloro-3-(metossimetil)isochinolina
22A



Una miscela dell'alcol **21A** (1g, 5.38mmol) in THF anidro (25mL) è stata raffreddata in bagno di ghiaccio ed addizionata di NaH (3eq.). La sospensione risultante è stata agitata per 1h al di sotto di 10°C, dopodichè è stata addizionata goccia a goccia di MeI (3eq.) e successivamente agitata a t.a. per 2h. La sospensione è stata evaporata, ed il residuo grezzo è stato ripreso con AcOEt. La fase organica è stata lavata con H₂O, soluzione satura di NaCl, essicata con Na₂SO₄ ed evaporata per ottenere un solido giallo (939mg) che è stato utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

Resa: 85%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.63

P.f.: 46-47°C

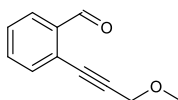
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.32 (d, *J*=7.4Hz, 1H), 7.86-7.62 (m, 3H), 7.70 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.55 (s, 3H).

Metodo generale I riguardante la reazione di Sonogashira per la preparazione dei composti 28A, 28B, 28C, 28D, 28E, 37B-1, 37B-2, 37C-1, 37E-1.

Procedura A: In atmosfera inerte, ad una soluzione composta dall'appropriata alogenaldeide (2.60mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.04eq.), CuI (0.075eq.) in DMF anidra (15mL), sono stati addizionati l'alchino (1.25eq.) e TEA (1.53eq.); la miscela risultante è stata agitata a t.a. per 1h. e quindi versata in H₂O. La soluzione acquosa è stata estratta con Et₂O, e la fase organica successivamente lavata con H₂O, con una soluzione satura di NaCl, essicata con Na₂SO₄ ed infine è stata evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato per FC per dare i composti desiderati analiticamente puri.

Procedura B: Ad una *vial* contenente una soluzione costituita dall'appropriata aldeide (0.8mmol), alchino (1.2eq.), CuI (0.07eq.) Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.03eq.), in DMF anidra (1mL/eq.), è stata addizionata di TEA (1.53eq.). La miscela risultante è stata riscaldata al microonde a 50°C per 20 minuti (70°C per 2h per il derivato **28A**). La miscela è stata addizionata di Et₂O, filtrata ed il solido è stato lavato più volte con Et₂O. Le fasi organiche sono state riunite, essicate con Na₂SO₄ ed evaporate per dare un prodotto grezzo che è stato purificato con FC.

2-(3-metossiprop-1-inil)benzaldehyde
28A⁸¹



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale I a partire dalla 2-bromobenzaldeide⁶.

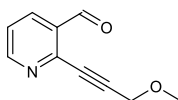
È stato purificato con FC (PE/AcOEt 8:2) per ottenere un olio giallino.

Resa: 91%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.61

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.53 (s, 1H), 7.93 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.59-7.56 (m, 2H), 7.52-7.44 (m, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.48 (s, 3H).

3-formil-2-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridina
28B



Sintetizzato mediante la procedura A del metodo generale I a partire dall'aldeide **27B**[€]. È stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido beige.

Resa: 90%

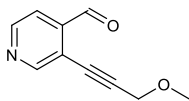
R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.23

P.f.: 53-55°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.53 (s, 1H), 8.78 (dd, *J*=1.8Hz e 4.8Hz, 1H), 8.18 (dd, *J*=1.8Hz e 7.9Hz, 1H), 7.41 (dd, *J*=4.7Hz e 7.8Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.48 (s, 3H).

API-ES m/z: 176.0 [M+H]⁺.

4-formil-3-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridina
28C



Sintetizzato mediante la Procedura A del metodo generale I a partire dall'aldeide **27C**.
E' stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido beige.

Resa: 81%

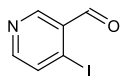
R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.24

P.f.: 56-57°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.52 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.74 (d, J=5Hz, 1H), 7.70 (d, J=5Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.50 (s, 3H).

API-ES m/z: 176.0 [M+H]⁺.

3-formil-4-iodopiridina
27D



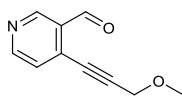
In atmosfera inerte, ad una soluzione di 4-cloronicotinaldeide^e (2.77mmol) in CH₃CN anidro (50mL) è stato addizionato NaI (20eq.). La miscela è stata raffreddata a 0°C e addizionata di acetil cloruro (3eq.). Terminata l'aggiunta, la soluzione è stata riportata a t.a. e agitata per 1h. La miscela è stata versata in ghiaccio, neutralizzata lentamente con una soluzione satura di NaHCO₃ ed estratta diverse volte con DCM. La fase organica è stata successivamente lavata con una soluzione satura di Na₂S₂O₃, H₂O, soluzione satura di NaCl, anidrificata con Na₂SO₄ ed infine è stata evaporata per ottenere il composto **27D** come solido giallo (493 mg) utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

Resa: 77%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.47

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.09 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.34 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.92 (d, J=4.8Hz, 1H).

3-formil-4-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridina
28D



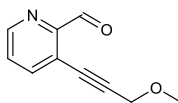
Sintetizzato mediante la Procedura A del metodo generale I a partire dall'aldeide **27D**. È stato purificato per FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido giallo.

Resa: 65%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.34

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.51 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.76 (d, *J*=5.2Hz, 1H), 7.44 (d, *J*=5.2Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.49 (s, 3H).

2-formil-3-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridina
28E



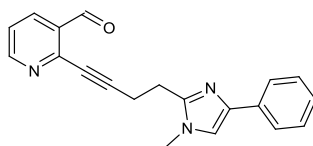
Sintetizzato mediante la Procedura A del metodo generale I a partire dall'aldeide **27E**.
E' stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un olio verde scuro.

Resa: 47%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 1:1): 0.60

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.32 (s, 1H), 8.75 (dd, *J*=1.4Hz e 4.6Hz, 1H), 7.93 (dd, *J*=1.4Hz e 7.8Hz, 1H), 7.50 (dd, *J*=4.6Hz e 7.8Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.52 (s, 3H).

2-(4-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)but-1-inil)-3-formilpiridina
37B-1



Sintetizzato mediante la Procedura *B* del metodo generale I a partire dall'aldeide **27B^ε** impiegando l'alchino **41**.

E' stato purificato con FC in gradiente (AcOEt/PE 6:4→AcOEt) per ottenere un solido giallo.

Resa: 60%

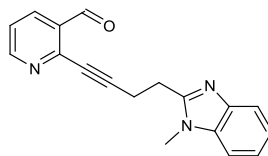
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0.13

P.f.: 98-100°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.45 (s, 1H), 8.74 (d, *J*=2.6Hz, 1H), 8.14 (d, *J*=6Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=7.2Hz, 2H), 7.36 (t, *J*=7.2Hz, 2H), 7.27-7.21 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.10 (s, 4H).

API-ES m/z: 316.0 [M+H]⁺.

2-(4-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)but-1-inil)-3-formilpiridina
37B-2



Sintetizzato mediante la Procedura *B* del metodo generale I a partire dall'aldeide **27B^e** impiegando l'alchino **43**.

E' stato purificato con FC in gradiente (AcOEt/PE 6:4→AcOEt) per ottenere un solido beige.

Resa: 82%

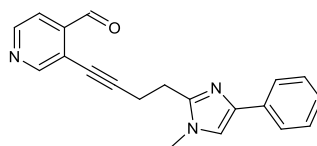
R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.46

P.f.: 84-86°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.49 (s, 1H), 8.75 (dd, *J*=1.6Hz e 4.6Hz, 1H), 8.14 (dd, *J*=1.6Hz e 7.8Hz, 1H), 7.76-7.73 (m, 1H), 7.39-7.24 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.31-3.18 (m, 4H).

API-ES m/z: 290.0 [M+H]⁺.

3-(4-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)but-1-inil)-4-formilpiridina
37C-1



Sintetizzato mediante la Procedura *B* del metodo generale I a partire dall'aldeide **27C^e** impiegando l'alchino **41**.

E' stato purificato con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallo.

Resa: 90%

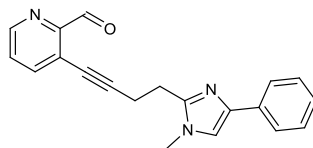
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0.22

P.f.: 118-119°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.42 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.67 (d, *J*=5Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=7.8Hz, 2H), 7.64 (d, *J*=5Hz, 1H), 7.36 (t, *J*=7.4Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=7.4, 1H), 7.12 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.08 (s, 4H).

API-ES m/z: 316.0 [M+H]⁺.

3-(4-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)but-1-inil)-2-formilpiridina
37E-1



Sintetizzato mediante la Procedura *B* del metodo generale I a partire dall'aldeide **27E** impiegando l'alchino **41**.

E' stato purificato con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallino.

Resa: 62%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.23

P.f.: 104-105°C

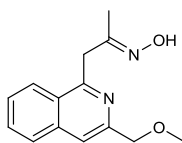
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.31 (s, 1H), 8.70 (dd, *J*=1.6Hz e 4.4Hz, 1H), 7.83 (dd, *J*=1.6Hz e 8Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=7Hz, 2H), 7.44-7.21 (m, 4H), 7.11 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.14-3.07 (m, 4H).

API-ES m/z: 316.0[M+H]⁺.

Metodo generale II per la sintesi delle ossime 24Aa, 24Ba, 24Ca, 29B, 29C 45C-1, 45E-1, 49Ca-1, 49Ea-1.

Una soluzione composta dall'appropriata aldeide (16mmol), $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1.5eq.) e $\text{AcONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.5eq.) in etanolo assoluto (5mL/mmol), è stata agitata a t.a. per 4h. La soluzione etanolica è stata evaporata ed il residuo solido è stato estratto più volte con Et_2O . La fase organica è stata essicata con Na_2SO_4 ed evaporata per dare un prodotto solido che è stato purificato con FC o utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

1-(3-(metossimetil)isochinolin-1-il)propan-2-one ossima
24Aa



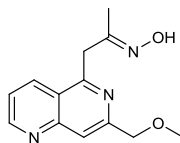
Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'enolo **23Aa**.
E' stata purificata con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallo.

Resa: 83%

P.f.: 113-116°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.23 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.81 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.61-7.54 (m, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.55 (s, 3H), 1.88 (s, 3H).

1-(7-(metossimetil)-1,6-naftiridin-5-il)propan-2-one ossima
24Ba



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'enolo **23Ba**.
E' stata purificata con FC (AcOEt) per ottenere un solido giallino.

Resa: 92%

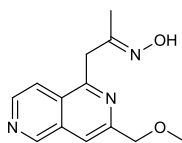
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 9:1): 0.46

P.f.: 99-101°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.07 (s, 1H), 8.62-8.58 (m, 1H), 7.95 (s, 1H),
7.53-7.47 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.56 (s, 3H), 1.90 (s, 3H).

API-ES m/z: 246.0 [M+H]⁺

1-(7-(metossimetil)-1,6-naftiridin-5-il)propan-2-one ossima
24Ca

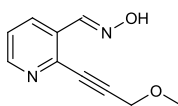


Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'enolo **23Ca**.
E' stata isolata come un solido giallino senza ulteriore purificazione.

Resa: 84%

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.29 (s, 1H), 8.60 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.98 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.57 (s, 3H), 1.90 (s, 3H).

2-(3-metossiprop-1-in-1-il)nicotinaldeide ossima
29B



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'aldeide **28B**.
E' stata isolata come un solido giallo senza ulteriore purificazione.

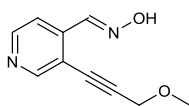
Resa: 87%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.16

P.f.: 97-99°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.97 (brs, 1H), 8.58-8.61 (m, 2H), 8.18 (dd, *J*=1.2Hz e 8.2Hz, 1H), 7.28-7.32 (m, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.50 (s, 3H).

3-(3-metossiprop-1-in-1-il)isonicotinaldeide ossima
29C



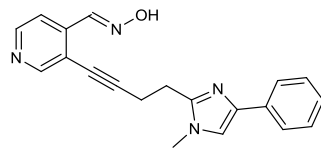
Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'aldeide **28C**.
E' stata isolata come solido giallino senza ulteriore purificazione.

Resa: 82%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.08

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.73 (s, 1H), 8.51-8.54 (m, 2H), 7.74 (d, J=5.4Hz, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.49 (s, 3H).

3-(4-(1-metil-4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)but-1-inil)isonicotinaldeide ossima
45C-1



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'aldeide **37C-1**.
E' stata isolata come solido giallino senza ulteriore purificazione.

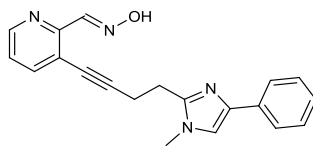
Resa: 60%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.45

P.f.: 145-147°C

API-ES m/z: 331.0 [M+H]⁺.

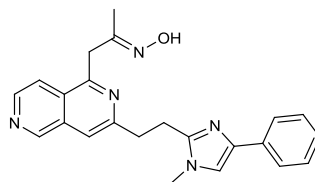
3-(4-(1-metil-4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)but-1-inil)picolinaldeide ossima
45E-1



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'aldeide **37E-1**.
Non è stata isolata dalla miscela di reazione e la sua soluzione è stata utilizzata nella reazione successiva per la sintesi della corrispondente naftiridina-*N*-ossido **46E-1**.

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0.22

1-(7-(metossimetil)-1,6-naftiridin-5-il)propan-2-one ossima
49Ca-1



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'enolo **48Ca-1**.
E' stata purificata con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido giallo.

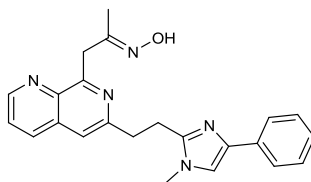
Resa: 86%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 9:1): 0.33

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.17 (s, 1H), 8.56 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.90 (d, *J*=6Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=7.4Hz, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.35 (t, *J*=8Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 4.18 (s, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.42 (t, *J*=8Hz, 2H), 3.24 (t, *J*=8Hz, 2H), 1.95 (s, 3H).

API-ES m/z: 386.0 [M+H]⁺.

1-(7-(metossimetil)-1,6-naftiridin-5-il)propan-2-one ossima
49Ea-1



Sintetizzata mediante il metodo generale II a partire dall'enolo **48Ea-1**.
E' stata isolata con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido giallino.

Resa: 94%

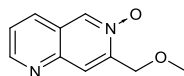
P.f.: 105-107°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.92 (d, *J*=2.6Hz, 1H), 7.98 (d, *J*=8Hz,), 7.72 (d, *J*=7.2Hz, 2H), 7.52-7.17 (m, 5H), 6.95 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.36 (t, *J*=7.8Hz, 2H), 3.21 (t, *J*=7.8Hz, 2H), 2.00 (s, 3H).

Metodo generale III per la sintesi delle naftiridine-*N*-ossido 30B, 30C, 46C-1, 46E-1

Una sospensione costituita dall'appropriata *o*-alchinilossima (15.78mmol), K₂CO₃ anidro (1.5eq.) in etanolo anidro (5mL/mmol) è stata agitata a t.a. sino a scomparsa dell'ossima (4-6h). La sospensione è stata evaporata ed il residuo solido è stato estratto più volte con DCM. La fase organica è stata seccata ed evaporata per dare un grezzo che è stato utilizzato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

7-(metossimetil)-1,6-naftiridina-6-ossido
30B



Sintetizzato mediante il metodo generale III a partire dall'ossima **29B**.
E' stato isolato come solido beige.

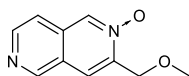
Resa: 85%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 9:1): 0.03

P.f.: 163-165°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.97 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.05 (d, *J*=8.6Hz, 1H), 7.51 (dd, *J*=4.2Hz e 8Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 3.63 (s, 3H).

3-(metossimetil)-2,6-naftiridina-2-ossido
30C



Sintetizzato mediante il metodo generale III a partire dall'ossima **29C**.
E' stato isolato come solido bianco.

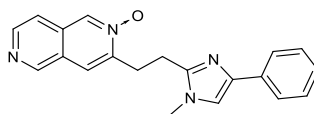
Resa: 86%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.05

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.24 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.63 (d, J=6Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.52 (d, J=6Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.64 (s, 3H).

API-ES m/z: 191.0 [MH]⁺.

3-(2-(4-fenil-1-metil-1H-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina-2-ossido
46C-1



Sintetizzato mediante il metodo generale III a partire dall'ossima **45C-1**.
E' stato isolato come solido giallo.

Resa: 93%

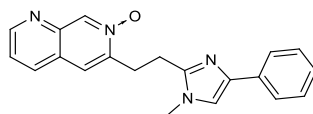
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0,00

P.f.: 194-196°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.16 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.60 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.75-7.69 (m, 2H), 7.55-7.47 (m, 2H), 7.37-7.22 (2H), 7.07 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.53 (t, *J*=7Hz, 2H), 3.26 (t, *J*=7Hz, 2H).

API-ES m/z: 331.0 [M+H]⁺.

6-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridina-7-ossido
46E-1



Sintetizzato mediante il metodo generale III a partire direttamente dalla miscela di reazione dell'ossima **45E-1** impiegando 3eq. di K₂CO₃.

E' stato isolato come solido giallino.

Resa: 70% (2 passaggi)

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0,00

P.f.: 166-167°C

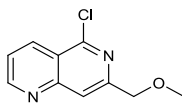
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.07 (s, 1H), 8.92 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 8.04 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.75 (d, *J*=9.4Hz, 2H), 7.46-7.33 (m, 3H), 7.24 (d, *J*=8.2Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.52 (t, *J*=7Hz, 2H), 3.27 (t, *J*=7Hz, 2H).

API-ES m/z: 331 [M+H]⁺.

Metodo generale IV per la sintesi dei cloderivati 22B, 22C, iso-22C, 47C-1, iso-47C-1, 47E-1, iso-47E-1.

Una soluzione dell'appropriata naftiridina-*N*-ossido (10mmol) in POCl₃(10mL) è stata refluita per 2h. La soluzione è stata raffreddata, versata in ghiaccio, e la risultante soluzione acquosa è stata basificata con NaOH 4M ed è stata estratta con AcOEt. La fase organica è stata lavata con una soluzione satura di NaCl, essicata con Na₂SO₄ ed evaporata. I residui grezzi sono stati purificati per FC.

5-cloro-7-(metossimetil)-1,6-naftiridina
22B



Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **30B**.
E' stato isolato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido beige.

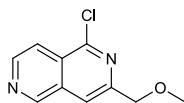
Resa: 68%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.44

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.13 (d, *J*= 2.6Hz, 1H), 8.61 (d, *J*=8.6Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.63-7.56 (m, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.57 (s, 3H).

API-ES m/z: 208.8 [M]⁺ (³⁵Cl), 211.0 (³⁷Cl) [M]⁺.

1-cloro-3-(metossimetil)-2,6-naftiridina
22C



Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **30C**.
E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 7:3) per ottenere un solido giallo.

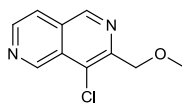
Resa: 56%

P.f.: 88-89°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.33 (s, 1H), 8.78 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 8.05 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.58 (s, 3H).

API-ES m/z: 208.8 [M]⁺ (³⁵Cl), 210.7 (³⁷Cl) [M]⁺.

4-cloro-3-(metossimetil)-2,6-naftiridina
iso-22C



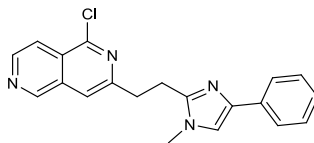
Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **30C**.
E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 7:3) per ottenere un solido bianco.

Resa: 14%

P.f.: 90-91°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.75 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.83 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.80 (d, *J*=5Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 3.56 (s, 3H).

1-cloro-3-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina
47C-1



Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **46C-1**. E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 7:3) per ottenere un solido bianco.

Resa: 40%

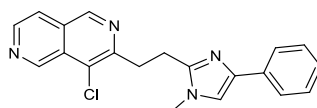
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.24

P.f.: 171-172°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.25 (s, 1H), 8.74 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 8.02 (d, *J*=5.8Hz, 1H), 7.73 (d, *J*=7Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.36 (t, *J*=7Hz, 2H), 7.25-7.21 (m, 1H), 7.03 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.49 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 3.25 (t, *J*=7.6Hz, 2H).

API-ES m/z: 349.0 [M]⁺.

4-cloro-3-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridina
iso-47C-1



Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **46C-1**.
E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 7:3) per ottenere un solido bianco.

Resa: 14%

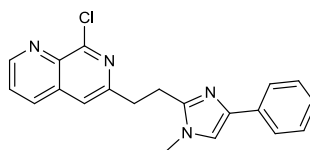
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.14

P.f.: 135-137°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.70 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.77 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=8.4Hz, 2H), 7.37-7.19 (m, 4H), 7.08 (s, 1H), 3.68 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 3.28 (t, *J*=7.6Hz, 2H).

LC-MS (m/z): 349.0 [M]⁺.

8-cloro-6-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-1,7-naftiridina
47E-1



Sintetizzato mediante il metodo generale IV per convertire la naftiridina-*N*-ossido **46E-1** nella cloronaftiridina **47E-1**.

E' stato isolato con FC (AcOEt) per ottenere un solido giallo scuro.

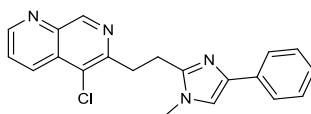
Resa: 39%

P.f.: 123-124°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.98 (dd, *J*=1.6Hz e 4Hz, 1H), 8.00 (dd, *J*=1.6Hz e 8.4Hz, 1H), 7.71 (dd, *J*=1.2Hz e 8.2Hz, 2H), 7.53 (dd, *J*=1.8Hz e 4Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.32 (t, *J*=7.4Hz, 2H), 7.19 (d, *J*=7.4Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.41 (t, *J*=7Hz, 2H), 3.21 (t, *J*=7Hz, 2H).

API-ES m/z: 349.0 [M]⁺.

5-cloro-6-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2,7-naftiridina
iso-47E-1



Sintetizzato mediante il metodo generale IV a partire dalla naftiridina-*N*-ossido **46E-1**.
E' stato isolato con FC (AcOEt) per ottenere un solido giallo.

Resa: 14%

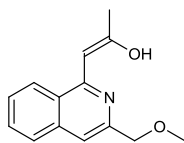
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.41 (s, 1H), 9.02 (dd, *J*=1.4Hz e 4.2Hz, 1H), 8.54 (d, *J*=8.8Hz, 1H), 7.78-7.68 (m, 2H), 7.66 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 7.34 (t, *J*=7.2Hz, 2H), 7.21 (d, *J*=7.2Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 3.75-3.50 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.40-3.20 (m, 2H).

API-ES m/z: 349.0 [M]⁺.

Metodo generale V per la sintesi degli enoli 23Aa, 23Ba, 23Ca, 48Ca-1, 48Ea-1.

In atmosfera inerte, una soluzione costituita dall'appropriato cloroderivato (1eq.), isopropenil acetato (1.5eq.), PhDavePhos (0.01eq.), tributil stagno metossido (1.5eq.), Pd₂(dba)₃ (0.01eq.) in toluene anidro (7mL/eq.) è stata rifluida a 100 °C per 12-24h. Il solvente è stato evaporato ed il grezzo residuo è stato purificato con FC.

1-(3-(metossimetil)isochinolin-1-il)prop-1-en-2-olo
23Aa



Sintetizzato mediante il metodo generale V a partire dalla cloro-naftiridina **22A**.
E' stato isolato con FC eluendo in gradiente (PE/AcOEt 8:2→AcOEt) per ottenere un solido giallo canarino.

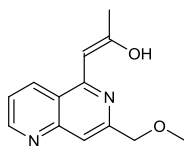
Resa: 57%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.13

P.f.: 76-78°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 15.61 (brs, 1H), 8.03 (d, *J*=8.2Hz, 1H), 7.68-7.45 (m, 4H), 6.06 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.51 (s, 3H), 2.23 (s, 3H).

1-(7-(metossimetil)-1,6-naftiridin-5-il)prop-1-en-2-olo
23Ba



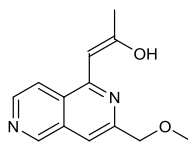
Sintetizzato mediante il metodo generale V a partire dalla cloro-naftiridina **22B**.
E' stato isolato con FC eluendo in gradiente (PE/AcOEt 1:1→AcOEt) per ottenere un solido giallo intenso.

Resa: 87%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 1:1): 0.10

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 15.29 (brs, 1H), 8.87 (d, *J*=3.2Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.34 (dd, *J*=4.4Hz e 8.4Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 2.24 (s, 3H).

1-(3-(metossimetil)-1,6-naftiridin-1-il)prop-1-en-2-olo
23Ca



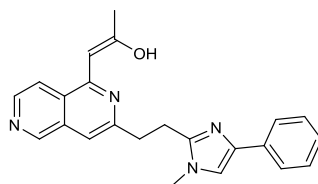
Sintetizzato mediante il metodo generale V a partire dalla cloro-naftiridina **22C**.
E' stato isolato con FC eluendo in gradiente (PE/AcOEt 1:1→AcOEt→AcOEt/MeOH) per
ottenere un solido giallo intenso.

Resa: 57%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 1:1): 0.18

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 15.16 (brs, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.58 (d, *J*=3.8Hz, 1H),
7.73 (d, *J*=3.8Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.45 (s, 2H), 2.25 (s, 3H).

1-(3-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridin-1-il)prop-1-en-2-olo
48Ca-1



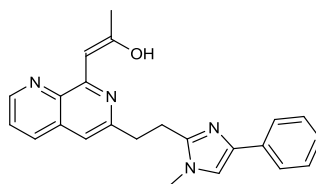
Sintetizzato mediante il metodo generale V a partire dalla cloro-naftiridina **47C-1**.
E' stato isolato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido giallo arancio.

Resa: 96%

R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.46

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 15.45 (brs, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.56 (d, *J*=6Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=2.8Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.36 (t, *J*=7.2Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.21 (m, 4H), 2.26 (s, 3H).

1-(3-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2,6-naftiridin-1-il)prop-1-en-2-olo
48Ea-1



Sintetizzato mediante il metodo generale V a partire dalla cloro-naftiridina **47E-1**.
E' stato isolato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido giallo.

Resa: 28%

R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.45

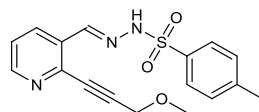
P.f.: 152-153°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 15.42 (brs, 1H), 8.72 (dd, *J*=1.6Hz e 4.2Hz, 1H), 7.84-7.68 (m, 3H), 7.57-7.42 (m, 1H), 7.36 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 7.28-7.16 (m, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.53-3.38 (m, 2H), 3.35-3.15 (m, 2H), 2.27 (s, 3H).

Metodo generale VI per la sintesi dei tosildrazoni 31B e 31C

Ad una soluzione dell'appropriata *o*-alchinilaldeide (0.5mmol) e tosildrazide (1.05eq.) in EtOH (3mL) è stata addizionata una goccia di HCl_{conc.} e la miscela è stata agitata a t.a. per 1h. Al termine, l'etanolo è stato evaporato ed il residuo è stato sgranato con Et₂O. Il solido ottenuto si utilizza nelle reazioni successive senza ulteriore purificazione.

N'-((2-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridin-3-il)metilene)tosilidrazide
31B



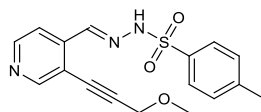
Sintetizzato mediante il metodo generale VI a partire dall'aldeide **28B**.
E' stato ottenuto come un solido arancio.

Resa: 98%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.15

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.52 (brs, 1H), 8.55 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.22 (d, *J*=8Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=7.8Hz, 2H), 7.31 (m, 3H), 4.34 (s, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

N'-((3-(3-metossiprop-1-in-1-il)piridin-4-il)metilene)tosilidrazide
31C



Sintetizzato mediante il metodo generale VI partire dall'aldeide **28C**.
E' stato ottenuto come un solido verde pistacchio.

Resa: 95%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.59

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃-DMSO, δ/ppm): 11.79 (brs, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.83 (d, *J*=7.6Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.34 (d, *J*=6.6Hz, 2H), 4.37 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.42 (s, 3H).

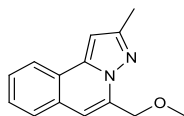
Metodo VII per la sintesi delle piattaforme tricicliche 26Aa, 26Ba, 26Bb, 26Ca, 26Da, Bc-1, Ca-1.

Procedura A: In atmosfera inerte, una soluzione dell'appropriata ossima (0.8mmol) in DME (2mL) è stata raffreddata in bagno di ghiaccio. Questa soluzione è stata addizionata lentamente di TFAA (1.02eq.) e agitata per 10 minuti alla stessa temperatura. Di seguito, 3.12eq di TEA sono stati addizionati alla miscela nell'arco di 15 minuti. Terminata l'aggiunta, la soluzione è stata riportata a t.a. e agitata per 1h. Successivamente è stato aggiunto FeCl₂(0.05eq.) e la soluzione è stata riscaldata a 75°C. La miscela è stata raffreddata e ripresa con H₂O, in seguito è stata basificata con una soluzione satura di K₂CO₃. La miscela è stata estratta con AcOEt. La fase organica è stata lavata con una soluzione satura di NaCl, essiccata su Na₂SO₄ ed evaporata. Il grezzo così ottenuto è stato purificato con FC.

Procedura B: Sotto azoto, una soluzione costituita dall'appropriata *o*-alchinilaldeide (0.6mmol), tosildrazide (1,05eq.), DL-Prolina (0.10eq.), AgOTf (0.10eq.) in EtOH anidro (4mL) è stata agitata a t.a. per 20 minuti. Tale soluzione è stata addizionata dell'appropriato chetone (5-10eq.) e riscaldata a 60°C per 30 min. La miscela è stata raffreddata a t.a., addizionata di Na₂CO₃ (6eq.) e lasciata in agitazione per 12-24h. La miscela risultante è stata evaporata e il grezzo è stato purificato per FC.

Procedura C: Una soluzione costituita dall'opportuna aldeide (0.3mmol), tosildrazide (1.1eq.), AgOTf (0.3eq.) in DCM anidro (2mL) è stata preparata all'interno di una *vial* e agitata a t.a. per 20 minuti. La miscela è stata addizionata di DBU (3eq.) e dell'appropriato chetone (5eq.) e quindi riscaldata a 60°C per 1h al microonde. La miscela è stata evaporata e il grezzo è stato purificato con FC.

2-metil-5-(metossimetil)pirazolo[5,1-*a*]isochinolina
26Aa



Sintetizzato mediante le procedure *A* (a partire dall'ossima **24Aa**) e *C* (a partire dall'*o*-alchinilaldeide **28A**) del metodo generale VII.

E' stato isolato con FC (PE/AcOEt 9:1) per ottenere un solido giallo.

Resa: 28% (Procedura *A*), 75% (Procedura *C*)

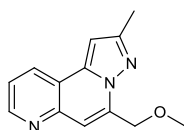
R.f. (etere di petrolio/etile acetato 8:2): 0.56

P.f.: 63-65°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.05 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=6.2Hz, 1H), 7.54-7.50 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.55 (s, 3H).

API-ES m/z: 226.9 [M+H]⁺.

2-metil-5-(metossimetil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina
26Ba



Sintetizzato mediante le procedure *A* (a partire dall'ossima **24Ba**) e *B* (a partire dall'*o*-alchinilaldeide **28B**) del metodo generale VII mediante.

E' stato isolato con FC (AcOEt) per ottenere un solido giallino.

Resa: 41% (Procedura *A*), 75% (Procedura *B*)

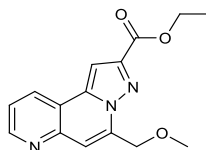
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.53

P.f.: 134-135°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.85 (d, *J*=3.4Hz, 1H) 8.32 (d, *J*=7.6Hz, 1H), 7.44 (dd, *J*=4.8Hz e 8.2Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).

API-ES m/z: 227.9 [M+H]⁺.

Etile 5-(metossimetil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina-2-carbossilato
26Bb



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VII a partire dall'ochinilaldeide **28B** e impiegando 5eq. di etile piruvato.

E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 6:4) ottenendo un solido che è stato sgranato con Et₂O per dare un solido grigio.

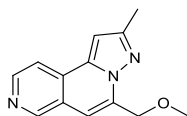
Resa: 43%

P.f.: 130-132°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.93 (dd, *J*=1.4Hz e 4.4Hz, 1H), 8.41 (d, *J*=7.6Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.51 (q, *J*=7Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 1.47 (t, *J*=7Hz, 3H).

API-ES m/z: 286.0 [M+H]⁺.

2-metil-5-(metossimetil)pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridina
26Ca



Sintetizzato mediante le procedure *A* (a partire dall'ossima **24Ca**) e *C* (a partire dall'*o*-alchinilaldeide **28C**) del metodo generale VII.

E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 7:3) per ottenere un solido giallino.

Resa: 11% (Procedura *A*), 29% (Procedura *C*)

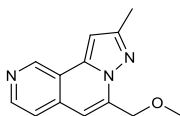
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.55

P.f.: 104-106°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.05 (s, 1H), 8.63 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.83 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).

API-ES m/z: 227.9 [M+H]⁺.

9-metil-6-(metossimetil)pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
26Da



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VII a partire dall'*o*-alchinilaldeide **28D**.

E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido bianco.

Resa: 58%

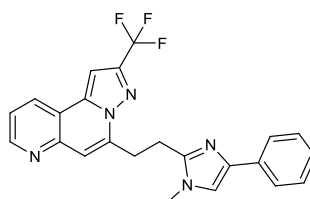
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.53

P.f.: 112-113°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.40 (s, 1H) 8.64 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.55 (d, *J*=5.6Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).

API-ES m/z: 228.0 [M+H]⁺.

5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2-(trifluorometil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
Bc-1



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VII a partire dall'*o*-alchinilaldeide **37B-1**.

E' stato isolato con FC in gradiente (AcOEt→AcOEt/MeOH 9:1) per ottenere un solido bianco.

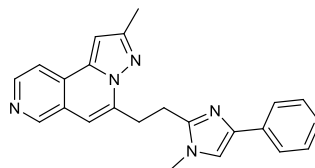
Resa: 75%

P.f.: 159-161°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.93 (dd, *J*=1.6Hz e 4.6Hz, 1H), 8.39 (dd, *J*=1.6Hz e 8Hz, 1H), 7.74 (dd, *J*=1.2Hz e 8.2Hz, 2H), 7.52 (dd, *J*=4.6Hz e 8Hz, 1H), 7.36 (t, *J*=7.4Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.27-7.21 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.39-3.31 (m, 2H).

API-ES m/z: 422.0 [M+H]⁺.

2-metil-5-(2-(1-metil-4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-*a*][2,6]naftiridina
Ca-1



Sintetizzato mediante la procedura A del metodo generale VII a partire dall'ossima **49Ca-1**.

E' stato isolato mediante FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallino.

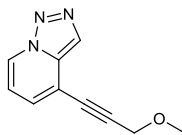
Resa: 8%

P.f.: 99-100°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.00 (s, 1H), 8.63 (d, *J*=5.4Hz, 1H), 7.83-7.73 (m, 4H), 7.37 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 3.62-3.51 (m, 5H), 3.34 (t, *J*=6.6Hz, 2H), 2.58 (s, 3H).

API-ES m/z: 368.0 [M+H]⁺.

4-(3-metossiprop-1-inil)-[1,2,3]triazolo[1,5-*a*]piridina
50E



Sintetizzato mediante la procedura *C* del metodo generale VII nel tentativo di isolare il composto **26Ea** (vedi **Schema 11**).

E' stato isolato con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallino.

Resa: 70%

P.f.: 79-80°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.72 (d, *J*=6.6Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.37 (d, *J*=6.6Hz, 1H), 6.97 (t, *J*=6.8Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.51 (s, 3H).

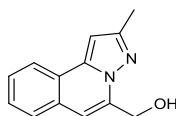
API-ES m/z: 188.0 [M+H]⁺.

Metodo generale VIII di demetilazione per l'ottenimento degli intermedi 32Aa, 32Ba, 32Bb, 32Da, 33Aa,33Ba.

Procedura A: In atmosfera d'azoto, una soluzione dell'appropriato metiletere (1,98mmol) in DCM anidro (27mL) è stata raffreddata a -78 °C. Tale soluzione è stata addizionata goccia a goccia di una soluzione di BBr₃ 1M in DCM (10eq.) e agitata per 30 minuti. La miscela di reazione è stata riportata a circa -12°C e addizionata di Et₂O (6mL). La miscela è stata quindi riportata a t.a. e agitata per 30', dopodichè addizionata lentamente di NaOH 1N (46mL). Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con DCM. Le fasi organiche riunite, sono state lavate con una soluzione satura di NaCl, essiccate con Na₂SO₄ ed evaporate per ottenere un grezzo che è stato purificato con FC.

Procedura B: Sotto azoto, una soluzione dell'appropriato metiletere (0.35mmol) in DCM (10mL) è stata raffreddata a 0°C e successivamente addizionata lentamente di una soluzione di BBr₃ 1M in DCM (3eq.). Terminata l'aggiunta, la miscela è stata riportata a t.a e agitata per 1.5h. La miscela è stata raffreddata in bagno di ghiaccio e addizionata lentamente di una soluzione satura di NaHCO₃ (7mL). Le due fasi sono state separate, e la fase acquosa è stata estratta diverse volte con DCM. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl, essiccate con Na₂SO₄ ed evaporate per ottenere un solido grezzo che può essere purificato con FC o utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

5-(idrossimetil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
32Aa



Sintetizzato mediante la procedura *A* del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Aa**.

È stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido bianco.

Resa: 36%

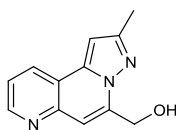
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 1:1): 0.25

P.f.: 157-158°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.05-8.01 (m, 1H), 7.72-7.67 (m, 1H), 7.59-7.50 (m, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 2.58 (s, 3H).

API-ES m/z: 213.0 [M+H]⁺.

5-(idrossimetil)-2-metilpirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
32Ba



Sintetizzato mediante la Procedura A del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Ba**.

È stato ottenuto come un solido bianco.

Resa: 80%

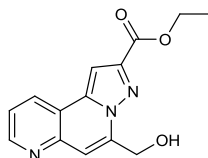
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.32

P.f.: 188-189°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.85 (d, *J*=4.4Hz, 1H), 8.33 (d, *J*=8Hz, 1H), 7.46 (dd, *J*=4.4Hz e 8Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.55 (s, 3H).

API-ES m/z: 213.9 [M+H]⁺.

Etile 5-(idrossimetil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato
32Bb



Sintetizzato mediante la Procedura *B* del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Bb**.

È stato ottenuto come solido bianco.

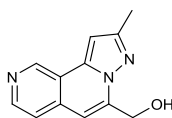
Resa: 63%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.29

P.f.: 183°C (dec.)

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.92 (brs, 1H), 8.42 (d, *J*=7.6Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.54 (m, 1H), 7.46 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.50 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 1.47 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

(9-metilpirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridin-6-il)metanolo
32Da



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Da**.

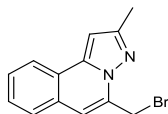
È stato purificato con FC in gradiente (AcOEt/PE 7:3→AcOEt) per ottenere un solido bianco.

L'intermedio è stato impiegato direttamente nella reazione successiva senza ulteriore caratterizzazione.

Resa: 36%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.27

5-(bromometil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
33Aa



Sintetizzato mediante la procedura *A* del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Aa** e isolato come prodotto secondario.

È stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido giallino.

Resa: 32%

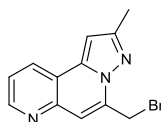
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 1:1): 0.83

P.f.: 150-151°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.05-8.00 (m, 1H), 7.71-7.66 (m, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 5.03 (d, *J*=7Hz, 2H), 2.53 (s, 3H).

API-ES m/z: 275.0 (⁷⁹Br)[M]⁺, 277.8 (⁸¹Br) [M+H]⁺.

5-(bromometil)-2-metilpirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
33Ba



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VIII a partire dal metiletere **26Ba** e isolato come prodotto secondario.

È stato purificato con FC (AcOEt/PE 6:4) per ottenere un solido giallino.

Resa: 35%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.56

P.f.: 237-240°C

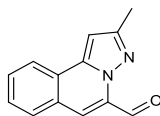
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.84 (d, *J*=3Hz, 1H), 8.32 (d, *J*=8Hz, 1H), 7.47 (dd, *J*=4.4Hz e 8Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.59 (s, 3H).

API-ES m/z: 277.0 (⁸¹Br) [M]⁺, 277.9 (⁸¹Br) [M+H]⁺.

Metodo generale IX per la sintesi dei prodotti 34Aa, 34Ba.

In ambiente inerte, una soluzione dell'appropriato alcol (0.4mmol) in DCE anidro (10mL) è stata addizionata di DMP (1.09eq) e agitata a t.a. per 12h. La miscela di reazione è stata addizionata di una soluzione satura di NaHCO₃ e le due fasi separate. La fase acquosa è stata estratta con Et₂O, lavata con una soluzione satura di NaCl, essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata. L'aldeide così ottenuta è stata utilizzata nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

5-formil-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
34Aa



Sintetizzato mediante il metodo generale IX a partire dall'alcol **32Aa**.
È stato ottenuto come un solido giallino.

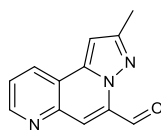
Resa: 98%

P.f.: 163-164°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.86 (s, 1H), 8.06 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.85 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.70-7.53 (m, 3H), 6.86 (s, 1H), 2.58 (s, 3H).

API-ES m/z: 211.0 [M+H]⁺.

5-formil-2-metilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina
34Ba



Sintetizzato mediante il metodo generale IX a partire dall'alcol **32Ba**.
È stato ottenuto come un solido giallo.

Resa: 80%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.57

P.f.: 182-183°C

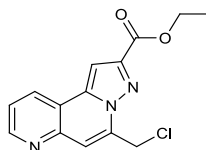
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 10.90 (s, 1H), 8.93 (dd, *J*=1.6Hz e 4.6Hz, 1H), 8.35 (d, *J*=8.2Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 5.56 (dd, *J*=4.6Hz e 8.2Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 2.60 (s, 3H).

API-ES m/z: 211.9 [M+H]⁺.

Metodo generale X per la sintesi dei cloroderivati 33Bb, 33Da.

In ambiente inerte, una soluzione dell'appropriato alcol (0.8mmol) in DCM anidro (28mL) è stata addizionata di SOCl₂ (10eq.) a 0°C e agitata a t.a. per 12h. La soluzione è stata evaporata per ottenere un grezzo che è stato utilizzato nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

Etile 5-(clorometil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato
33Bb



Sintetizzato mediante il metodo generale X a partire dall'alcol **32Bb**.
È stato ottenuto come un solido bianco.

Resa: quantitativa

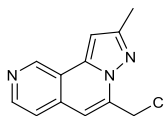
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.63

P.f.: 218-220°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.85 (brs, 1H), 8.33 (dd, *J*=0.8Hz e 8Hz, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.51-7.45 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.43 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 1.40 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

API-ES m/z: 290.0 [M+H]⁺.

6-(clorometil)-9-metilpirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
33Da



Sintetizzato mediante il metodo generale X a partire dall'alcol **32Da**.
È stato ottenuto come un solido giallino e senza ulteriore caratterizzazione è stato impiegato nella reazione successiva.

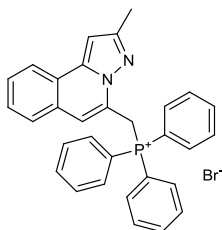
Resa: quantitativa

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.58

Metodo generale XI per la sintesi dei sali di fosfonio 35Aa, 35Ba, 35Bb, 35Da, 51

Una soluzione costituita dall'appropriato alogenuro (1mmol) e PPh_3 (1.5-2eq.) in MeCN anidro (10mL) è stata refluita per 12h. Al termine, il solvente è stato evaporato e il residuo è stato sgranato con Et_2O per ottenere un solido che è stato utilizzato senza ulteriore purificazione nella reazione successiva.

5-((bromotrifenilfosforanil)metil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
35Aa

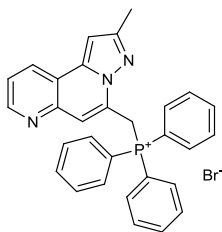


Sintetizzato mediante il metodo XI a partire dall'alogenuro **33Aa**.
È stato ottenuto come un solido bianco.

Resa: 88%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.00

5-((bromotrifenilfosforanil)metil)-2-metilpirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina
35Ba

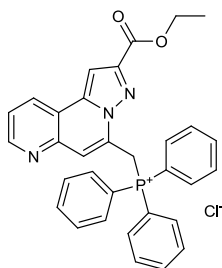


Sintetizzato mediante il metodo XI a partire dall'alogenuro **33Ba**.
È stato ottenuto come un solido giallo-arancio.

Resa: 82%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.00

Etile 5-((clorotrifetilfosforanil)metil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato
35Bb

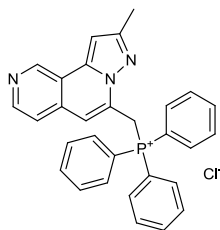


Sintetizzato mediante il metodo XI a partire dall'alogenuro **33Bb**.
È stato ottenuto come un solido giallino.

Resa: 91%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.00

6-((clorotrifenilfosforanil)metil)-9-metilpirazolo[5,1-a][2,7]naftiridina
35Da



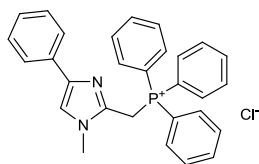
Sintetizzato mediante il metodo XI a partire dall'alogenuro **33Da**.
È stato ottenuto come un solido giallo senape.

Resa: quantitativa

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.00

2-((clorotrifetilfosforanil)metil)-1-metil-1*H*-imidazolo

51



Sintetizzato mediante il metodo XI a partire dal 2-(clorometil)-1-metil-1*H*-imidazolo⁸². È stato ottenuto come un solido giallo.

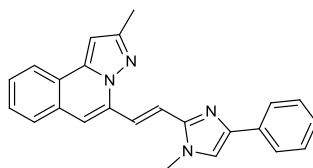
Resa: quantitativa

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.00

Metodo generale XII per la sintesi degli alcheni 36Aa-1, 36Aa-2, 36Ba-1, 36Ba-2, 36Bb-1, 36Bb-2, 36Da-1, 36Da-2.

In ambiente inerte, una sospensione costituita da NaH al 60% (1,2-2eq) in DMF anidra (2-4mL) è stata agitata a t.a. sino a completa evoluzione di idrogeno. In seguito, la sospensione è stata raffreddata su bagno di ghiaccio e addizionata a spatolate dell'appropriato sale di fosfonio (1eq.). Dopo 30 minuti di agitazione la miscela è stata addizionata dell'appropriata l'aldeide (1eq.) e agitata per 2h a 0°C o a t.a. La miscela di reazione è stata addizionata di H₂O. I prodotti di reazione sono stati isolati sia per filtrazione dalla soluzione acquosa sia per estrazione con DCM o AcOEt. Nell'ultimo caso, le soluzioni organiche sono state lavate con H₂O, con una soluzione satura di NaCl, essiccate ed evaporate per ottenere un grezzo giallo che è stato purificato con FC o per sgranatura con un opportuno solvente.

(*E*) 5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)vinil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
36Aa-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dall'aldeide **34Aa** e dal sale di fosfonio **51**.

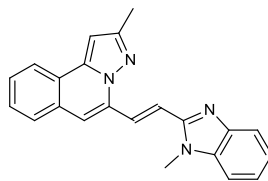
È stato purificato con FC (PE/AcOEt 7:3) per ottenere un solido giallo.

Resa: 55%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.52

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.32 (d, *J*=15.6Hz, 1H), 8.10-7.93 (m, 2H), 7.91-7.78 (m, 2H), 7.76-7.64 (m, 2H), 7.60-7.46 (m, 2H), 7.45-7.22 (m, 2H), 7.30-7.14 (m, 3H), 6.87 (s, 1H), 3.86 (s, 1H), 2.60 (s, 1H).

(*E*) 2-metil-5-(2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)vinil)pirazolo[5,1-*a*]isochinolina
36Aa-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Aa** e dall'aldeide 1-metil-1*H*-benzimidazolo-2-carbaldeide⁶.

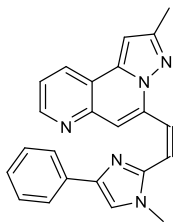
È stato ottenuto per filtrazione dalla soluzione acquosa come solido giallo.

Resa: 95%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.52

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.63 (d, *J*=15.6Hz, 1H), 8.17 (d, *J*=15.6Hz, 1H), 8.02-7.97 (m, 1H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.72-7.67 (m, 1H), 7.52-7.47 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.60 (s, 3H).

(Z) 5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)vinil)-2-metil pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
36Ba-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dall'aldeide **34Ba** e dal sale di fosfonio **51**.

È stato purificato con FC eluendo in gradiente (AcOEt/PE 1:1→7:3→8:2) per ottenere un solido giallo.

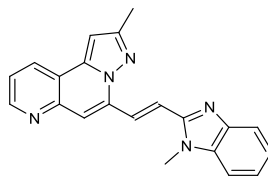
Resa: 66%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.48

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.83 (dd, *J*=1.8Hz e 4.4Hz, 1H), 8.29 (dd, *J*=1.8Hz e 6.6Hz, 1H), 8.25-8.18 (m, 1H), 8.15 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 7.86 (d, *J*=7.2Hz, 2H), 7.44-7.24 (m, 5H), 7.25 (d, *J*=4.2Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.60 (s, 3H).

API-ES m/z: 366.0 [M+H]⁺.

(*E*) 2-metil-5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)vinil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
36Ba-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Ba** e dall'aldeide 1-metil-1*H*-benzimidazolo-2-carbaldeide.

È stato purificato con FC eluendo in gradiente (AcOEt/PE 6:4→7:3→AcOEt) per ottenere un solido giallo.

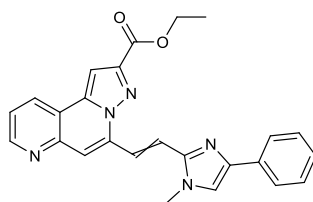
Resa: 99%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.32

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.85 (d, *J*=4.6Hz, 1H), 8.61 (d, *J*=15.6Hz, 1H), 8.31 (d, *J*=15.6Hz, 1H), 8.30 (d, *J*=9Hz, 1H), 7.86-7.27 (m, 6H), 6.92 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.62 (s, 3H).

API-ES m/z: 340.0 [M+H]⁺.

Etile 5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)vinil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina-2-carbossilato
36Bb-1

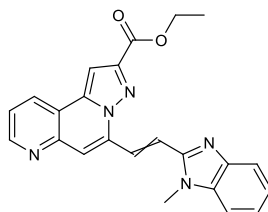


Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Bb** e dall'aldeide 4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-carbaldeide⁷⁷.

È stato ottenuto per filtrazione dalla soluzione acquosa come solido giallo-arancio. Utilizzato senza ulteriore caratterizzazione nella reazione successiva.

Resa: 63%

Etile 5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)vinil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina -2-carbossilato
36Bb-2



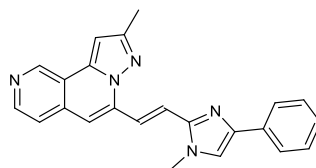
Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Bb** e dall'aldeide 1-metil-1*H*-benzimidazol-2-carbaldeide.

È stato ottenuto per filtrazione dalla soluzione acquosa come solido giallo.

Utilizzato senza ulteriore caratterizzazione nella reazione successiva.

Resa: 77%

(*E*) 6-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)vinil)-9-metil pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
36Da-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Da** e dall'aldeide 4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-carbaldeide

È stato ottenuto tramite filtrazione dalla soluzione acquosa come solido arancio.

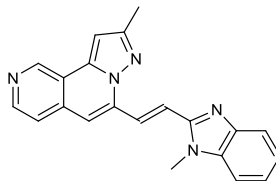
Resa: 99%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.23

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.38 (s, 1H), 8.63 (m, 1H), 8.35 (d, *J*=15.2Hz, 1H), 8.02 (d, *J*=15.2Hz, 1H), 7.87-7.00 (m, 9H), 3.87 (s, 3H), 3.59 (s, 3H).

API-ES m/z: 366.0 [M+H]⁺.

(*E*) 9-metil-6-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)vinil)pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
36Da-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XII a partire dal sale di fosfonio **35Da** e dall'aldeide 1-metil-1*H*-benzimidazol-2-carbaldeide.

È stato ottenuto per sgranatura del residuo grezzo con esano come solido giallo.

Resa: 99%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.10

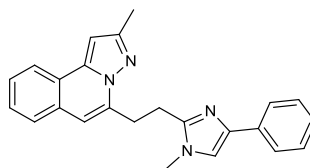
¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.40 (s, 1H), 8.75-8.63 (m 2H), 8.23 (d, *J*=15.8Hz, 1H), 7.82 (d, *J*=4.4Hz, 1H), 7.72-7.34 (m, 4H), 7.16 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 3.97 (s, 3H), 2.63 (s, 3H).

API-ES m/z: 340.0 [M+H]⁺.

Metodo generale XIII per la la sintesi dei prodotti Aa-1, Aa-2, Ba-1, Ba-2, Bb-1, Bb-2, Da-1, Da-2.

In atmosfera d'azoto, una soluzione costituita dall'appropriato alchene (0.6mmol) e da tosilidrazide (3eq.) in DMF anidra (10mL) è stata riscaldata a 120°C per 4h. La soluzione è addizionata di ulteriori 2eq. di tosilidrazide per complessive 12h. La miscela è stata raffreddata, versata in acqua e la soluzione acquosa è stata basificata con una soluzione satura di NaHCO₃. I prodotti di reazione sono stati isolati sia per filtrazione dalla soluzione acquosa sia per estrazione con AcOEt. Nell'ultimo caso, la soluzione organica è stata lavata con H₂O, con una soluzione satura di NaCl, essiccata ed evaporata per ottenere un grezzo che è stato purificato con FC.

5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2-metilpirazolo[5,1-*a*]isochinolina
Aa-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Aa-1**.
E' stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere un solido giallo chiaro.

Resa: 81%

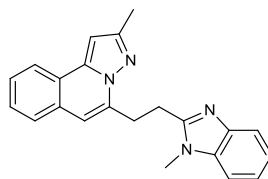
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 8:2): 0.57

P.f.: 123-125°C

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.06-7.98 (m, 1H), 7.76 (dd, *J*=1.2Hz e 7.4Hz, 2H), 7.67-7.58 (m, 1H), 7.55-7.44 (m, 2H), 7.37 (dt, *J*=1.2Hz e 7.4Hz, 2H), 7.29-7.18 (m, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.62-3.47 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.42-3.30 (m, 2H), 2.56 (s, 3H).

API-ES m/z: 367.0 [M+H]⁺.

2-metil-5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-*a*]isochinolina
Aa-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Aa-2**.
E' stato purificato con FC (PE:AcOEt 6/4) per ottenere un solido bianco.

Resa: 77%

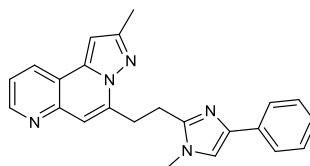
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0.42

P.f.: 120-122°C

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.06-7.96 (m, 1H), 7.82-7.68 (m, 2H), 7.66-7.57 (m, 1H), 7.55-7.43 (m, 2H), 7.33-7.19 (m, 2H), 6.87-6.78 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.68-3.59 (m, 2H), 3.58-3.46 (m, 2H), 2.55 (s, 3H).

API-ES m/z: 341.0 [M+H]⁺.

5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2-metilpirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
Ba-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Ba-1**.

E' stato purificato con FC eluendo in gradiente (PE:AcOEt 7:3→AcOEt) per ottenere un solido verde chiaro.

Resa: 62%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 8:2): 0.29

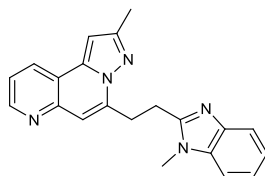
P.f.: 148-150°C

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.79 (dd, *J*=1.8Hz e 4.8Hz, 1H), 8.27 (dd, *J*=1.8Hz e 8.1Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=7.2Hz, 2H), 7.37 (m, 3H), 7.21 (t, *J*=7.2Hz, 1H), 7.07 (d, *J*=6.9Hz, 2H), 6.85 (s, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.59 (m, 2H), 3.33 (t, *J*=5.1Hz, 2H), 2.55 (s, 3H).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃, δ/ppm): 151.180, 150.246, 147.548, 146.213, 141.552, 140.230, 138.641, 134.348, 130.989, 128.419, 126.356, 124.713, 121.208, 118.797, 116.414, 110.832, 109.129, 98.653, 32.585, 30.555, 24.553, 14.070.

API-ES m/z: 368.1 [M+H]⁺.

2-metil-5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
Ba-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Ba-2**.

E' stato purificato con FC eluendo in gradiente (PE:AcOEt 7:3→AcOEt) per ottenere un solido bianco.

Resa: 71%

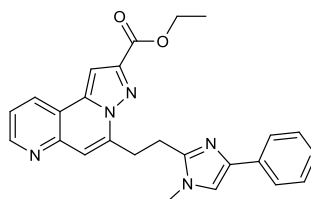
R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.27

P.f.: 188-190°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.81 (dd, *J*=1.6Hz e 4.6Hz, 1H), 8.31 (dd, *J*=1,8Hz e 8.2Hz, 1H), 7.77-7.73 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 1H), 7.31-7.23 (m, 3H), 7.12 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76-3.67 (m, 2H), 3.59-3.49 (m, 2H), 2.55 (s, 3H).

API-ES m/z: 342.1 [M+H]⁺.

Etile 5-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilpirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina-2-carbossilato
Bb-1



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VII (a partire dall'aldeide **37B-1**) e il metodo generale XIII (a partire dall'alchene **36Bb-1**).
E' stato purificato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido bianco.

Resa: 72% (Metodo VII), 52% (Metodo XIII)

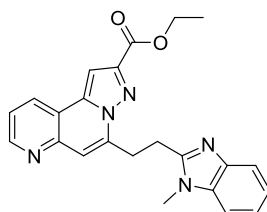
R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.57

P.f.: 172-174°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.95-8.85 (m, 1H), 8.40 (d, *J*=8Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=6.8Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.54-7.47 (m, 1H), 7.41-7.35 (m, 3H), 7.29-7.19 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.49 (q, *J*=7Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.75-3.55 (m, 2H), 3.50-3.25 (m, 2H), 1.47 (t, *J*=7Hz, 3H).

API-ES m/z: 426.0 [M+H]⁺.

Etile 5-(2-(1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-f][1,6]naftiridina-2-carbossilato
Bb-2



Sintetizzato mediante la procedura *B* del metodo generale VII (a partire dall'aldeide **37B-2**) e il metodo generale XIII (a partire dall'alchene **36Bb-2**).
E' stato purificato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5) per ottenere un solido bianco.

Resa: 43% (Metodo VII), 66% (Metodo XIII)

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 7:3): 0.31

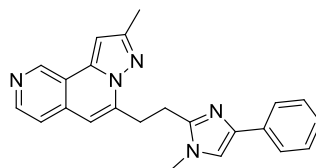
P.f.: 135-137°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.91-8.89 (m, 1H), 8.41 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.73-7.71 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.56-7.47 (m, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35-7.26 (m, 3H), 4.50 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.78 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 3.55 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 1.48 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃, δ/ppm): 162.49, 153.62, 151.16, 146.02, 144.89, 142.50, 141.46, 138.84, 135.90, 131.25, 122.26, 122.17, 121.97, 119.58, 119.19, 114.78, 109.15, 101.90, 61.34, 30.24, 29.95, 29.67, 25.31, 14.38.

API-ES m/z: 400.0 [M+H]⁺.

6-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-9-metilpirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
Da-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Da-1**.
E' stato purificato con FC (AcOEt/PE 9:1) per ottenere un solido bianco.

Resa: 57%

R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.6

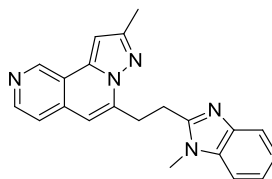
P.f.: 163-165°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.37 (s, 1H), 8.60 (d, *J*=5Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=7Hz, 2H), 7.67 (d, *J*=7.2Hz, 2H), 7.37 (t, *J*=7.4Hz, 1H), 7.25-7.18 (m, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.75-3.50 (m, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.40-3.30 (m, 2H), 2.58 (s, 3H).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃, δ/ppm): 151.53, 147.74, 147.52, 146.59, 142.15, 140.22, 139.68, 137.73, 134.33, 133.82, 128.54, 128.52, 126.65, 126.49, 124.69, 124.65, 119.54, 116.44, 107.77, 97.72, 56.56, 32.62, 30.95, 24.56, 14.20.

API-ES m/z: 368.0 [M+1]⁺.

9-metil-6-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-*a*][2,7]naftiridina
Da-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XIII a partire dall'alchene **36Da-2**.

E' stato purificato con FC (AcOEt/PE 9:1) per ottenere un solido giallo.

Resa: 39%

R.f. (cloroformio/metanolo 95:5): 0.54

P.f.: 170-171°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 9.36 (s, 1H), 8.59 (d, *J*=4.8Hz, 1H), 7.74-7.65 (m, 1H), 7.45 (d, *J*=4.8Hz, 1H), 7.27 (s, 3H), 6.95 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.74-3.67 (m, 2H), 3.52 (t, *J*=8Hz, 2H), 2.56 (s, 3H).

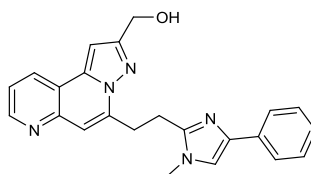
¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃, δ/ppm): 153.762, 151.554, 146.517, 142.406, 141.802, 137.683, 135.729, 133.724, 122.181, 121.917, 119.514, 119.080, 118.830, 118.002, 109.032, 107.749, 97.726, 30.418, 29.653, 25.236, 14.177.

API-ES m/z: 342 [M+H]⁺.

Metodo generale XIV per la sintesi degli alcoli 44B-1, 44B-2.

Una miscela dell'estere (0.4mmol) in etanolo anidro (4mL) è stata addizionata di NaBH₄ (2eq.) e rifulita per 12h. Al termine, il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato purificato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5).

5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2-(idrossimetil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
44B-1



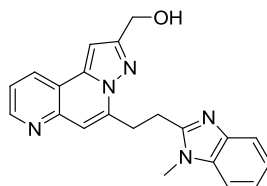
Sintetizzato mediante il metodo generale XIV a partire dall'estere **Bb-1**.
È stato ottenuto come solido bianco vetroso.

Resa: 61%

R.f. (CHCl₃/CH₃OH 95:5): 0.28

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.77 (dd, *J*=1.6Hz e 4.6Hz, 1H), 8.24 (d, *J*=8.4Hz, 1H), 7.73 (d, *J*=8.4Hz, 2H), 7.39-7.17 (m, 5H), 7.05 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.53-3.49 (m, 2H), 3.31-3.23 (m, 2H), 2.87 (brs, 1H).

2-(idrossimetil)-5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
44B-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XIV a partire dall'estere **Bb-2**.
È stato ottenuto come solido giallino.

Resa: 65%

R.f. (CHCl₃/CH₃OH 95:5): 0.18

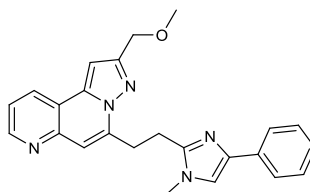
P.f.: 191-192°C

API-ES m/z: 358.0 [M+H]⁺.

Metodo generale XV per la sintesi dei prodotti Bd-1, Bd-2.

Una soluzione costituita dall'appropriato alcol (0.2mmol) in THF anidro (6mL) è stata raffreddata su bagno di ghiaccio e addizionata di NaH 60% (1.5eq.). La miscela è stata agitata alla stessa temperatura per 30 minuti, addizionata goccia a goccia di MeI (1.5eq.) e riportata a t.a. Il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato ripreso con AcOEt. La soluzione organica è stata lavata con H₂O, una soluzione satura di NaCl, essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata per dare un grezzo che è stato purificato con FC (CHCl₃/MeOH 95:5).

5-(2-(4-fenil-1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etil)-2-(metossimetil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
Bd-1



Sintetizzato mediante il metodo generale XV a partire dall'alcol **44B-1**.
È stato ottenuto come solido giallino.

Resa: 55%

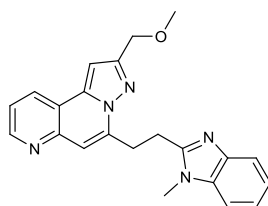
R.f. (CHCl₃/CH₃OH 95:5): 0.53

P.f.: 133-134°C

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.84 (d, *J*=4.4Hz, 1H), 8.35 (d, *J*=7.4Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=8Hz, 2H), 7.48-7.40 (m, 1H), 7.36 (t, *J*=8Hz, 2H), 7.30-7.20 (m, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.70-3.55 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.40-3.25 (m, 2H).

API-ES m/z: 398.0 [M+H]⁺.

5-(2-(1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)etil)-2-(metossimetil)pirazolo[5,1-*f*][1,6]naftiridina
Bd-2



Sintetizzato mediante il metodo generale XV a partire dall'alcol **44B-2**.
È stato ottenuto come solido giallino.

Resa: 52%

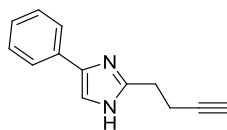
R.f. (CHCl₃/CH₃OH 95:5): 0.63

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 8.84 (d, *J*=4.4Hz, 1H), 8.35 (d, *J*=7.8Hz, 1H), 7.79-7.70 (m, 1H), 7.45 (dd, *J*=4.4Hz e 7.8Hz, 1H), 7.36-7.22 (m, 3H), 7.20 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.79-3.70 (m, 2H), 3.60-3.53 (m, 2H), 3.50 (s, 3H).

API-ES m/z: 372.0 [M+H]⁺.

2-(but-3-in-1-il)-4-fenil-1*H*-imidazolo

40



Una soluzione costituita da acido 4-pentinoico[€] (9.68mmol) in EtOH:H₂O 1:1 (20mL) è stata addizionata di Cs₂CO₃ (0.5eq.) e agitata a t.a. per 1h. Il solvente è stato evaporato e il grezzo è stato ripreso con DMF anidra (12.5mL); la soluzione risultante è addizionata goccia a goccia di una soluzione di bromoacetofenone[€] **38** (1eq.) in DMF anidra (6.5mL) conducendo la reazione a t.a. per 15 minuti. Il solvente è stato evaporato ed il risultante chetoestere **39** è stato ripreso con AcOEt. La soluzione organica è stata filtrata, essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata. Il grezzo è stato solubilizzato in xylene (50mL) e addizionato di NH₄OAc (15eq.). La miscela è stata rifluita per 2h impiegando una trappola Dean-Stark. Al termine, il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato ripreso con AcOEt. La soluzione organica è stata lavata con una soluzione satura di NaHCO₃, una soluzione satura di NaCl, essiccata con Na₂SO₄ ed infine evaporata. Il grezzo ottenuto è stato purificato con FC (PE/AcOEt 6:4) per ottenere **40** come un solido arancio basso fondente.

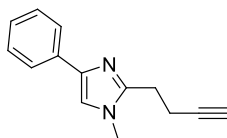
Resa: 98%

R.f. (etere di petrolio/etile acetato 6:4): 0.10

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.67 (d, *J*=7.4Hz, 2H), 7.40-7.23 (m, 4H), 3.02 (t, *J*=6.8Hz, 2H), 2.63 (dt, *J*=3.8Hz e 6.8Hz, 2H), 2.12 (t, *J*=3.8Hz, 1H).

2-(but-3-in-1-il)-4-fenil-1-metil-1*H*-imidazolo

41



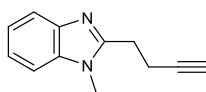
Una soluzione costituita da **40** (8.99mmol) in THF anidro (50mL) è stata raffreddata su bagno di ghiaccio, addizionata a spatolate di NaH 60% (1.5eq.) e agitata alla stessa temperatura per 30 minuti. Tale soluzione è stata addizionata goccia a goccia di MeI (1.1eq.) e riportata a t.a. Al termine, il solvente è stato evaporato e il residuo è stato ripreso con AcOEt. La soluzione organica è stata lavata con H₂O, una soluzione satura di NaCl, essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata. Il grezzo è stato purificato con FC (PE/AcOEt 1:1) per ottenere **41** come olio arancio.

Resa: 75%

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 6:4): 0.59

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.72 (d, *J*=7.4Hz, 2H), 7.39-7.20 (m, 3H), 7.08 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.97 (t, *J*=8Hz, 2H), 2.70 (t, *J*=8Hz, 2H), 2.00 (t, *J*=2.6Hz, 1H).

2-(but-3-in-1-il)-1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazolo
43⁸³



Il composto **43** è stato ottenuto mediante la metodica descritta per il composto **41** a partire dal butinil-benzimidazolo **42**.

Il prodotto è stato ottenuto per evaporazione della soluzione organica ed è stato utilizzato senza alcuna purificazione nella reazione successiva.

Resa: quantitativa

R.f. (etile acetato/etere di petrolio 1:1): 0.26

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃, δ/ppm): 7.75-7.71 (m, 1H), 7.32-7.23 (m, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.13 (t, *J*=7.6Hz, 2H), 2.84 (dt, *J*=2.4Hz e 7.6Hz, 2H), 2.01 (t, *J*=2.4Hz, 1H).

Materiali e Metodi per il saggio di inibizione enzimatica

La PDE10A umana (amminoacidi 14-779 della sequenza con numero di accesso NP_006652) è stata ottenuta amplificando l'RNA totale presente nel cervello umano. È stato applicato il protocollo standard RT-PCR clonando la sequenza nei siti BamH1 e Not1 del pFastBac-HTb (Invitrogen).

Tramite il sistema Bac-toBac[®] Baculovirus Expression System (Gibco) è stata indotta l'espressione della PDE10A nelle cellule Sf9 (derivate dal lepidottero *Spodoptera frugiperda*). Tali cellule sono state coltivate ad una temperatura di 27°C all'interno di un mezzo di coltura privo di siero e proteine di insetto, Sf-900 II, e contenenti 50 unità/mL di penicillina e 50 µg/mL di streptomina. In seguito le cellule sono state infettate con una concentrazione di 1 ml di virus/25 mL. Dopo 72h, le cellule sono state raccolte e sottoposte a lisi mediante un tampone (costituito da 50 mM Tris 8.0 + 1 mM MgCl₂ + PI + 0.5% triton) per 15 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugate a 20,000g per 20 minuti. La PDE10A è stata parzialmente purificata mediante Q Sepharose[®] e le frazioni più attive sono state riunite.

Il saggio sulla PDE10A è stato eseguito preparando campioni da 60 µL contenenti una quantità fissa di enzima (sufficiente a idrolizzare il 20-25% dei nucleotidi ciclici), un tampone (50 mM HEPES 7.6, 10 mM di MgCl₂, 0,02% Tween20), 0,1 mg/mL di BSA, 225 pCi di nucleotidi ciclici³H-marcati, ³H-cAMP, impiegato per una concentrazione finale di 5 nM, e quantità variabili di inibitori.

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

Dopo 1 ora al buio i granuli sono stati controllati con un contatore Wallac 1450 Microbeta. I segnali misurati sono stati convertiti in attività relativa paragonandoli ad un controllo non-inibibile (100%) e i valori di IC₅₀ sono stati calcolati usando l'estensione Xlfit di EXCEL.

Materiali e Metodi impiegati nel docking

I metodi computazionali impiegati in questo lavoro sono stati sviluppati mediante l'utilizzo di programmi in ambiente operativo Linux, distribuzione Ubuntu. I software impiegati sono elencati nella **Tabella 8** indicando la funzione svolta.

Software	Utilizzo
MOE 2010	Preparazione Proteina e Visualizzazione dei risultati
Gold Suite 5.1	Docking
Molegro Virtual Docker	Docking
Chimera	Visualizzazione risultati

Tabella 8. Software impiegato nello studio di docking.

Le catene **A** e **B**, con i loro ligandi, sono state isolate e modificate mediante MOE, con cui si è proceduto al blocco della posizione degli atomi pesanti. Dopodiché è stato modificato lo stato di protonazione della proteina attraverso la funzione *Protonate3D* controllando lo stato delle istidine, appartenenti al sito del metallo, che coordinano lo ione Zn^{2+} .

In seguito è stata eseguita una minimizzazione dell'energia del complesso ligando-proteina applicando il campo di forza (*force field*) *Amber-99 (Assisted Model Building with Energy Refinement)* ottimizzato per macromolecole, come le proteine. Infine sono state mantenute le molecole d'acqua appartenenti alla sfera di coordinazione dei due ioni metallici Zn^{2+} e Mg^{2+} , e, la rimozione delle altre molecole d'acqua insieme al ligando, ha condotto al modello proteico utilizzato per il docking.

La preparazione dei due ligandi (**Lig-A** e **Lig-B**) è stata effettuata controllando dapprima lo stato di protonazione delle due molecole e poi calcolando le cariche parziali impiegando *PM3* come *force field*, adatto a piccole molecole organiche.

Le catene e i ligandi così preparati sono stati importati senza ulteriore modifica in GOLD e Molegro Virtual Docker (MVD) per eseguire il docking dei due ligandi. In entrambi i software è stato scelto un raggio di ricerca di 20Å a partire dai corrispettivi *centroidi* dei due ligandi, precedentemente calcolati, e un numero di *pose* finali di 25.

Le *scoring function* esplorate sono state *ASP*, *ChemScore*, *GoldScore* e *PLP* in GOLD; in MVD è stata utilizzata *MolDockScore* [GRID] in combinazione con gli algoritmi di ricerca *MolDockSe* e *MolDockOptimizer*. In **Tabella 9** sono elencati i dati ottenuti con GOLD e MVD.

I software e le *scoring function* scelti per il docking del ligando **Lig-A** non hanno riproposto lo stesso comportamento del ligando co-cristallizzato. Con la funzione di *scoring ChemScore* è stata ottenuta una frequenza di sole 3 *pose* su 25 con un RMSD minimo di 1.24Å.

Il migliore risultato è stato ottenuto con la catena **B**, impiegando GOLD come software e *GoldScore* come funzione di scoring. La frequenza delle *pose*, aventi un RMSD inferiore ai 2.5Å (cioè la risoluzione minima del cristallo scelto), è stata di 21 *pose* su 25 con un RMSD minimo di 0.48Å.

Software		Docking Lig-A - Catena A				
		RMSD <2.5Å	RMSD min	RMSD max	RMSD mean	Freq. Pose
GOLD	ASP	1	1,34	7,67	6,76	1/25
	ChemScore	3	1,24	8,64	4,94	3/25
	GoldScore	over	3,68	8,40	4,32	0/25
	PLP	over	3,12	7,16	5,10	0/25
Molegro	MolDockSE	over	5,35	12,54	7,78	0/25
	MolDockOptimizer	over	3,69	11,55	8,15	0/25
Software		Docking Lig-B - Catena B				
		RMSD <2.5Å	RMSD min	RMSD max	RMSD mean	Freq. Pose
GOLD	ASP	1	1,68	9,18	6,49	1/25
	ChemScore	4	0,54	9,20	6,51	4/25
	GoldScore	21	0,48	8,77	1,30	21/25
	PLP	1	0,72	9,63	7,10	2/25
Molegro	MolDockSE	2	1,29	11,75	9,39	2/25
	MolDockOptimizer	1	2,28	9,41	7,62	

Tabella 9. Elenco dei software e delle *scoringfunction* applicate alle due catene per l'ottimizzazione del protocollo. I risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando la catena **B** e la *scoring function* *GoldScore* in GOLD.

In **Figura 22**, è rappresentato il sito catalitico della catena **B** con la sovrapposizione della *pose* ottenuta mediante *GoldScore* (in viola) su **Lig-B** (in arancio). Si può notare che le due strutture sono perfettamente sovrapponibili.

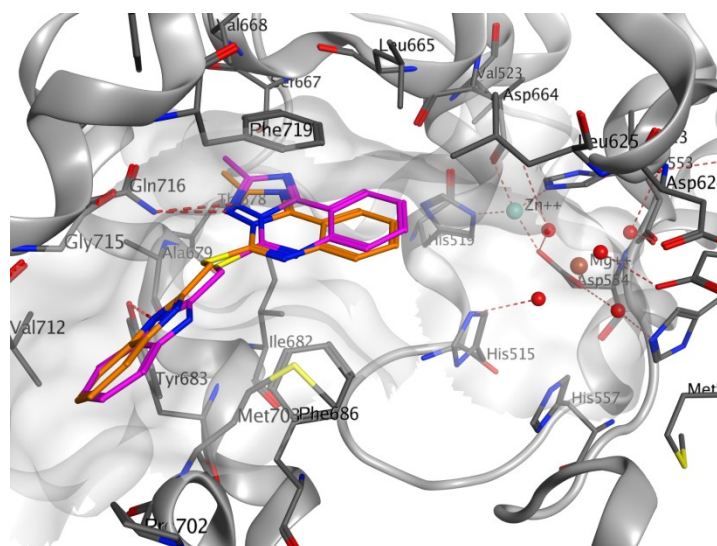


Figura 22. Sito catalitico della catena **B**. Sovrapposizione delle due strutture **Lig-B** (in arancio) e della *pose* (in viola, RMSD 0.48Å) ottenuta con *GoldScore*.

Il protocollo così ottenuto è stato quindi utilizzato per eseguire la predizione dei complessi del sito catalitico con le molecole presenti nel database.

Le molecole progettate sono state quindi inserite in un database con MOE e sono state calcolate le loro cariche parziali utilizzando gli stessi parametri visti per il ligando **Lig-B**. In seguito il database è stato importato in GOLD impiegando la stessa procedura

seguita precedentemente per effettuare il docking impiegando il modello della catena **Be** impostando il numero di *pose* a 15.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Sutherland, E. W. Studies on the Mechanism of Hormone Action. *Science* **1972**, *177*, 401-408.
 - ² Rall, T. W.; Sutherland, E. W.; Wosilait, W. D. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts. *J. Biol. Chem.* **1956**, *218*, 483-495.
 - ³ Sunahara, R.K.; Dessauer, C.W.; Gilman, A.G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 461-480.
 - ⁴ Hollmann, M. W.; Strumper, D.; Herroeder, S.; Durieux, M. E. Receptors, G proteins, and their interactions. *Anesthesiology* **2005**, *103*, 1066-1078.
 - ⁵ Ashman, D.F.; Lipton, R.; Melicow, M.M.; Price, T.D. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 330-334.
 - ⁶ Buxton, I. L. O. Farmacocinetica e farmacodinamica: dinamiche di assorbimento, distribuzione, azione ed eliminazione dei farmaci. In *Goodman&Gilman: Le Basi Farmacologiche della Terapia*, Ed. 11^a; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L.; McGraw-Hill: Milano; **2006**, 1-40.
 - ⁷ Beavo, J. A.; Brunton, L. L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 710-718.
 - ⁸ Clementi, E.; Bagetta, G.; Nisoli, E.; Nisticò, G. Farmacologia dell'ossido nitrico. In *Farmacologia generale e molecolare*, Ed. 3^a; Paoletti, R.; Nicosia, S.; Clementi, F.; Fumagalli, G.; UTET: **2004**, 580-598.
 - ⁹ Manallack, D. T.; Hughes, R. A.; Thompson, P. E. The next generation of phosphodiesterase inhibitors: structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3449-3462.
 - ¹⁰ Taskén, K.; Aandahl, E. M. Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiological Reviews* **2004**, *84*, 137-167.
 - ¹¹ Uzunov, P.; Weiss, B. Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *284*, 220-226.
 - ¹² Strada, S.J., Uzunov, P. and Weiss, B.: Ontogenetic development of a phosphodiesterase activator and the multiple forms of cyclic AMP phosphodiesterase of rat brain. *J. Neurochem.* **1974**, *23*, 1097-1103
 - ¹³ Chappie, T. A.; Helal, C. J.; Hou, X. Current Landscape of Phosphodiesterase 10A (PDE10A) Inhibition. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7299-7331.
 - ¹⁴ Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews* **1995**, *75*, 725-748.
 - ¹⁵ Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for

the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *109*, 366–398.

¹⁶Menniti, F. S.; Faraci, W. S.; Schmidt, C. J. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 660–670.

¹⁷Iffland, A.; Kohls, D.; Low, S.; Luan, J.; Zhang, Y.; Kothe, M.; Cao, Q.; Kamath, A. V.; Ding, Y.-H.; Ellenberger, T. Structural Determinants for Inhibitor Specificity and Selectivity in PDE2A Using the Wheat Germ *In Vitro* Translation System. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8312–8325.

¹⁸Mehats, C.; Andersen, C. B.; Filopanti, M.; Jin, S. L. C.; Conti, M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2002**, *13*, 29–35.

¹⁹Liu, S.; Mansour, M. N.; Dillman, K. S.; Perez, J. R.; Danley, D. E.; Aeed, P. A.; Simons, S. P.; Lemotte, P. K.; Menniti, F. S. Structural basis for the catalytic mechanism of human phosphodiesterase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13309–13314.

²⁰Sung, B.-J.; Hwang, K. Y.; Jeon, Y. H.; Lee, J. I.; Heo, Y.-S.; Kim, J. H.; Moon, J.; Yoon, J. M.; Hyun, Y.-L.; Kim, E.; Eum, S. J.; Park, S.-Y.; Lee, J.-O.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature* **2003**, *425*, 98–102.

²¹Houslay, M. D.; Schafer, P.; Zhang, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 1503–1519.

²²Zhang, K. Y. J.; Card, G. L.; Suzuki, Y.; Artis, D. R.; Fong, D.; Gillette, S.; Hsieh, D.; Neiman, J.; West, B. L.; Zhang, C.; Milburn, M. V.; Kim, S.-H.; Schlessinger, J.; Bollag, G. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 279–286.

²³Soderling, S. H.; Bayuga, S. J.; Beavo, J. A. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7071–7076.

²⁴Fujishige, K. K.; Kotera, J. J.; Michibata, H. H.; Yuasa, K. K.; Takebayashi, S. S.; Okumura, K. K.; Omori, K. K. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18438–18445.

²⁵Loughney, K.; Snyder, P. B.; Uher, L.; Rosman, G. J.; Ferguson, K.; Florio, V. A. Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* **1999**, *234*, 109–117.

²⁶Strick, C. A.; Schmidt, C. J.; Menniti, F. S. PDE10A: A Striatum-Enriched, Dual-Substrate Phosphodiesterase. In *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*; Eds. 1°. Francis, S.; Beavo, J.; Houslay, M., CRC Press: **2009**, 237–254.

²⁷Gross-Langenhoff, M. M.; Hofbauer, K. K.; Weber, J. J.; Schultz, A. A.; Schultz, J. E. J. cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *J. Biol. Chem.***2006**, *281*, 2841–2846.

²⁸Handa, N.; Mizohata, E.; Kishishita, S.; Toyama, M.; Morita, S.; Uchikubo-Kamo, T.; Akasaka, R.; Omori, K.; Kotera, J.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Crystal Structure of the GAF-B Domain from Human Phosphodiesterase 10A Complexed with Its Ligand, cAMP. *J. Biol. Chem.***2008**, *283*, 19657–19664.

²⁹Nishi, A.; Snyder, G. L. Advanced Research on Dopamine Signaling to Develop Drugs for the Treatment of Mental Disorders: Biochemical and Behavioral Profiles of Phosphodiesterase Inhibition in Dopaminergic Neurotransmission. *J. Pharmacol. Sci.***2010**, *114*, 6–16.

³⁰Charych, E. I.; Jiang, L.-X.; Lo, F.; Sullivan, K.; Brandon, N. J. Interplay of palmitoylation and phosphorylation in the trafficking and localization of phosphodiesterase 10A: implications for the treatment of schizophrenia. *J. Neurosci.***2010**, *30*, 9027–9037.

³¹O'Connor, V.; Genin, A.; Davis, S.; Karishma, K. K.; Doyère, V.; De Zeeuw, C. I.; Sanger, G.; Hunt, S. P.; Richter-Levin, G.; Mallet, J.; Laroche, S.; Bliss, T. V. P.; French, P. J. Differential amplification of intron-containing transcripts reveals long term potentiation-associated up-regulation of specific PDE10A phosphodiesterase splice variants. *J. Biol. Chem.***2004**, *279*, 15841–15849.

³²Fujishige, K.; Kotera, J.; Omori, K. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A Isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem***1999**, *266*, 1118–1127.

³³Seeger, T. F.; Bartlett, B.; Coskran, T. M.; Culp, J. S.; James, L. C.; Krull, D. L.; Lanfear, J.; Ryan, A. M.; Schmidt, C. J.; Strick, C. A.; Varghese, A. H.; Williams, R. D.; Wylie, P. G.; Menniti, F. S. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Research***2003**, *985*, 113–126.

³⁴Xie, Z.; Adamowicz, W.; Eldred, W.; Jakowski, A.; Kleiman, R.; Morton, D.; Stephenson, D.; Strick, C.; Williams, R.; Menniti, F. Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience***2006**, *139*, 597–607.

³⁵Sano, H.; Nagai, Y.; Miyakawa, T.; Shigemoto, R.; Yokoi, M. Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem***2008**, *105*, 546–556.

³⁶Tekin, S.; Cummings, J. L. Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry: an update. *J Psychosom Res***2002**, *53*, 647–654.

³⁷Bromberg-Martin, E. S.; Matsumoto, M.; Hikosaka, O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron***2010**, *68*, 815–834.

³⁸Bertran-Gonzalez, J.; Hervé, D.; Girault, J.-A.; Valjent, E. What is the Degree of

Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front. Neuroanat.***2010**, *4*: 136.

³⁹Nishi, A.; Kuroiwa, M.; Shuto, T. Mechanisms for the modulation of dopamine D1 receptor signaling in striatal neurons. *Front. Neuroanat.***2011**, *5*: 43.

⁴⁰Maxwell, C. R.; Kanes, S. J.; Abel, T.; Siegel, S. J. Phosphodiesterase inhibitors: A novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. *Neuroscience***2004**, *129*, 101–107.

⁴¹Menniti, F. S.; Chappie, T. A.; Humphrey, J. M.; Schmidt, C. J. Phosphodiesterase 10A inhibitors: a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs***2007**, *8*, 54–59.

⁴²Siuciak, J. A. J.; Chapin, D. S. D.; Harms, J. F. J.; Lebel, L. A. L.; McCarthy, S. A. S.; Chambers, L. L.; Shrikhande, A. A.; Wong, S. S.; Menniti, F. S. F.; Schmidt, C. J. C. Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology***2006**, *51*, 386–396.

⁴³Jeon, Y. H.; Heo, Y. S.; Kim, C. M.; Hyun, Y. L.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.***2005**, *62*, 1198–1220.

⁴⁴Steffan, J. S.; Kazantsev, A.; Spasic-Boskovic, O.; Greenwald, M.; Zhu, Y. Z.; Gohler, H.; Wanker, E. E.; Bates, G. P.; Housman, D. E.; Thompson, L. M. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***2000**, *97*, 6763–6768.

⁴⁵Gines, S.; Seong, I. S.; Fossale, E.; Ivanova, E.; Trettel, F.; Gusella, J. F.; Wheeler, V. C.; Persichetti, F.; MacDonald, M. E. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 497–508.

⁴⁶Sugars, K. L.; Brown, R.; Cook, L. J.; Swartz, J.; Rubinsztein, D. C. Decreased cAMP response element-mediated transcription, an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J. Biol. Chem.***2004**, *279*, 4988–4999.

⁴⁷Rouaux, C.; Loeffler, J.-P.; Boutillier, A.-L. Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1157–1164.

⁴⁸Hebb, A. L. O.; Robertson, H. A. Role of phosphodiesterases in neurological and psychiatric disease. *Curr. Opin. Pharmacol.***2007**, *7*, 86–92.

⁴⁹Hebb, A. L. O.; Robertson, H. A.; Denovan-Wright, E. M. Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms. *Neuroscience***2004**, *123*, 967–981.

⁵⁰Siuciak, J. A.; Strick, C. A. Treating neuropsychiatric disorders with PDE10A inhibitors.

*Drug Discov. Today: Ther. Strateg.***2006**, *3*, 527–532.

⁵¹Hoefgen, N.; Grunwald, C.; Langen, B. Targeting PDE10A in Schizophrenia. *Drugs of the Future***2012**, *37*, 577–589.

⁵²Helal, C. J.; Kang, Z.; Hou, X.; Pandit, J.; Chappie, T. A.; Humphrey, J. M.; Marr, E. S.; Fennell, K. F.; Chenard, L. K.; Fox, C.; Schmidt, C. J.; Williams, R. D.; Chapin, D. S.; Siuciak, J.; Lebel, L.; Menniti, F.; Cianfrogna, J.; Fonseca, K. R.; Nelson, F. R.; O'Connor, R.; MacDougall, M.; McDowell, L.; Liras, S. Use of Structure-Based Design to Discover a Potent, Selective, In Vivo Active Phosphodiesterase 10A Inhibitor Lead Series for the Treatment of Schizophrenia. *J. Med. Chem.***2011**, *54*, 4536–4547.

⁵³Chappie, T. A. T.; Humphrey, J. M. J.; Allen, M. P. M.; Estep, K. G. K.; Fox, C. B. C.; Lebel, L. A. L.; Liras, S. S.; Marr, E. S. E.; Menniti, F. S. F.; Pandit, J. J.; Schmidt, C. J. C.; Tu, M. M.; Williams, R. D. R.; Yang, F. V. F. Discovery of a series of 6,7-dimethoxy-4-pyrrolidylquinazoline PDE10A inhibitors. *J. Med. Chem.***2007**, *50*, 182–185.

⁵⁴Höfgen, N.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.-J.; Grunwald, C.; Langen, B.; Egerland, U.; Tremmel, P.; Pangalos, M. N.; Marquis, K. L.; Hage, T.; Harrison, B. L.; Malamas, M. S.; Brandon, N. J.; Kronbach, T. Discovery of imidazo[1,5-*a*]pyrido[3,2-*e*]pyrazines as a new class of phosphodiesterase 10A inhibitors. *J. Med. Chem.***2010**, *53*, 4399–4411.

⁵⁵Malamas, M. S.; Ni, Y.; Erdei, J.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.-J.; Grunwald, C.; Fan, K. Y.; Parris, K.; Langen, B.; Egerland, U.; Hage, T.; Marquis, K. L.; Grauer, S.; Brennan, J.; Navarra, R.; Graf, R.; Harrison, B. L.; Robichaud, A.; Kronbach, T.; Pangalos, M. N.; Hoefgen, N.; Brandon, N. J. Highly Potent, Selective, and Orally Active Phosphodiesterase 10A Inhibitors. *J. Med. Chem.***2011**, *54*, 7621–7638.

⁵⁶Schmidt, C. J.; Chapin, D. S.; Cianfrogna, J.; Corman, M. L.; Hajos, M.; Harms, J. F.; Hoffman, W. E.; Lebel, L. A.; McCarthy, S. A.; Nelson, F. R.; Proulx-LaFrance, C.; Majchrzak, M. J.; Ramirez, A. D.; Schmidt, K.; Seymour, P. A.; Siuciak, J. A.; Tingley, F. D.; Williams, R. D.; Verhoest, P. R.; Menniti, F. S. Preclinical Characterization of Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitors: A New Therapeutic Approach to the Treatment of Schizophrenia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.***2008**, *325*, 681–690.

⁵⁷Bauer, U.; Giordanetto, F.; Bauer, M.; O'Mahony, G.; Johansson, K. E.; Knecht, W.; Hartleib-Geschwindner, J.; Carlsson, E. T.; Enroth, C. Discovery of 4-hydroxy-1,6-naphthyridine-3-carbonitrile derivatives as novel PDE10A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***2012**, *22*, 1944–1948.

⁵⁸Kehler, J.; Ritzen, A.; Langgård, M.; Petersen, S. L.; Farah, M. M.; Bundgaard, C.; Christoffersen, C. T.; Nielsen, J.; Kilburn, J. P. Triazoloquinazolines as a novel class of phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***2011**, *21*, 3738–3742.

⁵⁹Asproni, B.; Murineddu, G.; Pau, A.; Pinna, G. A.; Langgård, M.; Christoffersen, C. T.; Nielsen, J.; Kehler, J. Synthesis and SAR study of new phenylimidazole-pyrazolo[1,5-

c]quinazolines as potent phosphodiesterase 10A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.***2011**, *19*, 642–649.

⁶⁰ Wager, T. T.; Chandrasekaran, R. Y.; Hou, X.; Troutman, M. D.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A.; Will, Y., Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chem. Neurosci.***2010**, *1*, 420–434.

⁶¹Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chem. Neurosci.***2010**, *1*, 435–449.

⁶² a) Hartman, G. D.; Phillips, B. T.; Halczenko, W. Iminium ion mediated cyclizations of 4-aryl-1,4-dihydropyridines. Bridging with acetals, carbonyls, and thiocarbonyls. *J. Org. Chem.***1985**, *50*, 2423–2427. b) Guanti, G.; Riva, R. Homochiral isoquinolines by lipase-catalysed resolution and their diastereoselective functionalisation. *Tetrahedron: Asymmetry***2001**, *12*, 1185–1200. c) Hickey, D. M. B.; Mackenzie, A. R.; Moody, C. J.; Rees, C. W. Vinyl azides in heterocyclic synthesis. Part 6. Synthesis of isoquinolines by intramolecular aza-Wittig reaction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1987**, 921–926.

⁶³ Janin, Y.L.; Roulland, E.; Beurdeley-Thomas, A.; Decaudin, D.; Monneret, C.; Poupon, M.F. Synthetic approaches to 1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxylic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **12002**; 529–532.

⁶⁴ Tsuchiya, T.; Sashida, H.; Konoshita, A. Thermal rearrangements of cyclic amine ylides. III. Intramolecular cyclization of 2-ethynylpyridine *N*-imides to 3-azaindolizine derivatives. *Chem. Pharm. Bull.***1983**, *31*, 4568–4572.

⁶⁵ Numata, A.; Kondo, Y.; Sakamoto, T.; General synthetic method for naphthyridines and their *N*-oxides containing isoquinolinic nitrogen. *Synthesis***1999**, *2*, 306–311.

⁶⁶ Roesch, K. R.; Larock, R. C. Synthesis of Isoquinolines and Pyridines by the Palladium- and Copper-Catalyzed Coupling and Cyclization of Terminal Acetylenes. *Org. Lett.***1999**, *1*, 553–556.

⁶⁷ Anderson, P. N.; Sharp, J. T. The reactions of 2-alkynylbenzaldehydes with hydrazides: a route to isoquinoline *N*-imines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1980**, 1331–1334.

⁶⁸ Yanada, R.; Obika, S.; Kono, H.; Takemoto, Y. In(OTf)₃-Catalyzed Tandem Nucleophilic Addition and Cyclization of *ortho*-Alkynylarylaldimines to 1,2-Dihydroisoquinolines. *Angew. Chem. Int. Ed.***2006**, *45*, 3822–3825.

⁶⁹ Roesch, K. R.; Larock, R. C. Synthesis of isoquinolines and pyridines by the palladium/copper-catalyzed coupling and cyclization of terminal acetylenes and unsaturated imines: the total synthesis of decumbenine B. *J. Org. Chem.***2002**, *67*, 86–94.

⁷⁰ Huang, Q.; Hunter, J. A.; Larock, R. C. Synthesis of Substituted Isoquinolines by

Electrophilic Cyclization of Iminoalkynes. *J. Org. Chem.***2002**, *67*, 3437–3444.

⁷¹ Yao, T.; Larock, R. C. Regio- and Stereoselective Synthesis of Isoindolin-1-ones via Electrophilic Cyclization. *J. Org. Chem.***2005**, *70*, 1432–1437.

⁷² Asao, N.; Yudha S, S.; Nogami, T.; Yamamoto, Y. Direct Mannich and Nitro-Mannich Reactions with Non-Activated Imines: AgOTf-Catalyzed Addition of Pronucleophiles to ortho-Alkynylaryl Aldimines Leading to 1,2-Dihydroisoquinolines. *Angew. Chem. Int. Ed.***2005**, *44*, 5526–5528.

⁷³ Ding, Q.; Wu, J. Lewis Acid- and Organocatalyst-Cocatalyzed Multicomponent Reactions of 2-Alkynylbenzaldehydes, Amines, and Ketones. *Org. Lett.***2007**, *9*, 4959–4962.

⁷⁴ Chen, Z.; Yang, X.; Wu, J. AgOTf-catalyzed tandem reaction of *N'*-(2-alkynylbenzylidene)hydrazide with alkyne. *Chem. Commun.***2009**, *23*, 3469–3471.

⁷⁵ Ye, S.; Yang, X.; Wu, J. Silver triflate-catalyzed three-component reaction of 2-alkynylbenzaldehyde, sulfonylhydrazide, and α,β -unsaturated carbonyl compound. *Chem. Commun.***2010**, *46*, 5238–5240.

⁷⁶ Yu, X.; Chen, Z.; Yang, X.; Wu, J. Tandem Reactions of *N'*-(2-Alkynylbenzylidene)hydrazides with Silyl Enolates: A Facile Route to *H*-Pyrazolo[5,1-*a*]isoquinolines. *J. Comb. Chem.***2010**, *12*, 374–378.

⁷⁷ Poon, S. F.; St Jean, D. J., Jr.; Harrington, P. E.; Henley, C., III; Davis, J.; Morony, S.; Lott, F. D.; Reagan, J. D.; Lu, J. Y.-L.; Yang, Y.; Fotsch, C. Discovery and Optimization of Substituted 1-(1-Phenyl-1*H*-pyrazol-3-yl)methanamines as Potent and Efficacious Type II Calcimimetics. *J. Med. Chem.***2009**, *52*, 6535–6538.

⁷⁸ Zhang, X.; Zhou, Y.; Wang, H.; Guo, D.; Ye, D.; Xu, Y.; Jiang, H.; Liu, H. An Effective Synthetic Entry to Fused Benzimidazoles via Iodocyclization. *Adv. Synth. Catal.***2011**, *353*, 1429–1437.

⁷⁹ Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins***2002**, *47*, 409–443.

⁸⁰ Cividini, S. (2004) - *Studio 3D-QSAR per inibitori della cicloossigenasi-2 (COX-2): conformazioni nel sito attivo e modellazione della risposta farmacologica*. Tesi di Master di primo livello, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano-Bicocca.

⁸¹ Matsuda, T.; Makino, M.; Murakami, M. Synthesis of Seven-Membered Ring Ketones by Arylative Ring-Expansion of Alkyne- Substituted Cyclobutanones. *Angew. Chem. Int. Ed.***2005**, *44*, 4608–4611.

⁸² H. Lundbeck A/S; Novel phenylimidazole derivatives as PDE10A enzyme inhibitors. Patent WO2009/152825 A1; **2009**.

⁸³ Addex Pharmaceuticals SA; Novel alkynyl derivatives as modulators of metabotropic glutamate receptors. Patent WO2005/123703 A2; **2005**.