



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXIV  
COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

## **Progettazione, sintesi ed attività di inibitori del Proteasoma a base peptidica**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

**Dottorando**

Dott. Franceschini Christian

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Marastoni Mauro

---

*(firma)*

Anni 2009/2011

*Ai miei genitori*



Il tuo indirizzo e-mail

*fmcrs@unife.it*

Oggetto:

*Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato*

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

*Franceschini Christian*

Nato a:

*Ferrara*

Provincia:

*Ferrara*

Il giorno:

*28 Settembre 1983*

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

*Scienze Farmaceutiche*

Ciclo di Dottorato

*24*

Titolo della tesi (in lingua italiana):

*Progettazione, sintesi ed attività di inibitori del Proteasoma a base peptidica*

Titolo della tesi (in lingua inglese):

*Design, synthesis and activity of Proteasome peptide-based inhibitors*

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

*Marastoni Mauro*

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

*CHIM/08*

Parole chiave della tesi (max 10):

*Proteasoma, inibitori, peptidi Proteasome, inhibitors, peptides*

Consapevole, dichiara

CONSAPEVOLE: (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei

supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito: <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze; DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ: (1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; (3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; (4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO.

Firma del dottorando

Ferrara, li 01/03/2012

Firma del Dottorando \_\_\_\_\_

Firma del Tutore

Visto: Il Tutore Si approva

Firma del Tutore \_\_\_\_\_

# **PROGETTAZIONE, SINTESI ED ATTIVITA' DI INIBITORI DEL PROTEASOMA A BASE PEPTIDICA**

Tutore: Prof. MAURO MARASTONI

Dottorando: Dott. CHRISTIAN FRANCESCHINI

## **ABSTRACT**

Il proteasoma 26S è un complesso enzimatico multicatalitico intracellulare che svolge un ruolo essenziale nel riconoscere e degradare proteine ubiquitinate.

Tale complesso proteolitico è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi delle proteine, nel ciclo cellulare, nella trascrizione e nella risposta immune, generando peptidi in grado di legare le molecole del maggior complesso di istocompatibilità (MHC) di classe I. L'attività proteolitica del proteasoma 26S ha sede nel "core" 20S fiancheggiato da due subunità regolatorie 19S. Le subunità catalitiche  $\beta$  risiedono negli anelli centrali del core 20S; in particolare, in  $\beta 1$  ha sede l'attività simil-caspasica (PGPH), in  $\beta 2$  quella tripsino simile (T-L) ed in  $\beta 5$  la chimotripsino simile (ChT-L).

Potenziatori inibitori del proteasoma selettivi per le singole attività proteolitiche potrebbero fungere da agenti antiproliferativi, anticancro, ed aprire nuovi protocolli terapeutici per importanti patologie legate alla risposta immune. Lo studio di tali inibitori ha rivelato utili informazioni circa la struttura dell'enzima, il meccanismo catalitico e la possibilità di modularne l'attività, influenzandone così la risposta fisiologica.

Nel mio dottorato di ricerca mi sono occupato della progettazione, sintesi ed attività biologica di molecole pseudopeptidiche recanti diverse unità farmacoforiche in posizione C-terminale, quali potenziali substrati per l'interazione con la treonina catalitica enzimatica, in grado di inibire in modo specifico e selettivo il complesso multicatalitico.

In base ai dati emersi da altre serie di inibitori sviluppate nel nostro gruppo di ricerca, che hanno fornito interessanti risultati biologici, si sono progettate e preparate molecole a base peptidica recanti nuove unità farmacoforiche C-terminali di tipo N-allil, vinil estereo, N-acilpirrolico  $\alpha, \beta$ -insaturo, vinil chetonico, butadienil, etil estereo parzialmente retroinvertito, divinil chetonico a simmetria  $C_2$  ed isossazolin, vinil estereo. L' $N\alpha$ -ammina terminale è stata funzionalizzata con i raggruppamenti che hanno fornito i risultati più soddisfacenti nelle serie precedenti.

I nuovi composti sono stati saggati sull'enzima isolato in base alla loro capacità di inibire le tre diverse attività catalitiche del proteasoma: alcuni di questi, come per i derivati N-acilpirrolici, hanno mostrato un'inibizione potente e selettiva nei confronti del sito post-acidico  $\beta 1$ ; altri come i vinil chetoni, sono risultati blandamente attivi per il sito triptico  $\beta 2$ . Per le altre serie non si sono avuti i risultati attesi, evidenziando che le nuove unità farmacoforiche non rappresentano un substrato favorevole per l'interazione primaria con la treonina catalitica.

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>La via metabolica ubiquitina-proteasoma</b>	<b>2</b>
<b>Il proteasoma</b>	<b>2</b>
<b>Sistema ubiquitina-proteasoma</b>	<b>11</b>
<b>INIBITORI DEL PROTEASOMA</b>	<b>17</b>
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>23</b>
<b>Serie N-allil, vinil esterea</b>	<b>28</b>
<b>Serie N-acilpirrolica <math>\alpha,\beta</math>-insatura</b>	<b>40</b>
<b>Serie vinil chetonica</b>	<b>51</b>
<b>Serie butadienil, etil esterea retroinvertita</b>	<b>61</b>
<b>Serie divinil chetonica a simmetria C2</b>	<b>72</b>
<b>Serie isossazolin, vinil esterea</b>	<b>86</b>
<i>Sintesi degli inibitori</i>	
<i>Isolamento e purificazione del proteasoma</i>	
<i>Saggi di inibizione enzimatica</i>	
<i>Conclusioni</i>	
<b>CONCLUSIONI GENERALI</b>	<b>98</b>

<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>100</b>
<i>Materiali e metodi</i>	<b>100</b>
<i>Procedure sintetiche generali</i>	<b>101</b>
<i>Purificazione dei proteasomi</i>	<b>113</b>
<i>Test di attività dei proteasomi</i>	<b>113</b>
<i>Test di inibizione enzimatica</i>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>115</b>



## **INTRODUZIONE**

Lo studio riguardante gli inibitori del proteasoma rappresenta un campo di ricerca in costante sviluppo sia in ambito accademico che industriale. Queste molecole sono strumenti fondamentali per lo studio degli importanti processi cellulari regolati dalla via metabolica “ubiquitina-proteasoma”, che rappresenta un importante bersaglio nel trattamento di patologie quali il cancro, distrofie muscolari, infiammazioni e disturbi immunitari.

Attualmente numerosi sono gli inibitori del complesso enzimatico multicatalitico sottoposti a studi clinici avanzati quali potenziali farmaci anticancro. Il Bortezomib (Velcade®), un derivato boronico pseudo dipeptidico, è da qualche tempo in terapia per il trattamento del mieloma multiplo e del linfoma delle cellule della corteccia cerebrale refrattari ad altri protocolli terapeutici.

## La via metabolica ubiquitina-proteasoma

### Il proteasoma

Il proteasoma è un complesso enzimatico multicatalitico di grandi dimensioni (2,5 MDa) ubiquitario nel nucleo e nel citoplasma delle cellule eucariotiche, dove presiede alla demolizione di proteine ad aminoacidi e peptidi con attività sia endo- che eso-peptidasica.

La proteolisi è ATP dipendente e per avvenire è necessario che la proteina da degradare sia marcata con ubiquitina.

**Tabella 1. PROPRIETÀ SPECIFICHE DEL PROTEASOMA**

Distribuzione ubiquitaria
Localizzazione citoplasmatica e nucleare
Dimensioni enormi (2.5 MDa)
Struttura cilindrica cava
ATP-dipendente
Proteasi unica, non un insieme di proteasi
Riconoscimento dei substrati marcati con ubiquitina
Sei siti attivi con tre differenti attività, confinati in compartimenti isolati
Meccanismo catalitico basato sulla treonina N-terminale

Il complesso è costituito da una struttura dalla tipica forma a barile, denominata core 20S, all'interno del quale avviene la degradazione delle proteine marcate. La compartimentalizzazione e la necessità di una marcatura sulla proteina da degradare, impediscono processi digestivi di molecole che devono invece rimanere integre.

Importante è il fatto che al core possono essere associati diversi tipi di regolatori (19S e 11S/PA28) e che il controllo della proteolisi può essere determinato anche da specifici fattori in grado di indirizzare il proteasoma in compartimenti cellulari specifici.

Oltre a disporre di diverse attività peptidasiche il proteasoma è anche in grado di riconoscere e legare catene di poliubiquitina, deubiquitinare la proteina bersaglio (permettendo così il riciclo dell'ubiquitina stessa), denaturare l'elemento da digerire e traslocarlo nella camera proteolitica.

**Tabella 2. ATTIVITÀ ASSOCIATE AL PROTEASOMA 26S**

Riconoscimento e legame dei “grappoli” di ubiquitina

Deubiquitinazione

Unfolding/folding di proteine

Traslocazione delle proteine all'interno della camera proteolitica

Degradazione delle proteine (attività peptidasica)

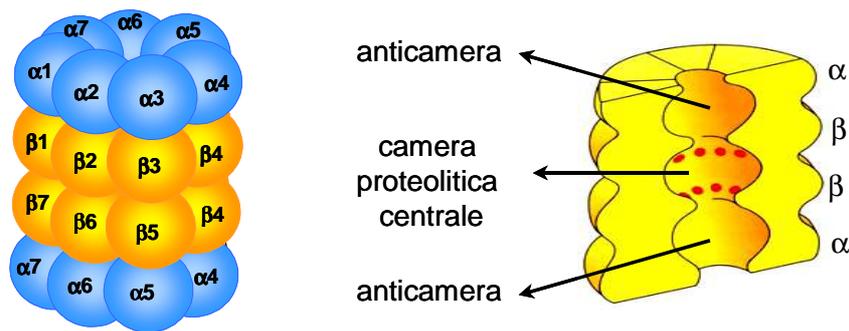
Il cuore catalitico dell'enzima è rappresentato dal proteasoma 20S che è un sistema complesso formato da 28 subunità equamente suddivise in 4 anelli da sette subunità ognuno.

I due anelli esterni sono costituiti da subunità  $\alpha$ , mentre i due interni da subunità  $\beta$ . La struttura è organizzata in modo tale da formare due anticamere tra gli anelli  $\alpha$  e  $\beta$ , e una camera centrale, a livello della quale avviene la proteolisi, tra i due anelli  $\beta$  <sup>1, 2, 3</sup> (Figura 1).

<sup>1</sup> Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdwill JW, Bennink JR. *J Exp Med* 2001; 193: 1319-26.

<sup>2</sup> Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. *J Immunol* 2000; 164: 1346-54.

<sup>3</sup> Boes B, Hengel H, Ruppero T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM. *J Exp Med* 1994; 179: 901-9.



**Figura 1. Rappresentazione schematica del proteasoma 20S.**

**A sinistra:** le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  costituiscono gli anelli che sovrapposti formano la struttura a barile tipica del proteasoma 20S.

**A destra:** sezione verticale del proteasoma 20S. Le anticamere sono create grazie alla struttura tridimensionale degli anelli  $\alpha$ ; entrambi gli anelli  $\beta$  danno invece origine alla camera proteolitica che risulta essere in posizione centrale.

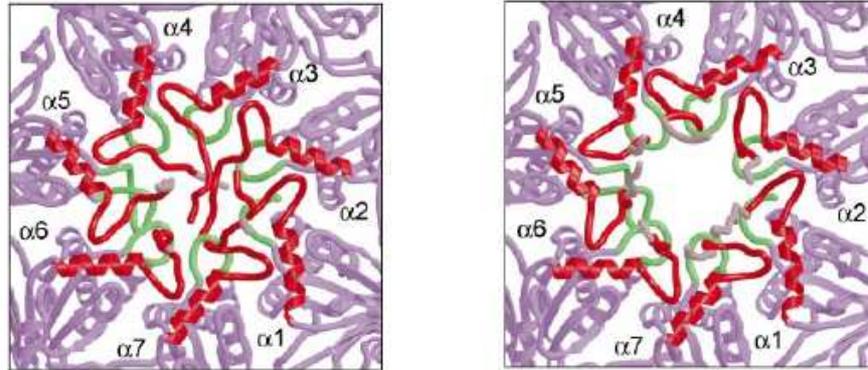
Il meccanismo di assemblaggio delle subunità non è ancora del tutto definito, ma è certo che richieda un processo altamente orchestrato per assicurare il corretto posizionamento di ciascuna subunità e la formazione di un complesso funzionale <sup>4</sup>.

La geometria di assemblaggio e la conformazione che le subunità  $\alpha$  assumono in fase di “riposo” fanno sì che sequenze di 20-30 aminoacidi N-terminali delle suddette subunità protendano verso l’entrata del complesso, in modo tale da formare un vero e proprio cancello che impedisce l’ingresso a molecole che non devono essere degradate.

Il legame di una proteina ubiquitinata con il sito di riconoscimento genera un cambio conformazionale che contrae le sequenze cancello con

<sup>4</sup> Mullapudi S, Pullan L, Bishop OT, Khalil H, Stoops JK, Beckmann R, et al. *Biophysical Journal* 2004; 87: 4098-105.

conseguente apertura dell'ingresso permettendo così alla proteina di procedere verso la camera proteolitica <sup>5</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Rappresentazione schematica delle catene  $\alpha$  .**

**A sinistra:** le sequenze N-terminali di ciascuna subunità  $\alpha$  occludono l'entrata del proteasoma.

**A destra:** il cambio conformazionale delle catene  $\alpha$  a seguito del legame con le proteine ubiquitinate determina l'apertura del foro del proteasoma 20S.

La camera proteolitica, come già detto, è costituita dagli anelli  $\beta$ . Ogni anello presenta tre siti proteolitici a diversa attività, associati ognuno alle subunità  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ . Queste subunità vengono generate come precursori più lunghi che, al momento dell'assemblaggio, per autocatalisi, si accorciano all'N-terminale. Il risultato è l'esposizione di una treonina (Thr) N-terminale, che rappresenta la funzione catalitica. Le altre subunità  $\beta$ , che non vengono processate, non presentano questa Thr e non sono catalitiche. Importante è anche il fatto che le subunità catalitiche, prese singolarmente come monomeri, sono inattive e permettono la proteolisi solo nel complesso assemblato. Ecco perché il

<sup>5</sup> Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, et al. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 1062-7.

proteasoma 20S viene definito come un complesso multicatalitico, piuttosto che come un insieme di proteasi <sup>3</sup>.

Le subunità  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  contengono quindi il residuo catalitico. La catalisi che operano è diversa perché diversa è l'affinità che le rispettive subunità e i loro intorni hanno nei confronti dei substrati <sup>6</sup>.

I siti attivi delle subunità  $\beta 1$  sono chiamati caspasi ("Caspase-like") e hanno attività post-acidica, ossia idrolizzano legami peptidici dopo residui acidi. L'appellativo "Caspase-like" è dovuto al fatto che il taglio dopo residui di aspartato è più veloce di quello dopo residui di glutammato. Le subunità  $\beta 2$  catalizzano invece l'idrolisi peptidica dopo residui basici e, data questa analogia con la tripsina, vengono anche chiamate triptiche ("Trypsin-like"). I siti catalitici delle subunità  $\beta 5$  invece, tagliano dopo residui idrofobici e aromatici; per questo vengono anche chiamati chimotriptici ("Chimotrypsin-like"). Va ricordato che gli appellativi richiamano il nome di enzimi classici solo per quanto riguarda il substrato, e non per l'attività catalitica.

<b>Tabella 3. ATTIVITÀ PROTEOLITICHE DEL PROTEASOMA</b>		
<b>Subunità</b>	<b>Attività peptidasica</b>	<b>Taglio dopo aminoacidi:</b>
<b><math>\beta 5/X</math></b>	"Chymotrypsin-like" o chimotriptica	Idrofobici e aromatici
<b><math>\beta 1/Y</math></b>	"Caspase-like" o post-acidica	Acidi
<b><math>\beta 2/Z</math></b>	"Trypsin-like" o triptica	Basici

Oltre a quelle sopra riportate, al proteasoma sono state ascritte anche altre due attività: "branched-chain amino acid-preferring" responsabile del taglio dopo un aminoacido con catena laterale ramificata come Leu; e "small neutral amino acid-preferring" poiché il taglio è eseguito dopo un aminoacido neutro e di piccole dimensioni. Queste non dipendono

---

<sup>6</sup> Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL. *Mol Cell* 1999; 4: 395-402.

da altri siti catalitici, ma da quelli già citati, anche se non è ancora chiaro se possano essere attribuite in particolare ad uno di questi <sup>7</sup>.

Le attività dei tre siti non sono indipendenti l'una dall'altra. Quella chimotriptica, infatti, limita le altre due in modo tale che l'attività proteolitica avvenga per cicli di attivazione e inattivazione del sito chimotriptico. L'azione dei tre siti permette la generazione di frammenti oligopeptidici sufficientemente corti da poter fuoriuscire dal complesso. I prodotti di proteolisi sono infatti sequenze da 3 a 26 residui, con lunghezza media di 6 aminoacidi.

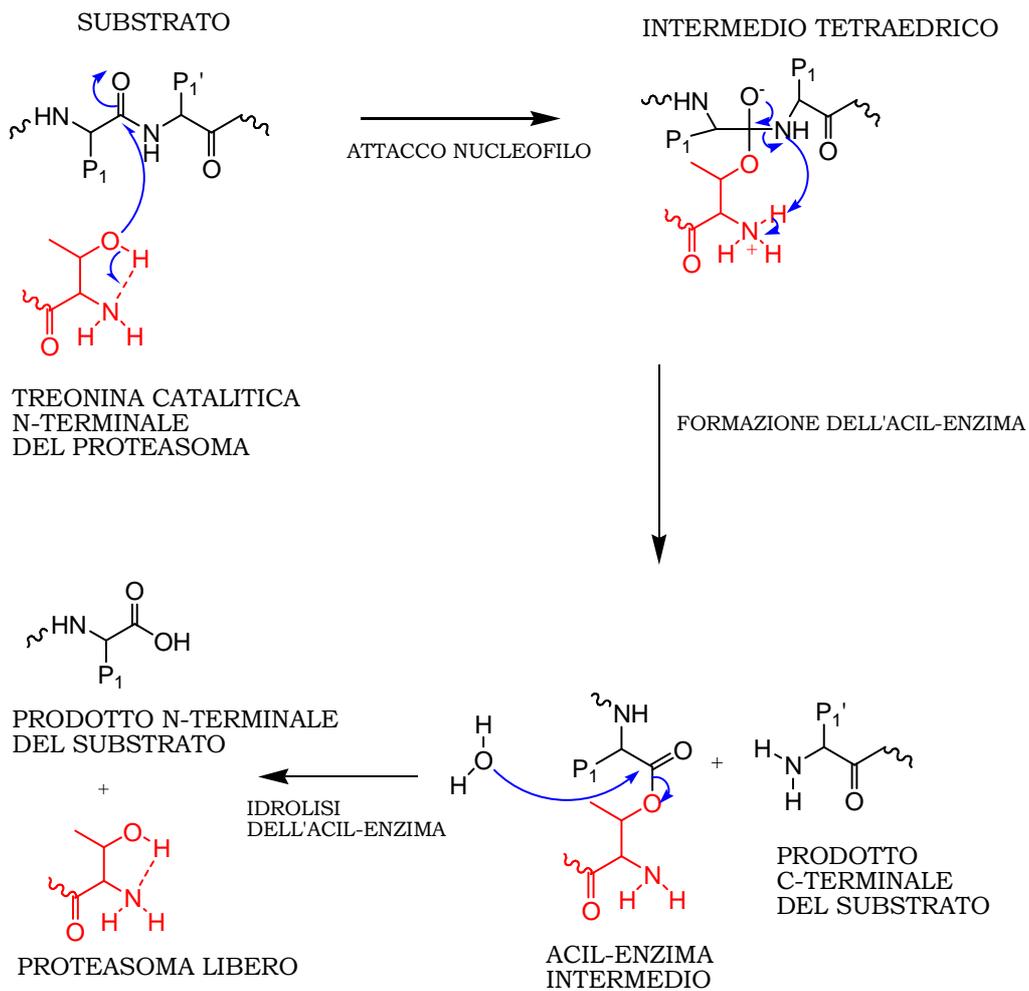
Come già detto, per operare la catalisi, è fondamentale il residuo di Thr N-terminale delle subunità catalitiche. Lo studio del meccanismo d'azione ha messo in luce che tale residuo è responsabile di un attacco nucleofilo al carbonile ammidico del punto di taglio; ciò che si forma è un intermedio tetraedrico che evolve all'acil-enzima e alla componente peptidica di taglio libera all'N-terminale. A questo punto interviene una molecola d'acqua che catalizza il distacco del peptide rimasto legato all'enzima, rigenerando il sito catalitico (Figura 3).

Questo meccanismo è comune a tutte e tre le attività proteolitiche del proteasoma, ed è la base chimica di una classe di proteasi definita "idrolasi nucleofila N-terminale".

Lo studio ai raggi X dei complessi enzima-inibitore ha evidenziato che la formazione di un legame emiacetalico con l'OH in catena laterale della Thr blocca l'attività dell'enzima.

---

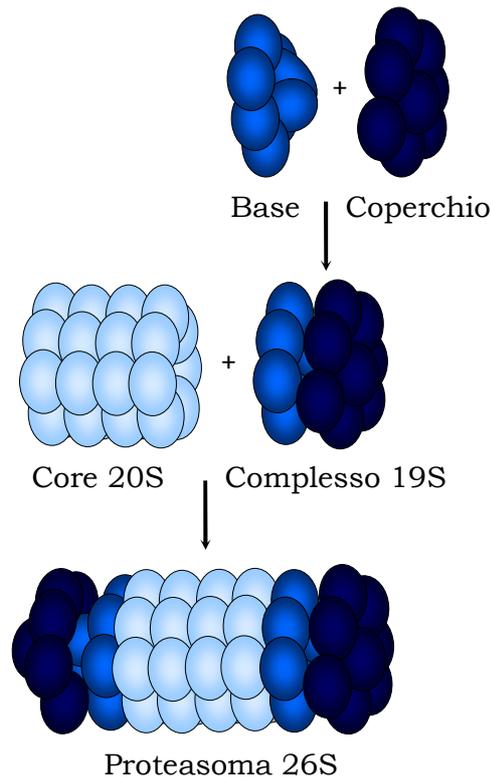
<sup>7</sup> Gaczynska K, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9213-17.



**Figura 3. Meccanismo catalitico del proteasoma.**

Il core 20S può associarsi a diversi regolatori che hanno la funzione di riconoscere i substrati ubiquitinati e di favorire il loro passaggio alla camera proteolitica.

Uno dei regolatori principali è chiamato 19S (PA700) (Figura 4). Si tratta di un complesso di 890 KDa che si posiziona, con meccanismo ATP-dipendente, in testa e/o in coda al core 20S, in modo da formare il complesso 19S-20S-19S o il single capped 19S-20S. Non è però ancora chiaro quale delle due strutture sia più importante nella proteolisi.



**Figura 4. Rappresentazione schematica del proteasoma 20S.**

Il core 20S si associa ai regolatori 19S dando origine al proteasoma 26S

Il più grande dei due (19S-20S-19S) ha massa di 2,5 MDa ed, ai raggi X, risulta lungo 45 nm e largo 20 nm.

È stato osservato che i complessi 19S, nonostante presi singolarmente siano strutture rigide e rimangono legati al core 20S, presentano una certa flessibilità spaziale. Ogni elemento è costituito da una base e da un coperchio, dove la base è formata da 8 subunità: due di grandi dimensioni, e 6 ATP-asi che si assemblano a formare un'interfaccia tra il coperchio e il core 20S.

Le subunità del cap adempiono a diverse funzioni, prima fra tutte all'assemblaggio ATP-dipendente del 19S al 20S. Una volta formato il complesso, le subunità della base regolano anche altri tipi di eventi: controllano la pervietà del canale centrale del proteasoma, l'accessibilità alla camera proteolitica e, possedendo anche attività di unfolding,

contribuiscono alla denaturazione delle proteine in modo tale da linearizzarle per facilitarne l'ingresso.

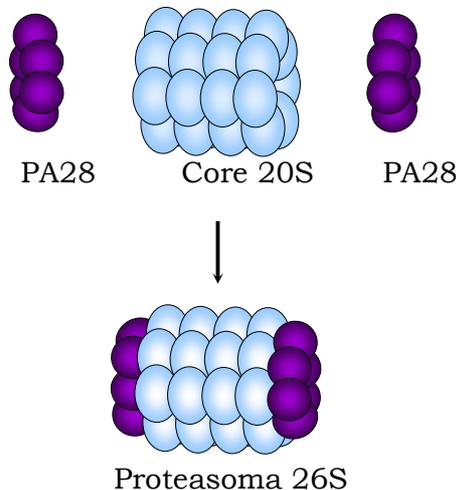
Il coperchio è costituito anch'esso da 8 subunità, di cui solo una non ha omologia di sequenza con le altre proteine del complesso; esso è fondamentale al processo di proteolisi selettiva operata dal proteasoma. Il coperchio, infatti, permette di riconoscere e legare la catena di poliubiquitina con elevata affinità in modo tale da consentire il corretto riconoscimento delle proteine bersaglio.

Il tempo di interazione tra proteina ubiquitinata e coperchio, che dipende dalle dimensioni del grappolo, è fondamentale per il destino della proteina: interazioni brevi, che corrispondono a grappoli piccoli, non sono sufficienti per permettere al proteasoma di internalizzarla. Sequenze di ubiquitina più lunghe invece, permettono un tempo di legame sufficiente ad innescare il processo di degradazione. Inoltre, alcune subunità del coperchio hanno attività deubiquitinante e staccano le molecole di ubiquitina dalla proteina bersaglio in modo tale da permettere il riciclo del marker <sup>5</sup>.

Oltre al 19S, esiste anche un altro regolatore del proteasoma: il complesso 11S (o PA28), un eterodimero costituito da tre paia alternate di subunità  $\alpha$  e  $\beta$  non identiche, ma che presentano un certa omologia tra loro. Queste sono assemblate in una struttura cava di 200 KDa a geometria conica e con un diametro interno di circa 3 nm. Come il 19S, anche 11S può associarsi a una e/o all'altra estremità del 20S; ciò che differenzia i due processi, è che in quest'ultimo caso, l'assemblaggio avviene con un meccanismo che non è ATP-dipendente (Figura 5).

Il cap 11S favorisce l'uscita dei peptidi processati dalla camera centrale e modula l'attività degradativa del proteasoma che, in sua presenza, genera peptidi diversi con efficienza maggiore. In particolare 11S sembra essere cruciale per la produzione di peptidi in grado di associare molecole di MHC-I, tant'è che la sua espressione è regolata da IFN- $\gamma$ ;

questo suggerisce il suo coinvolgimento nel meccanismo di produzione di epitopi immunogenici <sup>8, 9, 10</sup>.



**Figura 5. Rappresentazione schematica del proteasoma 26S.**

Il core 20S è in questo caso associato ai regolatori PA28.

## Sistema ubiquitina-proteasoma

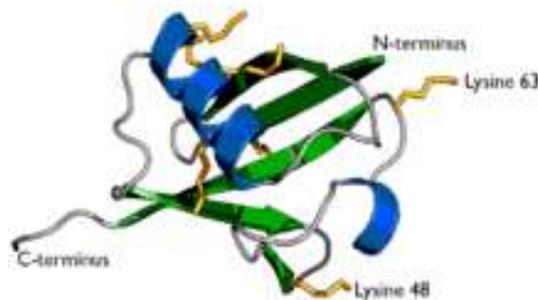
Nonostante il proteasoma sia responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine cellulari, il processo di proteolisi è selettivo e solo le proteine ubiquitinate possono accedere alla camera proteolitica. L'ubiquitinazione è un processo ATP-dipendente che consiste nel legare delle catene di ubiquitina a residui specifici della proteina da digerire.

<sup>8</sup> Huang X, Seifert U, Salzmann U, Henklein P, Preissner R, Henke W, et al. *J Mol Biol* 2002; 323: 771-82.

<sup>9</sup> Van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, et al. *J Exp Med* 2000; 192: 483-94.

<sup>10</sup> Rechsteiner M, Hill CP. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 27-33.

L'ubiquitina è una piccola proteina globulare del peso di 8 kDa costituita da 76 aminoacidi (Figura 6). La marcatura con catene costituite da questa proteina è necessaria alla degradazione del substrato che, come tale, non verrebbe riconosciuto e di conseguenza non potrebbe essere processato. La specificità di questo sistema dipende da una serie di fattori che permettono il riconoscimento e la marcatura delle proteine da idrolizzare e da altri che ne consentono il riconoscimento e la degradazione <sup>11,12,13,14</sup>.



**Figura 6. Monomero di ubiquitina.** Questa proteina è ubiquitaria negli eucarioti ed altamente conservata tra le specie; la struttura tridimensionale dell'ubiquitina rimane essenzialmente identica in tutte le cellule ed all'analisi ai raggi X e all'NMR, risulta molto compatta e rigida.

La marcatura del bersaglio con avviene attraverso la formazione di un legame isopeptidico tra il C-terminale dell'ubiquitina e il gruppo amminico di un residuo di lisina. Il proteasoma 26S riconosce e degrada la proteina quando a questa sono legati i monomeri di ubiquitina. La coniugazione consuma ATP, ed è mediata da tre diversi gruppi di enzimi denominati E1, E2 ed E3 che, oltre a catalizzare il processo, lo rendono specifico.

---

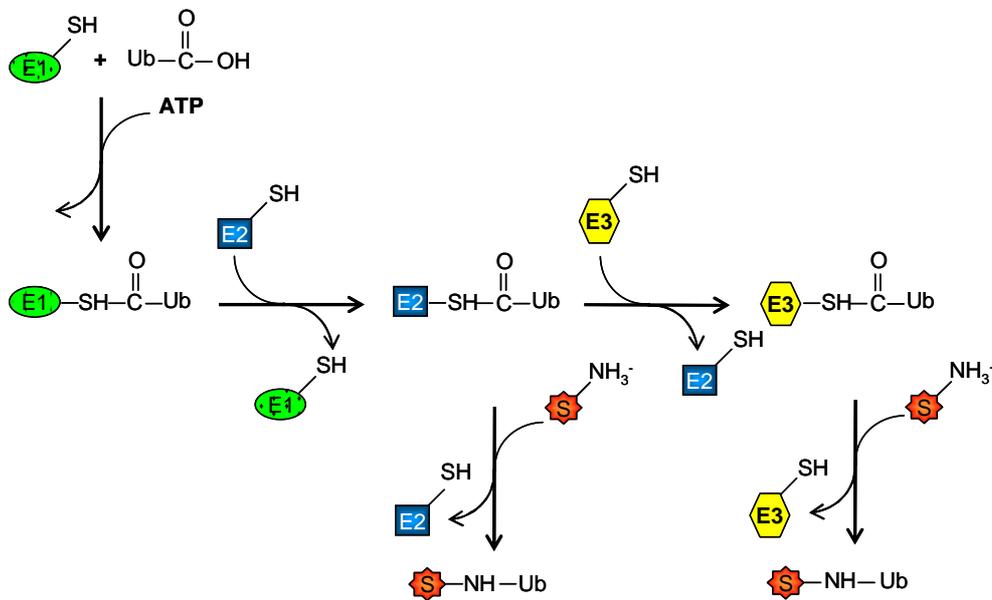
<sup>11</sup> Ben-Neriah Y. *Nat Immunol* 2002; 3: 20-6.

<sup>12</sup> Ciechanover A. *EMBO Journal* 1998; 17: 7151-60.

<sup>13</sup> Myung J, Kim KB, Crews CM. *Med Res Rev* 2001; 21: 245-73.

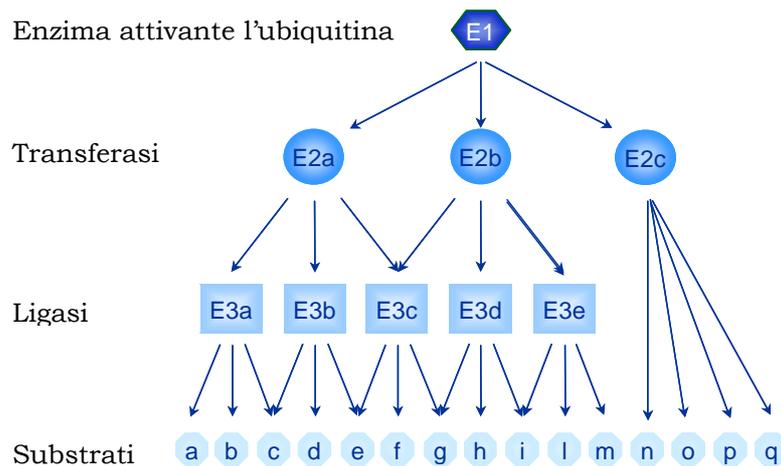
<sup>14</sup> Miller J, Gordon C. *FEBS Lett* 2005; 579: 3224-30.

La prima reazione è catalizzata dall'enzima E1 che serve ad attivare l'ubiquitina: il C-terminale dell'ubiquitina (Gly 76), mediante una reazione ATP-dipendente, viene legato al residuo catalitico cisteinico di E1, con formazione di un tioestere. A questo punto l'ubiquitina viene trasferita al sito catalitico dell'enzima E2, anch'esso cisteinico, e da esso alla ligasi E3, che provvede a legarla mediante legame isopeptidico tra Gly76 e le catene laterali dei residui di lisina presenti nel substrato da marcare. In alcuni casi, però, E2 trasferisce l'ubiquitina direttamente alla proteina bersaglio senza l'intervento di E3 (Figura 7).



**Figura 7. Coniugazione dell'ubiquitina alle proteine target.**

La catena enzimatica E1, E2 ed E3 opera in modo ciclico, permettendo la formazione di un “grappolo” di ubiquitina attaccando la successiva alla Lys48 di quella già legata al substrato. La specificità del meccanismo dipende dai diversi tipi di transferasi (E1 ed E2) e ligasi (E3) che, combinandosi, permettono la marcatura selettiva <sup>15</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Sistema di coniugazione dell'ubiquitina e specificità del processo di ubiquitinazione.** Nelle cellule di mammifero esiste un solo tipo di E1, 15 differenti tipi di E2 e circa un centinaio di E3. Dalla loro combinazione si ottiene la specificità di marcatura del substrato.

L'attivazione dei processi idrolitici è consentita dalla presenza di specifici segnali di degradazione posti sulla proteina bersaglio. Questi vengono riconosciuti dagli enzimi E2 ed E3 che procedono quindi a marcare con ubiquitina la proteina, direzionandola poi alla degradazione nel core del proteasoma. I principali segnali che portano alla marcatura sono: l'N-terminale <sup>16</sup>, la fosforilazione di sequenze PEST <sup>17</sup>, la presenza di “destruction box” e la perdita di conformazione <sup>18</sup>.

---

<sup>15</sup> Hershko A. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1191-7.

<sup>16</sup> Varshavsky A. *Genes Cells* 1997; 2: 13-28.

<sup>17</sup> Rechsteiner M, Rogers SW. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 267-71.

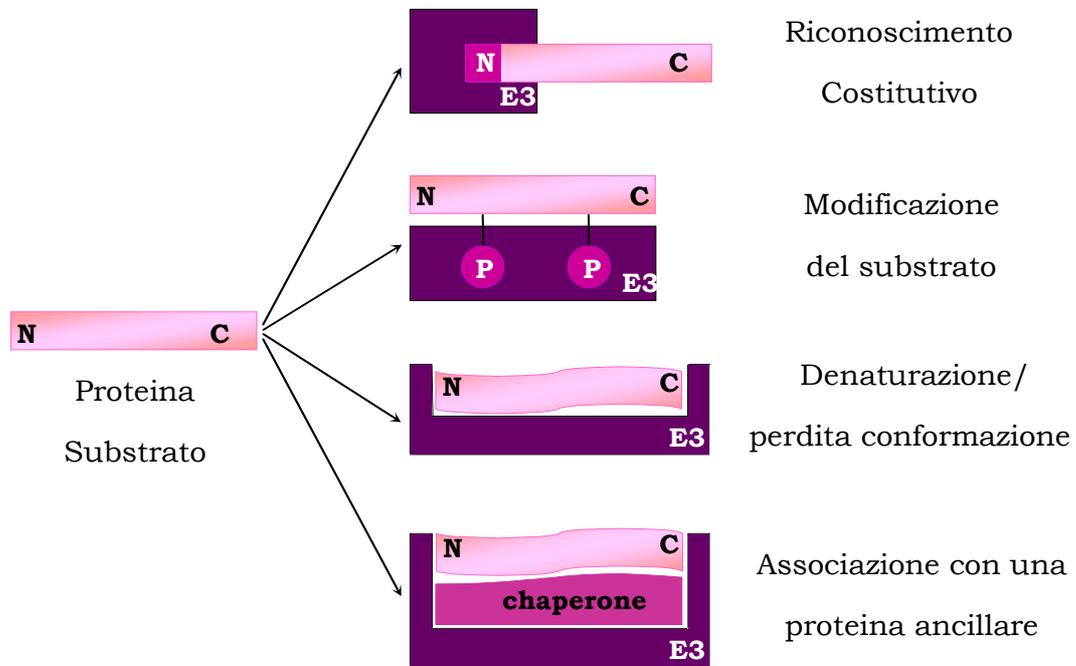
<sup>18</sup> Zhou P. *Curr Opin Chem Biol* 2005; 9: 51-5.

Particolari aminoacidi presenti all'N-terminale sono un segnale di riconoscimento universale. È stato evidenziato che proteine con N-terminali voluminosi (Phe, Leu, Tyr, Trp) o recanti cariche (Lys o Arg), sono rapidamente degradate; viceversa, proteine con N-terminali piccoli sono abbastanza stabili. Requisito essenziale per questo riconoscimento è che nelle vicinanze dell'N-terminale sia presente una Lys da cui partire per far crescere il “grappolo” di ubiquitina.

La fosforilazione di sequenze specifiche denominate PEST (sequenza a lettere di Pro-Glu-Ser-Thr) o di “destruction-box” (9 aminoacidi) rappresenta un segnale specifico che determina la marcatura della proteina fosforilata. Questo segnale è utilizzato da alcune proteine che regolano il ciclo cellulare (come le cicline), dalla p53 e da IκB, inibitore del fattore di trascrizione NFκB.

Proteine ossidate, mutate o danneggiate da stress cellulare, proteine che perdono la normale struttura terziaria o che si trovano nel compartimento cellulare sbagliato, risultano essere ottimi substrati per il processo di ubiquitinazione, anche se i segnali che in questi casi lo permettono non sono ancora ben chiari. Ciò che è certo, è che questi processi coinvolgono l'esposizione, da parte di tali proteine, di regioni idrofobiche normalmente non esposte. Un esempio riguarda le proteine sintetizzate solo parzialmente o erroneamente nel reticolo endoplasmatico. Queste sono chiamate DriPs (Detective Ribosomal Products) e sono circa il 30% delle proteine di nuova sintesi. Non presentandosi nella loro corretta conformazione nativa, vengono trasferite, mediante trasportatori specifici, dal reticolo endoplasmatico al citoplasma e degradate dal sistema ubiquitina-proteasoma <sup>5</sup>.

In alcuni casi, alle proteine non completamente conformate, si associano degli chaperones, che mediano il riconoscimento con gli enzimi ubiquitinanti (Figura 9).



**Figura 9. Segnali di degradazione riconosciuti dagli enzimi ubiquitinanti.**

## **INIBITORI DEL PROTEASOMA**

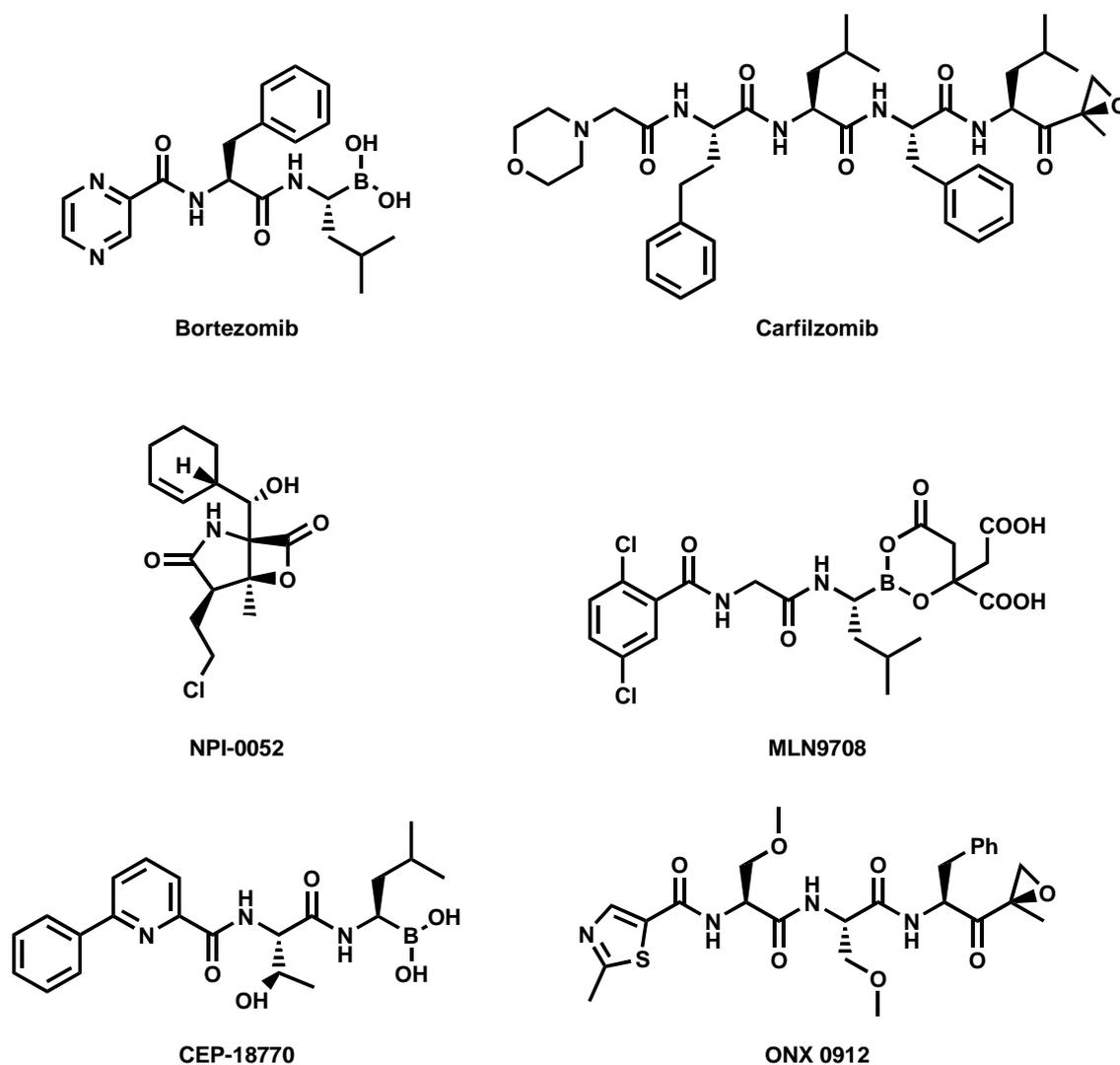
Gli inibitori sono stati e sono tuttora essenziali nello studio della via degradativa ubiquitina-proteasoma, nel definire il ruolo dell'enzima nei processi fisiologici, nonché nell'individuazione dei possibili substrati biologici. Poiché questa via è di importanza primaria nell'omeostasi cellulare, l'utilizzo di inibitori porta a variazioni notevoli delle funzioni cellulari da essa regolate. Lo studio in quest'ambito si è rivolto inizialmente a molecole naturali o sintetiche già note per la loro capacità di inibire altre proteasi.

Le principali conseguenze dovute all'azione degli inibitori del proteasoma sono ovviamente dovute alla riduzione della degradazione proteica; nell'ambiente cellulare può avvenire quindi l'accumulo di proteine ubiquitinate, destrutturate o malfunzionanti, che possono produrre condizioni tossiche per la cellula.

Iniziali studi dimostrarono che gli inibitori del proteasoma erano in grado di indurre apoptosi in linee cellulari leucemiche; successivamente si dimostrò che l'inibizione del complesso multicatalitico produceva un ampio spettro di attività anti-proliferativa e pro-apoptotica nei confronti di tumori solidi ed ematologici. Questi riscontri che profilavano un potenziale utilizzo degli inibitori del proteasoma quali agenti anti cancro, contribuì allo sviluppo di nuove molecole sempre più potenti e selettive. In alcune linee cellulari la stabilizzazione (derivante appunto da una ridotta attività proteolitica) del fattore p53 (protein tumor suppressor) può indurre apoptosi <sup>19</sup>. Tale capacità, unita alla attività antiangiogenica ed antiproliferativa, fa degli inibitori del proteasoma potenziali farmaci antitumorali (Figura 10).

---

<sup>19</sup> Scheffer M. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.



**Figura 10. Inibitori del proteasoma ad attività antineoplastica.**

Molto importante è il coinvolgimento del proteasoma nella modulazione del fattore di trascrizione NFκB che, nella forma inattiva, è legato al suo inibitore IκB. L'ubiquitinazione e la conseguente proteolisi di IκB, libera NFκB che traslocando nel nucleo promuove la trascrizione di citochine, chemochine, fattori proliferativi, antiapoptotici ed angiogenetici. Per questo è ben intuibile come gli inibitori del proteasoma, oltre alla potenziale attività antitumorale, possano essere candidati per la terapia di patologie legate all'infiammazione come infiammazioni croniche,

ischemie, artrite reumatoide, asma ed, in generale, tutte le patologie in cui il processo infiammatorio figura come componente predominante della patologia stessa (Alzheimer, morbo di Crohn, tiroiditi, ecc).

Molto importante è il ruolo che gioca il proteasoma nella modulazione della risposta immunitaria; esso è infatti responsabile della produzione di epitopi immunogenici presentabili da parte degli MHC-I. L'utilizzo di inibitori potrebbe quindi essere utile, non solo per il trattamento di infezione virali, ma anche per quello di patologie autoimmuni come la sclerosi multipla <sup>20</sup>.

Per ogni subunità catalitica  $\beta$ , l'ossidrile treoninico N-terminale rappresenta la funzione nucleofila che permette la proteolisi. Gli inibitori del proteasoma 20S possono essere composti naturali e di sintesi in cui è presente un gruppo funzionale in grado di subire un attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile della treonina catalitica. La variabilità strutturale e farmacoforica sono oggetto di grande interesse per lo sviluppo di nuovi composti.

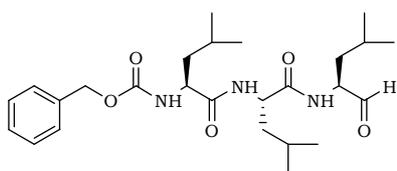
Va ricordato inoltre che l'utilizzo prolungato di inibitori del proteasoma, porta ad adattamento plastico da parte della cellula stessa; questa tende infatti a compensare il blocco della via ubiquitina-proteasoma utilizzando altre vie proteolitiche.

La ricerca è rivolta con maggior interesse allo studio di composti in grado di contrastare l'attività chimotriptica, ritenuta la più importante perché associata alla sopravvivenza delle cellule tumorali e quindi considerata il primo importante bersaglio per lo sviluppo di farmaci antineoplastici. La classificazione degli inibitori viene effettuata su basi chimiche in funzione della struttura del farmacoforo (il gruppo responsabile dell'interazione con la treonina dell'enzima) e per il loro meccanismo d'azione.

---

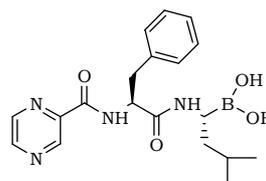
<sup>20</sup> Peter J. Elliot et al. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 637-646.

In Figura 11 e 12 sono presentate le principali classi di inibitori, distinti in covalenti e non covalenti in base al legame formato con il complesso catalitico. Questa distinzione risulta importante per un'eventuale applicazione terapeutica, in particolare per quanto concerne gli effetti collaterali associati al loro utilizzo.



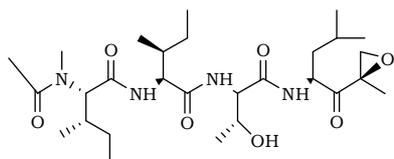
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)

**Peptidi aldeidici**



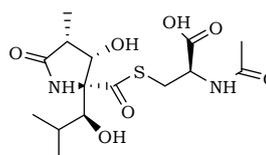
Bortezomib

**Peptidi boronici**



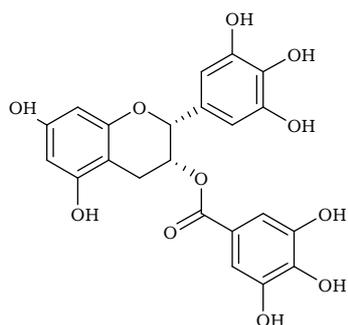
Eposomicina (Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX)

**Peptidi epossichetonici**



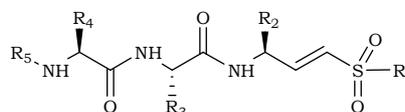
Lactacistina

**Beta-lattami e derivati**



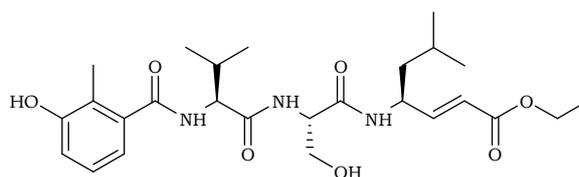
(-)-EGCG

**Polifenoli**



Struttura generale

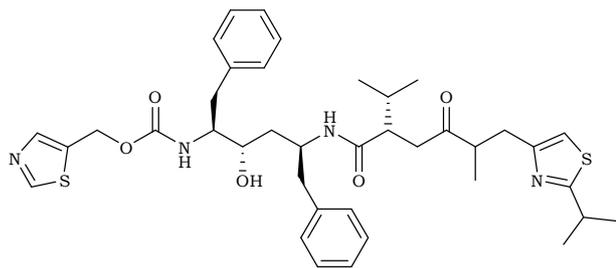
**Peptidi vinil solfonici**



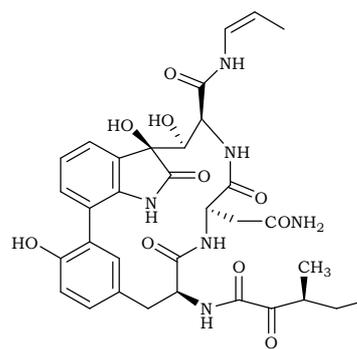
Hmb-Val-Ser-Leu-VE

**Peptidi vinil esterei**

**Figura 11. Inibitori covalenti**

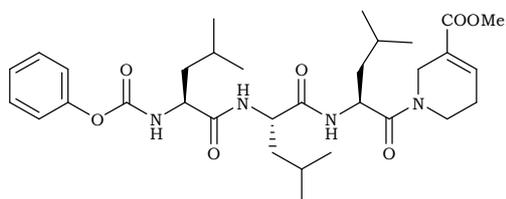


**Ritonavir**

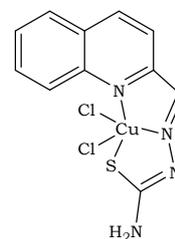


**TMC-95A**

**Peptidi ciclici**



**Pseudopeptidi arecolinici**



**Complessi organometallici**

**Figura 12. Inibitori non covalenti**

## SCOPO DELLA TESI

La via metabolica ubiquitina-proteasoma (UPS) è implicata nella degradazione della maggior parte delle proteine cellulari, svolgendo un ruolo chiave in moltissimi processi regolatori dell'organismo. L'azione catalitica del proteasoma promuove diverse vie di regolazione intracellulari. L'attività chimotriptica della subunità  $\beta 5$ , sembra essere coinvolta soprattutto nella regolazione del ciclo cellulare; quella triptica, di cui è responsabile la subunità  $\beta 2$ , sembra invece implicata maggiormente nella processazione di epitopi antigenici. Infine, per quanto riguarda l'attività post-acidica, non sono ancora ben note le vie di regolazione in cui essa è coinvolta.

Ne consegue che inibitori selettivi per la subunità  $\beta 5$  possono funzionare da agenti antitumorali, mentre inibitori  $\beta 2$ -selettivi potrebbero trovare impiego nel trattamento di patologie che interessano il sistema immunitario.

Gli inibitori del sistema ubiquitina-proteasoma si possono suddividere in composti naturali e di sintesi. Strutturalmente gli inibitori sintetici sono più omogenei e generalmente si tratta di molecole a base peptidica che presentano al C-terminale il farmacoforo responsabile del legame con le treonine catalitiche. La componente peptidica, invece, da specificità al composto attraverso interazioni secondarie con i siti presenti nell'intorno del residuo catalitico. La maggior parte dei composti disponibili, hanno attività inibitoria riferita soprattutto alla catalisi chimotriptica ma mantengono anche una residua capacità di blocco parziale delle altre due attività.

Attualmente la ricerca è essenzialmente rivolta allo sviluppo di molecole con attività selettiva nei confronti delle singole subunità del proteasoma.

Mediante tecniche di sintesi riconducibili alla chimica combinatoriale, ad esempio, sono state riportate modifiche della catena peptidica

dell'eossomicina che hanno prodotto derivati molto potenti e specifici per il sito chiotriptico; analogamente nuovi composti aldeidici sono risultati estremamente selettivi per l'attività triptica così come analoghi vinil solfonici <sup>21</sup>. Alcuni nuovi derivati epossichetonici sono risultati in grado di inibire essenzialmente l'attività post-acidica anche se non sono chiare le conseguenze fisiologiche derivanti dall'inattivazione di questo sito.

In questo ambito il nostro interesse si è rivolto allo sviluppo di nuove molecole a struttura pseudopeptidica, recanti diverse unità farmacoforiche nella posizione C-terminale. In particolare è stata sviluppata una classe di composti selettivi per la subunità triptica e attivi già a concentrazione nM, aventi una funzionalità vinil esterea in grado di accettare l'ossidrilico catalitico della subunità  $\beta 2$  subendo un'addizione di Michael (come avviene per i noti inibitori vinil solfonici) <sup>22,23,24,25,26</sup>. Questi composti hanno dimostrato di poter modulare la processazione di peptidi antigenici senza alterare i meccanismi di proliferazione cellulare. Sono inoltre risultati stabili alla proteolisi plasmatica, permeano facilmente la membrana cellulare e sono pressoché privi di tossicità. Studi cristallografici ai raggi X e di modellistica molecolare hanno evidenziato generalmente una struttura disordinata peculiare di molecole con molti gradi di libertà conformazionale.

---

<sup>21</sup> Nazif T, Bogyo M. *PNAS* 2001; 98: 2967-2972.

<sup>22</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Canella A, Gavioli R, De Risi C, Pollini GP, Tomatis R. *J Med Chem* 2004; 47: 1587-1590.

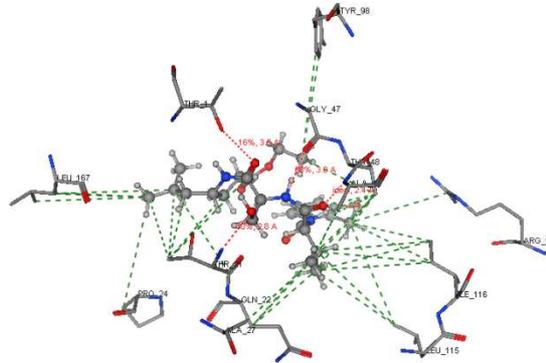
<sup>23</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Cellini S, Gavioli R, Tomatis R. *J Med Chem* 2005; 48: 5038-5042.

<sup>24</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3125-3130.

<sup>25</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 978-984.

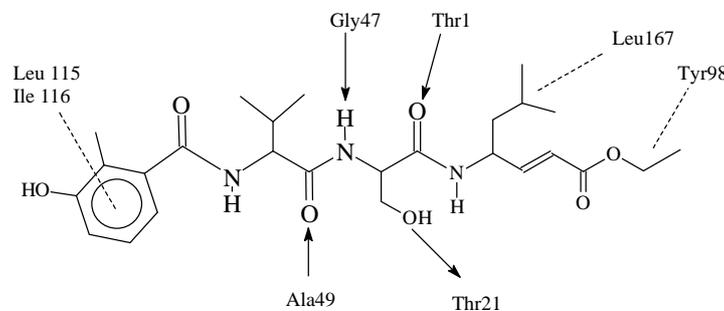
<sup>26</sup> Baldisserotto A, Marastoni M, Trapella C, Gavioli R, Ferretti V, Pretto L, Tomatis R. *Eur J Med Chem* 2007; 42: 586-592.

L'impacchettamento cristallino è simile alla struttura secondaria tipo  $\beta$ -foglietto che si ha nelle proteine (Figura 13).



**Figura 13. Schema dell'impacchettamento dell'inibitore Hmb-Val-Ser-Leu-VE.**

Lo studio delle conformazioni delle molecole in diversi stati fisici, ha mostrato differenti varietà strutturali. La conformazione assunta in soluzione, ottenuta mediante simulazione di dinamica molecolare, è stata utilizzata per studi di docking inibitore-proteasoma. Infatti, per evidenziare i legami che si instaurano tra complesso ed inibitore, sono stati svolti studi computazionali che hanno messo in evidenza come la flessibilità della molecola sia importante. E' emerso che strutture tripeptidiche recanti il farmacoforo vinil estereo, ma costituite da aminoacidi e sostituenti di varia natura, possono legare il complesso sfruttando l'affinità per residui diversi (Figura 14).



**Figura 14. Principali interazioni dell'inibitore vinil estereo Hmb-Val-Ser-Leu-VE con i residui dell'enzima.**

In base a queste evidenze sperimentali, il nostro gruppo di ricerca nel corso degli anni ha focalizzato l'attenzione sull'interazione primaria tra la treonina catalitica del proteasoma ed il farmacoforo C-terminale dell'inibitore, sviluppando una serie di unità funzionali potenzialmente in grado di funzionare da substrati più efficaci nei confronti dei siti proteolitici.

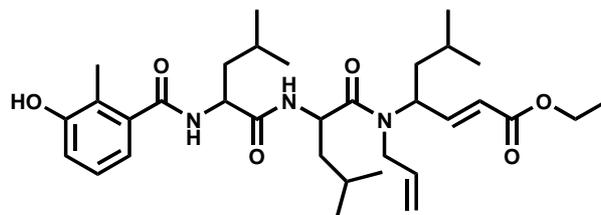
Sono stati progettati e preparati quindi nuovi composti, sempre di natura pseudopeptidica, recanti nuove unità farmacoforiche: in figura 15 sono riportate le strutture di riferimento inerenti le serie dei derivati N-allil, vinil esterei; N-acilpirrolici  $\alpha,\beta$ -insaturi; vinil chetonici; butadienil, etil esterei retroinvertiti; divinil chetonici a simmetria C2 ed isossazolin, vinil esterei.

In alcuni casi sono emersi interessanti risultati e profili biologici peculiari come nel caso degli analoghi N-acilpirrolici  $\alpha,\beta$ -insaturi, risultati selettivi e potenti per la subunità  $\beta 1$ <sup>27</sup>; in altri non si sono avuti i risultati attesi come per i composti vinil chetonici<sup>28</sup> o vinil esterei retroinvertiti, che sono risultati scarsamente attivi nei confronti delle tre attività catalitiche.

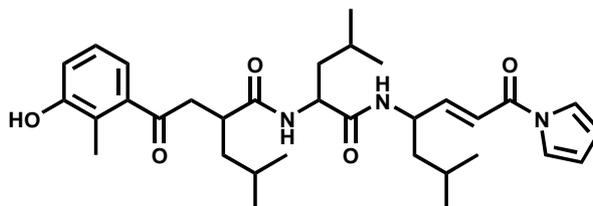
---

<sup>27</sup> Baldisserotto A, Ferretti V, Destro F, Franceschini C, Marastoni M, Gavioli R, Tomatis R. *J Med Chem.* 2010; 53 (17): 6511-5.

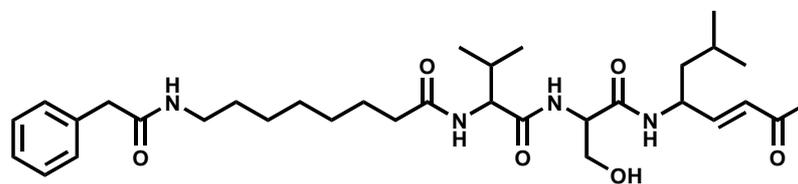
<sup>28</sup> Franceschini C, Trapella C, Sforza F, Gavioli R, Marastoni M. Work accepted by *Journal Of Enzyme Inhibitor And Medicinal Chemistry*.



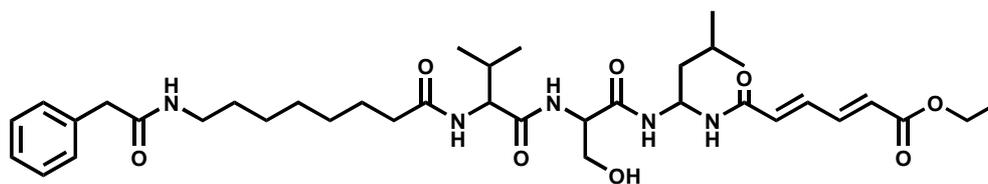
Hmb-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE



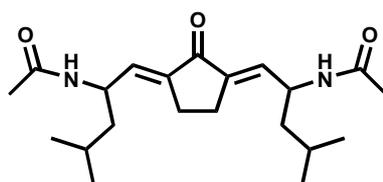
Hmb-Leu-Leu-Leu-VAP



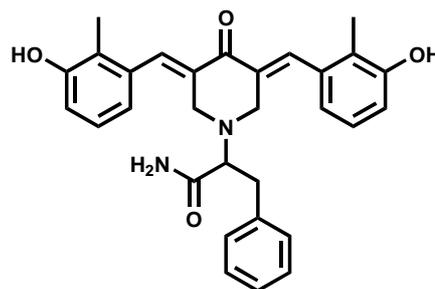
Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-VK



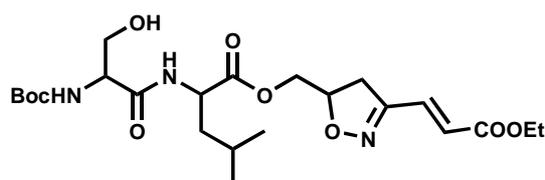
Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



Ciclopentanoni divinil chetonici



Cicloiperidoni divinil chetonici



Boc-Ser-Leu-Isox-VE

**Figura 15. Serie di inibitori a base peptidica del proteasoma realizzate durante il dottorato di ricerca.**

## **Serie N-allil, vinil esterea**

Basandoci sulle argomentazioni precedenti e da osservazioni riportate in letteratura, secondo cui alcuni inibitori pseudotripeptidici recanti la sequenza scaffold Leu-Leu-Leu hanno dimostrato buona efficacia e potenza inibitoria nei confronti del complesso enzimatico, abbiamo preparato una nuova serie di inibitori vinil esterei le cui strutture sono presentate in figura 16 e 17.

La novità sostanziale rispetto ai prototipi delle serie precedenti riguarda l'inserimento di una funzione N-allilica vicino all'unità farmacoforica C-terminale oppure in posizione N-terminale della sequenza tripeptidica. Il gruppo allilico è infatti presente in forma mascherata in molte sostanze biologicamente attive <sup>29</sup>; la stessa funzionalità vinil esterea che sostituisce l' $\alpha$ -carbossile della leucina C-terminale nei derivati precedenti presenta un'ammina allilica.

Per quanto riguarda il proteasoma, il nostro scopo è valutare se questa funzionalità può fungere da cofattore nei confronti del complesso enzimatico <sup>30</sup>.

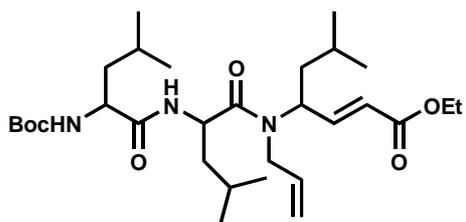
Il gruppo allilico nella nuova serie di analoghi vinil esterei è direttamente legato all' $N_{\alpha}$  della Leu-VE (composti **1-4**) oppure all'N-terminale (composti **5-9**).

In tutte le molecole la sequenza pseudotripeptidica è costituita da tre leucine, mentre all'N-terminale sono presenti i sostituenti che hanno fornito una risposta biologica interessante nelle serie precedenti.

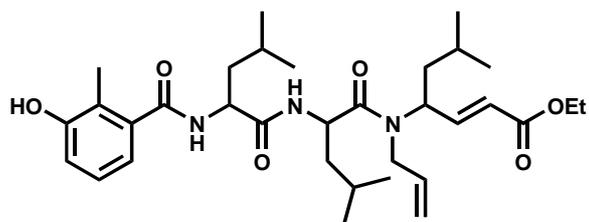
---

<sup>29</sup> Radin NS. *Drug Development Research* 2008; 69: 15-25.

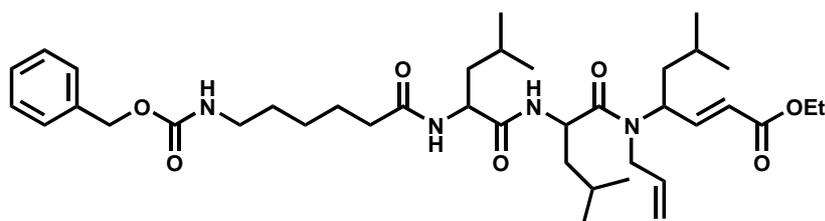
<sup>30</sup> Radin NS. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 6029-6037.



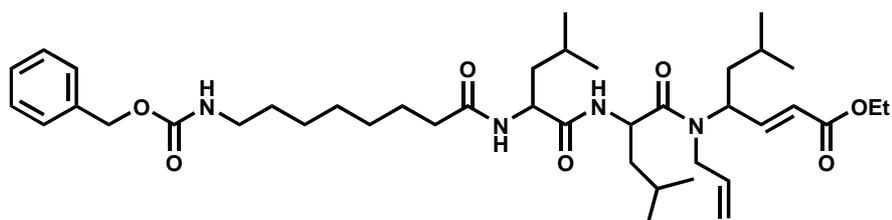
1. Boc-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE



2. Hmb-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE

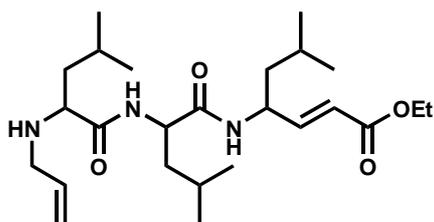


3. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Leu-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE

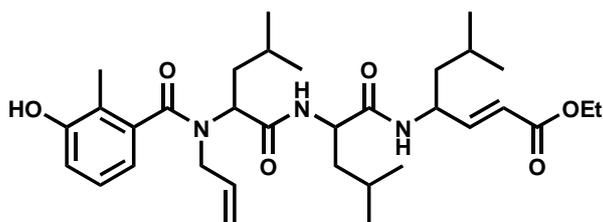


4. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE

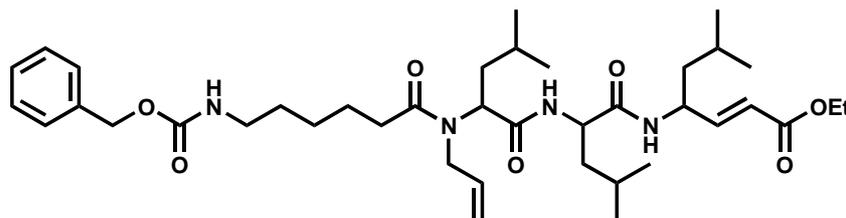
**Figura 16.** Inibitori 1-4.



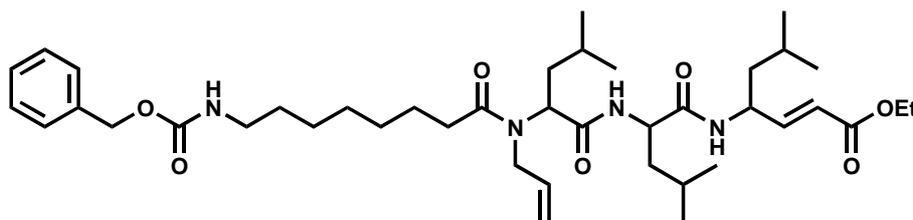
5. HN-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE



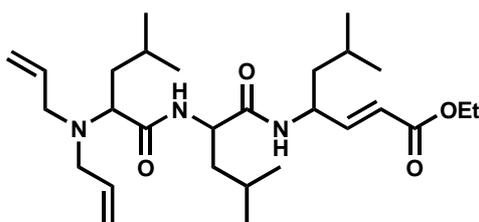
6. Hmb-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE



7. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-Leu-VE



8. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-Leu-VE



9. N-(Allil)<sub>2</sub>Leu-Leu-Leu-Leu-VE

**Figura 17.** Inibitori 5-9.

## Risultati e discussione

### Sintesi degli inibitori

La preparazione della nuova serie di derivati vinil esterei contenenti funzionalità N-alliliche è stata effettuata mediante sintesi in soluzione.

Nello schema 1 è riportata la sintesi dei derivati **1-4** che prevede inizialmente la costruzione dell'unità farmacoforica C-terminale H-Leu-VE. Questa fase sintetica iniziale ricalca passaggi già noti riportati in letteratura, ed avviene a partire dalla leucina Boc-protetta che, per reazione con N-metil,N-metossi ammina via estere attivo mediante ausilio di WSC/HOBt, porta alla corrispondente ammido. Per riduzione con  $\text{LiAlH}_4$  si ottiene l'aldeide in base alla metodica descritta da Fehrentz e Castro <sup>31</sup>.

La reazione di Wittig con [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano e la successiva rimozione del Boc mediante acido trifluoroacetico (TFA), permettono di ottenere H-Leu-VE, l'unità farmacoforica che rappresenta l'intermedio comune per tutti i derivati della nuova serie.

Per la reazione di allilazione sull'azoto sono state provate alcune metodiche con diverse condizioni sperimentali. Le rese più soddisfacenti si sono ottenute utilizzando bromuro di allile in presenza di carbonato di potassio in DMF a 60°C. In ogni caso è sempre presente in piccola percentuale il prodotto dialchilato sull'azoto. Il monoallile della leucina vinil estere è stato purificato su colonna cromatografica con una resa complessiva pari al 60%. L'acilazione della funzionalità amminica secondaria (N-allil)Leu-VE, resa problematica dall'ingombro sterico, è stata effettuata utilizzando 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio esafluorofosfato metanaminio (HATU), con rese dopo purificazione dell'intermedio pseudodipeptidico pari al 50-60%.

Altri metodi di attivazione sono risultati meno efficaci.

---

<sup>31</sup> Fehrentz JA, Castro B. *Synthesis* 1983; 8: 676-678.

Le successive condensazioni che hanno portato alle sequenze volute sono state effettuate utilizzando come agenti condensanti 1-Etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimide (WSC) ed idrossibenzotriazolo (HOBt). Dopo ogni stadio di acilazione il gruppo protettore Boc viene rimosso in ambiente acido per acido trifluoroacetico (TFA).

La preparazione dei derivati **5-9**, che presentano invece il gruppo allilico sull'azoto della leucina N-terminale, è riportata nello schema 2.

Anche in questo caso si tratta di una sintesi step by step effettuata in soluzione a partire dal farmacoforo C-terminale H-Leu-VE preparato come descritto in precedenza. Le altre due leucine che completano la sequenza pseudotripeptidica sono state condensate Boc-protette mediante WSC/HOBt e la rimozione del gruppo protettore è avvenuta mediante TFA. L'alchilazione all'N-terminale è stata effettuata sempre con bromuro di allile in presenza di  $K_2CO_3$  nelle stesse condizioni sperimentali sopra riportate ed il composto monoalchilato è stato purificato mediante colonna cromatografica utilizzando un bagno eluente DCM/MeOH 15:1. La funzionalizzazione N-terminale con acido 3-idrossi-2-metil benzoico (Hmb), acido 6-ammino-esanoico e acido 8-ammino-ottanoico entrambi *Z* protetti è stata ottenuta mediante condensazione degli acilanti in presenza di HATU con rese pari al 50-60%.

Di tutti i nuovi derivati N-allil, vinil esterei è stata valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR dopo analisi e purificazione tramite RP-HPLC preparativo.

Le caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi composti sono riportate in Tavola 1.

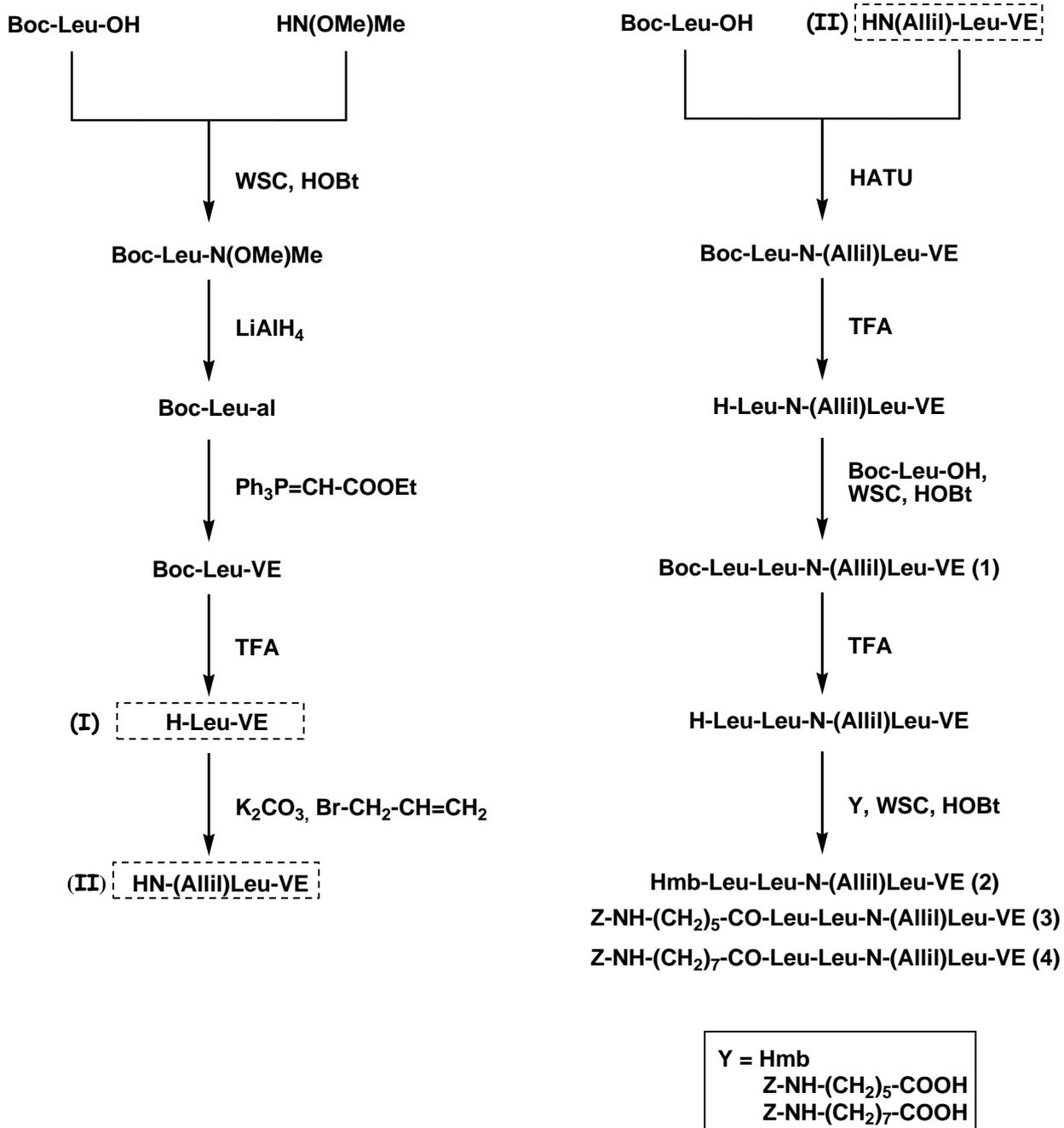


Figura 18. Schema di sintesi 1.

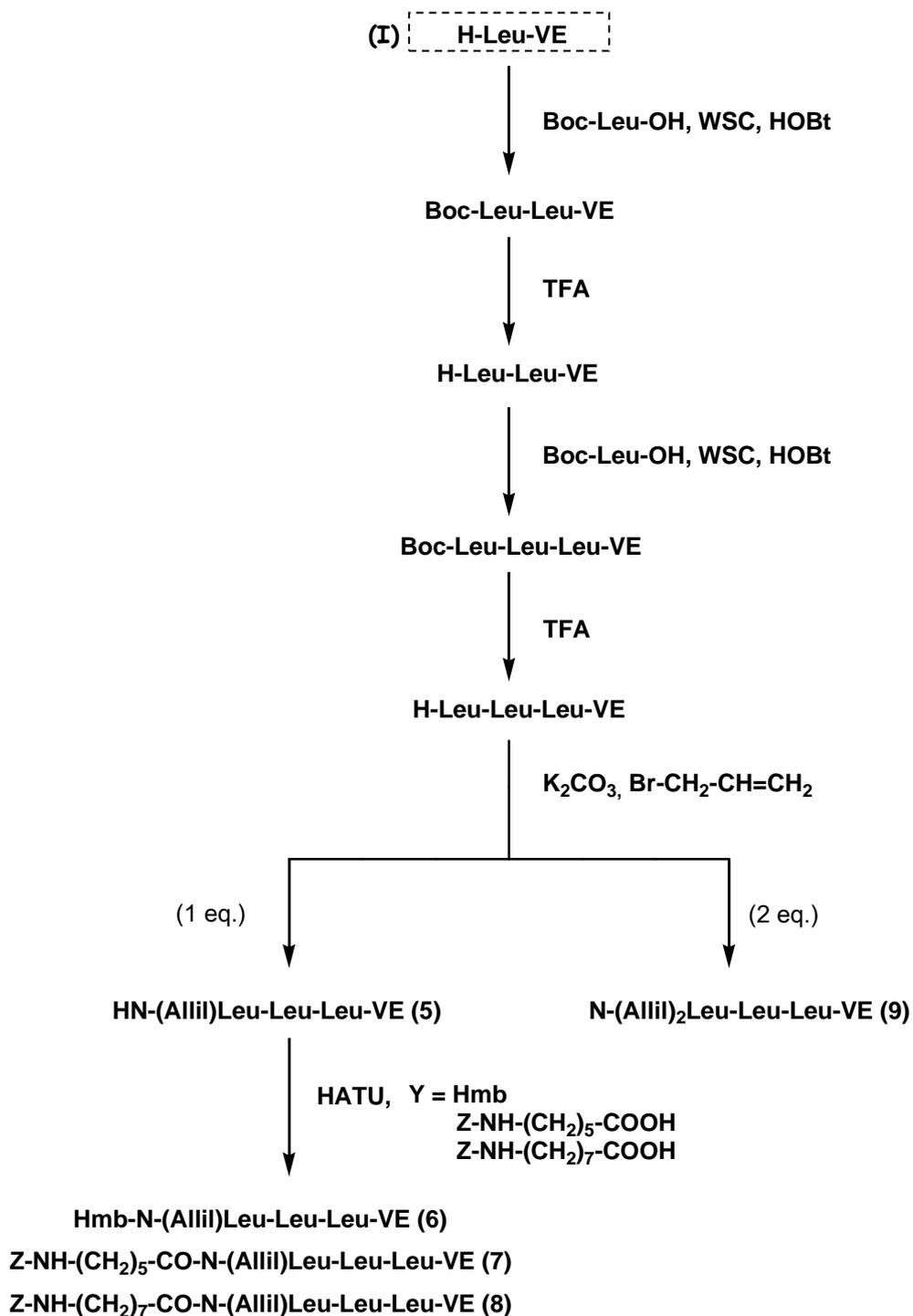


Figura 19. Schema di sintesi 2.

**Tavola 1.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori N-allil, vinil esterei **1-9**.

N° Composto	HPLC T <sub>r</sub> (min)	MP °C	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (c=1, MeOH)	MS M+H <sup>+</sup>
1. Boc-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE	22.3	Olio	-30.3	552,40
2. Hmb-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE	20.2	75-87	-25.3	586,38
3. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE	21.8	Olio	-44.9	669,47
4. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Leu-Leu-N-(Allil)Leu-VE	22.5	Olio	-52.2	727,50
5. HN-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE	15.0	70-80	-25.8	452,34
6. Hmb-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE	19.6	Olio	-41.5	586,38
7. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE	21.7	Olio	-70.4	699,47
8. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-N-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE	22.8	Olio	-89.2	727,50
9. N-(Allil) <sub>2</sub> Leu-Leu-Leu-VE	16.5	Olio	-18,9	492,38

## **Isolamento e purificazione del proteasoma**

L'enzima è stato isolato e purificato mediante lisi meccanica delle cellule per centrifugazione in presenza del tampone di lisi e di sfere di vetro. Il proteasoma così isolato è stato utilizzato per valutarne l'azione proteolitica mediante saggi di attività che prevedono l'impiego di substrati fluorogenici specifici per le tre differenti subunità catalitiche, ed anche per determinare la capacità inibitrice delle nuove molecole sintetizzate riferita all'attività di noti inibitori di riferimento.

## **Saggi di inibizione enzimatica**

Tutti i composti sono stati saggiati quali inibitori del complesso enzimatico isolato secondo le procedure discusse nel precedente paragrafo. Per determinare la capacità inibitoria degli analoghi **1-9** e degli inibitori di riferimento (MG-132, epossomicina ed AB1), 25  $\mu$ L di una soluzione del composto in esame a tre diverse concentrazioni (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) sono stati incubati con 25  $\mu$ L di enzima per 45 min a 37°C. Sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di substrato 0.1 mM specifico per le singole attività catalitiche del proteasoma e dopo 30, 60, 90 e 120 min è stata misurata mediante spettrofluorimetro la fluorescenza data dai metaboliti fluorofori generati dai substrati <sup>32</sup>. Nella figura 20 sono riportati i grafici relativi all'inibizione dell'attività chimotriptica ( $\beta$ 5), triptica ( $\beta$ 2) e post-acidica ( $\beta$ 1) del complesso multicatalitico prodotta dai nuovi composti, dai noti inibitori di riferimento MG132, epossomicina e da Hmb-Leu-Leu-Leu-VE (AB1) a 30 min.

Per quanto concerne l'analisi dei dati inerenti all'inibizione dell'attività chimotriptica si può affermare che generalmente i nuovi derivati danno un'inibizione scarsamente significativa, specie se paragonata ad MG132

---

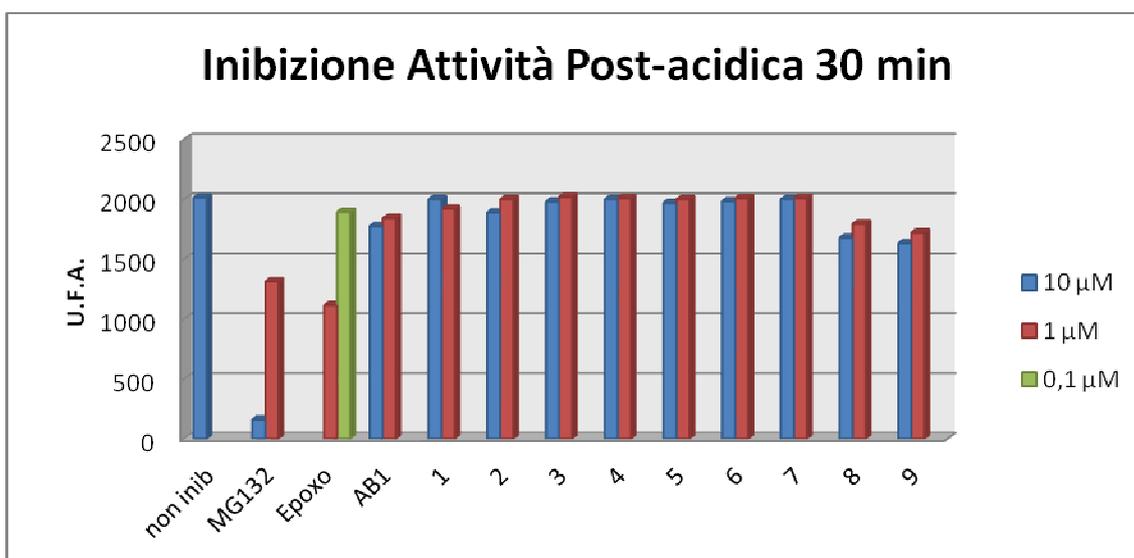
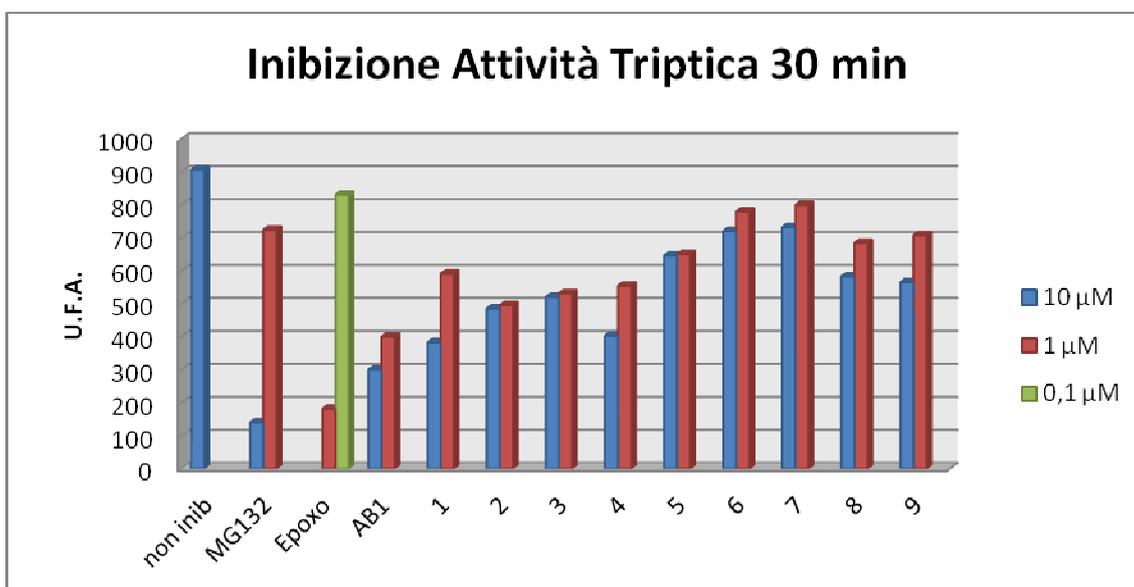
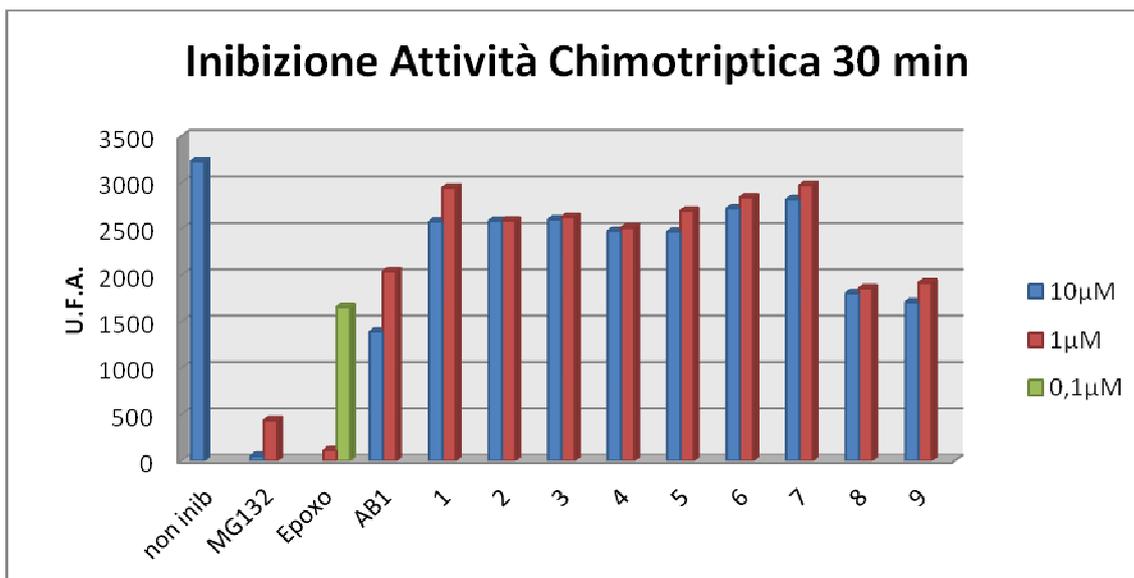
<sup>32</sup> Gavioli R, Vertuani S, Masucci MG. *Int J Cancer* 2002; 101: 532-38.

ed epossomicina. Rispetto allo pseudotripeptide prototipo non allilato (AB1) tutti i nuovi analoghi presentano mediamente un'attività inferiore, dimostrando che la modifica strutturale inserita nella molecola base risulta deleteria per la risposta biologica. Dai dati ottenuti per i derivati **8-9** si può inoltre affermare che l'allilazione a livello N-terminale della sequenza pseudotripeptidica è più tollerata, con una percentuale di inibizione che si avvicina al 50% a concentrazione 1  $\mu\text{M}$ .

Per quanto riguarda l'attività triptica, l'inibizione degli pseudotripeptidi N-allilici risulta leggermente superiore a quella della subunità  $\beta 5$  del proteasoma. In questo caso la modifica molecolare è più favorevole quando l'allilazione viene effettuata a livello C-terminale in vicinanza del farmacoforo primario vinil estereo. I composti **1-4** presentano generalmente un'inibizione del 50% a concentrazione 10  $\mu\text{M}$ . Dato confermato anche alla concentrazione 1  $\mu\text{M}$  per i composti **2** e **3**. Anche in questo caso il prototipo non modificato di riferimento risulta comunque più attivo.

L'inibizione della subunità  $\beta 1$  (PGPH) risulta praticamente non evidenziabile per tutti i nuovi analoghi e viene ancora una volta confermato il dato relativo al derivato (AB1).

Per quanto riguarda il sostituito N-terminale, le sue caratteristiche chimico-fisiche non sembrano influenzare in modo significativo l'attività; solamente il raggruppamento più ingombrante Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-COOH determina un'inibizione nei confronti dei subsiti catalitici  $\beta 2$  e  $\beta 5$  leggermente superiore per i composti **4** ed **8** rispetto agli altri derivati che portano sostituenti diversi.



**Figura 20.** Dati di inibizione dei derivati 1-9. (AB1=Boc-Leu-Leu-Leu-VE)

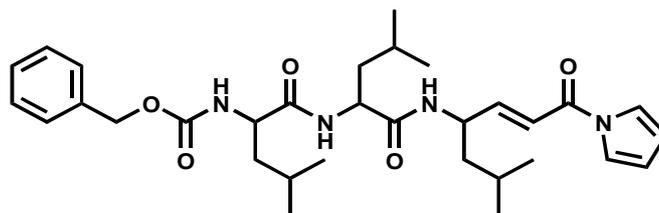
## **Conclusioni**

Dall'analisi dei risultati ottenuti inerenti all'inibizione dell'enzima isolato da parte della nuova serie di analoghi pseudotripeptidici risulta evidente che la modifica strutturale apportata rispetto alla molecola base comporta una generale diminuzione dell'attività. Si può quindi affermare che l'inserimento di una funzione N-allilica in posizione C- o N-terminale delle molecole non ha permesso una significativa risposta biologica, confermando che tale funzionalità non agisce da ulteriore substrato per l'attacco nucleofilo da parte della treonina catalitica, ma perturba l'interazione con le cavità del complesso enzimatico.

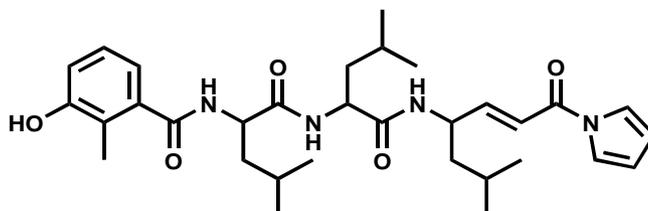
### **Serie N-acilpirrolica $\alpha,\beta$ -insatura**

La nuova serie di derivati N-acilpirrolici  $\alpha,\beta$ -insaturi è costituita da catene pseudotripeptidiche costruite in base ai risultati ottenuti in precedenza dal nostro gruppo di ricerca su serie diverse di analoghi a base peptidica. La sequenza idrofobica caratterizzata da tre leucine (composti **10-12**) e quella più idrofilica Val-Ser-Leu (analoghi **13-15**) presentano una nuova unità farmacoforica rappresentata da un gruppo N-acilpirrolico  $\alpha,\beta$ -insaturo che sostituisce la funzione carbossilica della leucina C-terminale. L'estesa coniugazione fornita dall'eterociclo pirrolico quale prolungamento della classica funzionalità vinil esterea, ha lo scopo di rendere, teoricamente, la nuova unità farmacoforica più facilmente suscettibile all'attacco nucleofilo da parte della treonina catalitica del complesso enzimatico tramite addizione di Micheal.

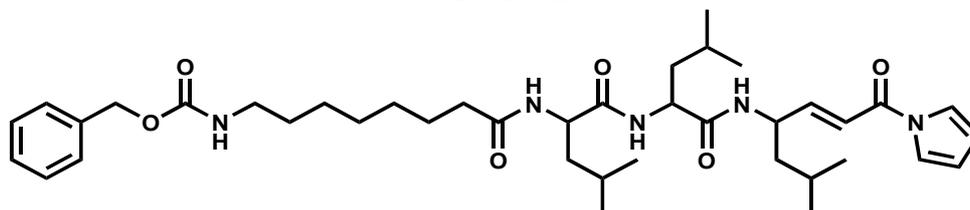
In posizione N-terminale sono stati invece utilizzati come acilanti i gruppi benzilossi carbonilico Z (**10,13**), l'acido 3-idrossi-2-metil benzoico Hmb (**11,14**) e l'acido 8-ammino ottanoico N-protetto con Z (**12,15**); sostituenti che hanno fornito i risultati più soddisfacenti nelle serie sintetizzate in precedenza.



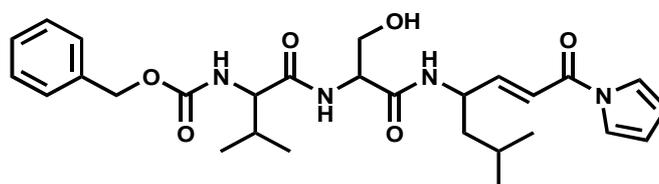
10. Z-Leu-Leu-Leu-VAP



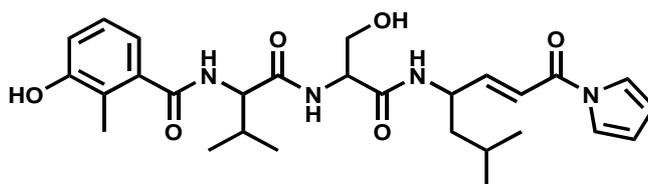
11. Hmb-Leu-Leu-Leu-VAP



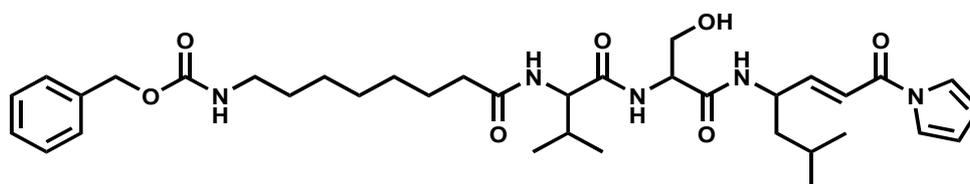
12. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-Leu-VAP



13. Z-Val-Ser-Leu-VAP



14. Hmb-Val-Ser-Leu-VAP



15. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-VAP

**Figura 21.** Inibitori 10-15.

## Risultati e discussione

### Sintesi degli inibitori

La preparazione dei derivati pseudotripeptidici N-acilpirrolici  $\alpha,\beta$ -insaturi **10-15** è stata effettuata impiegando la strategia sintetica, presentata negli schemi 3 e 4, che ha permesso di ottenere i migliori risultati con il minor numero di step sintetici.

Si tratta di un approccio misto nel quale la preparazione dell'unità farmacoforica C-terminale H-Leu-VAP (comune per tutti i composti) è stata effettuata in soluzione; le porzioni dipeptidiche variabili sostituite all'N-terminale, sono state invece assemblate in fase solida.

Lo schema 3 riassume la sintesi di H-Leu-VAP in cui lo start di partenza rappresentato da leucina protetta come tert-butossicarbonil uretano all'N-terminale viene trasformata nella corrispondente N-metil,N-metossi ammide e quindi ridotta ad aldeide con  $\text{LiAlH}_4$ <sup>33</sup> con buone rese.

La reazione di Wittig con l'opportuna ilide (la cui preparazione è descritta in seguito) consente di ottenere, dopo rimozione del Boc, il farmacoforo voluto in cui il carbossile della leucina è sostituito dal gruppo vinil acilpirrolico.

L'ilide utilizzata nella Wittig viene preparata a parte per reazione di 1,1'-carbonildipirrolo (a sua volta ottenuto per trasferimento del carbonile tra N,N'-carbonildiimidazolo e pirrolo) con metilentrifenilfosforano, che è stato preparato per reazione tra metiltrifenilfosfonio bromuro e fenil litio<sup>34, 35</sup>.

---

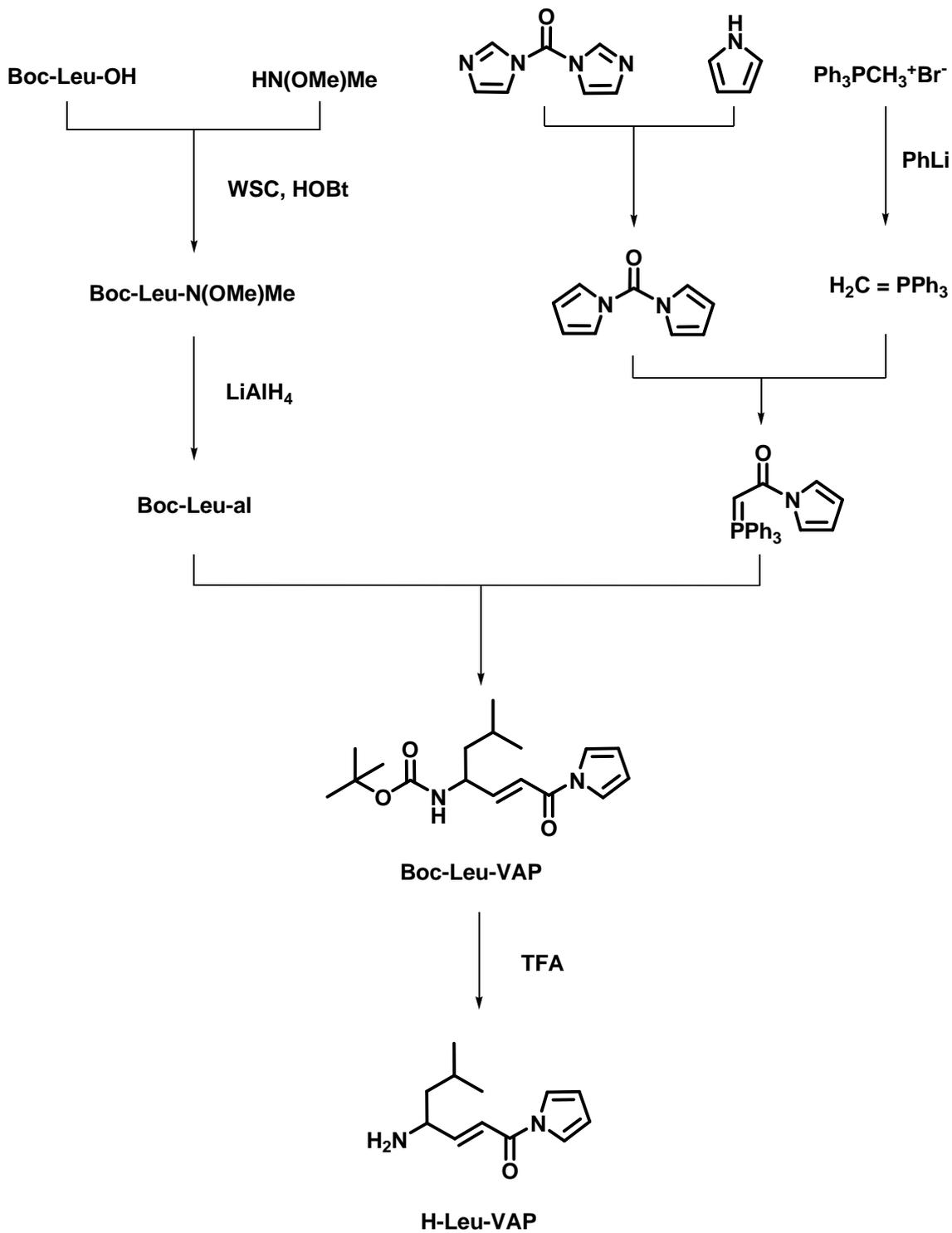
<sup>33</sup> Feherentz J.A. et al. Tetrahedron Lett. 1994, 35, 9031-9034

<sup>34</sup> D.A.Evans, G. Borg, K. A. Scheidt, Angew. Chem. 2002

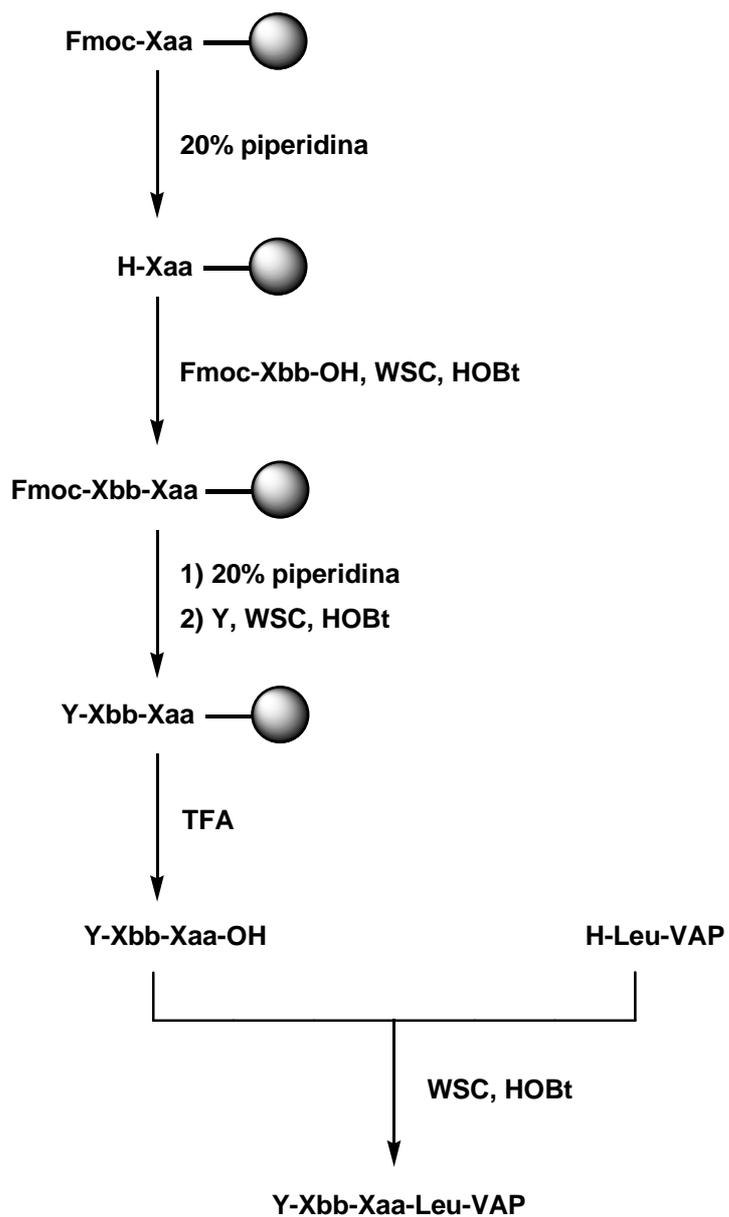
<sup>35</sup> S. Matsunaga et al. / Tetrahedron 62 (2006) 6630-6639

Nello schema 4 è riportata la sintesi di tutti i derivati ottenuti mediante condensazione finale via WSC/HOBt tra le sequenze dipeptidiche funzionalizzate all'N-terminale e l'unità farmacoforica preparata come descritto. Le catene dipeptidiche sono state assemblate in fase solida a partire da resina di Wang recante il residuo voluto già agganciato, e protetto alla funzionalità amminica come Fmoc (9-fluorenilmetossicarbonil). Dopo rimozione con piperidina del gruppo protettore, viene condensato il secondo aminoacido, sempre protetto come Fmoc, via estere attivo. Dopo ripristino del gruppo amminico, lo stesso viene acilato con la funzione desiderata sempre utilizzando WSC/HOBt. Le sequenze C-terminali vengono ottenute con il gruppo carbossilico libero in seguito a rimozione dalla resina per trattamento acido mediante TFA.

Dopo la condensazione finale via estere attivo con H-Leu-VAP, tutti i nuovi composti sono stati valutati mediante analisi RP-HPLC e spettrometria di massa e purificati tramite cromatografia liquida preparativa.



**Figura 22.** Schema di sintesi 3.



Xaa = Leu, Ser; Xbb = Leu, Val; Y = Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-COOH, Hmb, Z

**Figura 23.** Schema di sintesi 4.

**Tavola 2.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori N-acilpirrolici  $\alpha,\beta$ -insaturi **10-15**.

N° Composto	HPLC $T_r$ (min)	MP °C	$[\alpha]_D^{20}$ ( $c=1$ , MeOH)	MS $M+H^+$
10. Z-Leu-Leu-Leu-VAP	14.1	130-133	-10,9	567,35
11. Hmb-Leu-Leu-Leu-VAP	12.8	138-140	-14,9	567,35
12. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Leu-Leu-Leu-VAP	15.3	118-121	-8,5	708,46
13. Z-Val-Ser-Leu-VAP	12.5	140-142	-18,7	527,28
14. Hmb-Val-Ser-Leu-VAP	11.9	145-148	-22,3	527,28
15. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Val-Ser-Leu-VAP	13.4	135-137	-12,9	668,39

## Saggi di inibizione enzimatica

Tutti i composti sono stati saggiati quali inibitori del complesso enzimatico isolato secondo le procedure riportate in precedenza.

In base ai risultati ottenuti in presenza dell'enzima isolato e dei substrati specifici per le tre attività, dopo un tempo di incubazione di 30 minuti, si sono calcolati i valori di  $IC_{50}$  riportati in Tabella 1, comparati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali utilizzando i noti inibitori del proteasoma MG132 ed epossomicina.

I dati di attività nei confronti delle tre subunità del complesso proteasico indicano un'originale profilo biologico.

L'inibizione della subunità  $\beta 2$  (T-L) è praticamente irrilevante con valori di  $IC_{50}$  superiori alla concentrazione 10  $\mu M$ ; l'azione nei confronti dell'attività tripsino-simile risulta decisamente inferiore anche ai dati forniti da potenti inibitori specifici per la cavità chimotriptica del proteasoma quali epossomicina ed MG132. Mediamente superiore è risultata l'inibizione della subunità  $\beta 5$  (ChT-L), anche se in termini assoluti non paragonabile ai composti di riferimento che presentano valori di  $IC_{50}$  dell'ordine nM. In particolare i derivati **10**, **11** e **15** hanno mostrato una debole inibizione dell'attività chimotriptica. La diversa risposta biologica dei nuovi composti sembra essere indipendente dal sostituente N-terminale mentre risultano leggermente favorite le strutture più idrofobiche. Per  $\beta 2$  e  $\beta 5$ , l'introduzione della nuova unità farmacoforica al C-terminale determina un sensibile decremento di attività in sequenze aminoacidiche che si erano rivelate favorevoli, per le stesse tasche catalitiche, in serie precedenti.

Molto interessanti sono invece i dati forniti dalle nuove molecole riguardanti l'inibizione dell'attività post-acidica (PGHP) del complesso multicatalitico che generalmente risulta superiore agli inibitori di riferimento. Nel dettaglio, i termini della serie che sono in grado di interagire in modo più efficace con la cavità  $\beta 1$  sono i derivati **11**, **12** e

**15** con valori di  $IC_{50}$  dell'ordine nM. In particolare l'analogo **11** in valore assoluto, rappresenta uno dei più potenti inibitori della subunità  $\beta 1$  finora conosciuti. Un'analisi del rapporto struttura-attività ci permette di affermare che il gruppo N-acilpirrolico  $\alpha,\beta$ -insaturo rappresenta un ottimo substrato, favorevole per l'interazione con la treonina catalitica N-terminale della cavità  $\beta 1$  del proteasoma. Il sostituente benzilossi carbonilico (Z) presente negli analoghi **10** e **13** è quello che a fornito la risposta biologica meno potente. Sembra che un buon bilanciamento delle caratteristiche idrofiliche/lipofile della catena aminoacidica e del sostituente N-terminale sia una condizione ottimale per l'interazione con la tasca enzimatica. Si conferma, che sostituenti ingombranti all'N-terminale favoriscono un'inibizione specifica di  $\beta 1$ .

Ricordiamo infine, che l'attività dei nuovi composti viene mantenuta con decremento progressivo dei valori di  $IC_{50}$  dopo 1 e 2 ore di incubazione, facendo supporre un'inibizione di tipo reversibile.

Complessivamente i dati biologici ci consentono di affermare che l'introduzione della nuova unità farmacoforica in questa serie di pseudotripeptidi ha permesso di ottenere inibitori potenti e selettivi nei confronti dell'attività post-acidica del proteasoma.

**Tabella 1.** Valori di IC<sub>50</sub> degli inibitori di riferimento e della serie **10-15**.

N° Composto	Enzima Isolato IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
	T-L	ChT-L	PGPH
<b>Epossomicina</b>	0.284	0.005	4.560
<b>MG132</b>	1.077	0.002	> 10
<b>10. Z-Leu-Leu-Leu-VAP</b>	> 10	7.890	2.450
<b>11. Hmb-Leu-Leu-Leu-VAP</b>	> 10	3.630	0.034
<b>12. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-Leu-VAP</b>	> 10	> 10	0.067
<b>13. Z-Val-Ser-Leu-VAP</b>	> 10	> 10	0.124
<b>14. Hmb-Val-Ser-Leu-VAP</b>	> 10	> 10	0.143
<b>15. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-VAP</b>	> 10	5.080	0.055

## Conclusioni

Il proteasoma costituisce il complesso enzimatico di degradazione della via proteolitica ubiquitina/ATP-dipendente coinvolto nella risposta immunitaria, nell'apoptosi, nella maturazione ed infezione virale e cancro. L'espressione aberrante del segnale molecolare di traduzione mediante la via che controlla la sopravvivenza cellulare, proliferazione, morte o differenziazione, è una caratteristica comune in tutte le forme tumorali. Il ruolo centrale del proteasoma nel regolare tali processi fisiologici ha portato ad uno stimolante sviluppo di inibitori del complesso enzimatico quali nuovi agenti terapeutici.

Sono state progettate varie classi di inibitori peptidici e non; a causa della loro mancanza di specificità o della loro bassa permeabilità cellulare, molte di queste molecole non sono utili in vivo ma risultano comunque interessanti per gli studi in vitro. Indagini più approfondite hanno mostrato che l'inibizione del proteasoma è un possibile approccio nella terapia di gravi patologie; queste molecole sembrano infatti possedere un elevato potenziale terapeutico per il trattamento di neoplasie, disturbi infiammatori e patologie legate alla risposta immunitaria.

Le strutture tripeptidiche N-acilpirroliche  $\alpha,\beta$ -insature funzionalizzate in posizione N-terminale hanno mostrato un interessante profilo biologico ed un elevato grado di specificità per la cavità post-acidica (PGHP) del complesso enzimatico. In alcuni casi l'inibizione è risultata potente, in particolare il derivato **11** con la sequenza costituita da tre leucine e recante un sostituente 3-idrossi-2-metilbenzoilico all'N-terminale ha fornito un  $IC_{50} = 34$  nM.

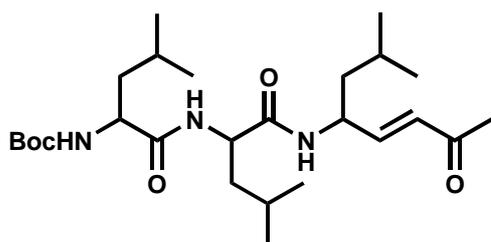
Inibitori selettivi per la cavità  $\beta_1$  del proteasoma potrebbero risultare interessanti agenti terapeutici, in base al profilo biologico associato al derivato boronico Bortezomib, già in terapia come antitumorale per il trattamento del mieloma multiplo.

## **Serie vinil chetonica**

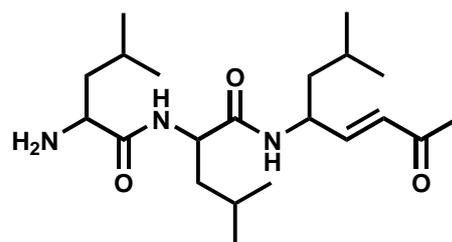
Analizzando i dati ottenuti nei precedenti saggi di inibizione condotti sulla serie vinil esterea nonché sugli analoghi N-allilati, abbiamo pensato di apportare la variazione strutturale direttamente sull'unità farmacoforica C-terminale legata alla sequenza aminoacidica.

In particolare, il legame estereo è stato sostituito con una funzionalità chetonica che mantiene inalterata la coniugazione con il raggruppamento vinilico ma apporta un minore ingombro sterico in quanto si ha la perdita di un atomo di carbonio. Tale modifica dovrebbe inoltre rendere meno suscettibile all'idrolisi enzimatica l'unità farmacoforica e le sequenze aminoacidiche ad essa legate.

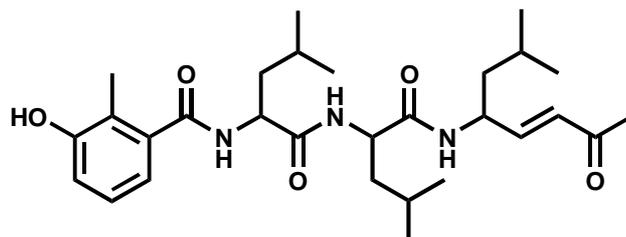
Di seguito viene descritta la sintesi e l'attività biologica della nuova classe di inibitori vinil chetonici a base peptidica (Figura 24). L'intento è quello di valutare la capacità dei nuovi analoghi di interagire con la treonina catalitica enzimatica e l'influenza esercitata dai sostituenti N-terminali in termini di potenza e specificità per l'inibizione delle diverse attività proteolitiche. Abbiamo quindi sintetizzato e testato molecole contenenti una sequenza centrale tripeptidica composta da Leu-Leu-Leu (composti **16-20**) o Val-Ser-Leu (composti **21-25**) recanti in posizione N-terminale un gruppo 3-idrossi-2-metil benzilico (Hmb), acido 6-ammino esanoico Z-protetto ed acido 8-ammino ottanoico Z-protetto in accordo con i risultati ottenuti nelle serie precedenti.



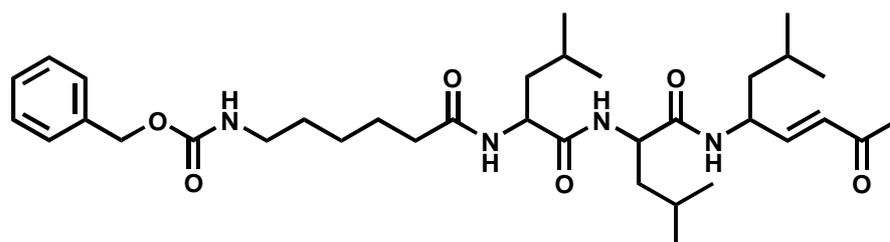
16. Boc-Leu-Leu-Leu-VK



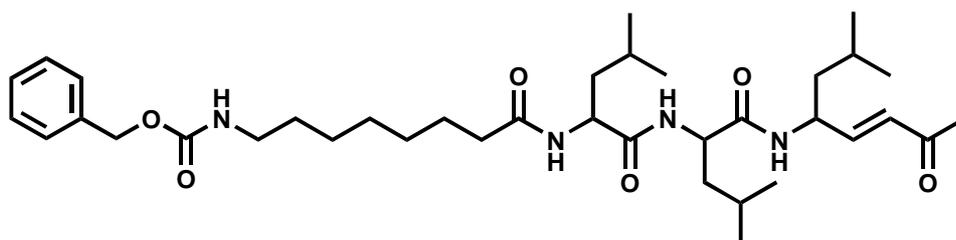
17. H-Leu-Leu-Leu-VK



18. Hmb-Leu-Leu-Leu-VK

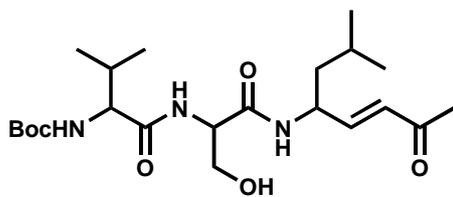


19. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Leu-Leu-Leu-VK

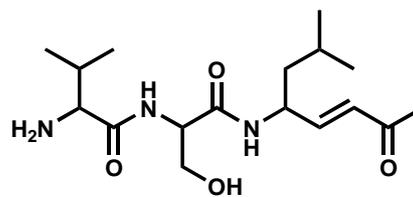


20. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-Leu-VK

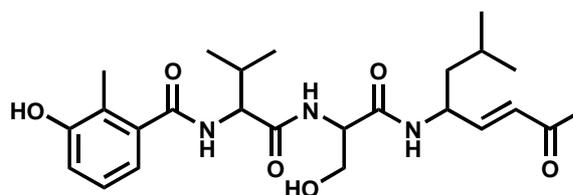
**Figura 24.** Inibitori 16-20.



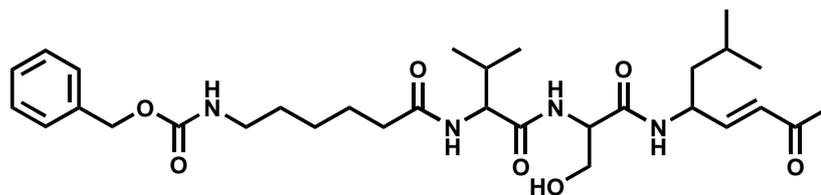
21. Boc-Val-Ser-Leu-VK



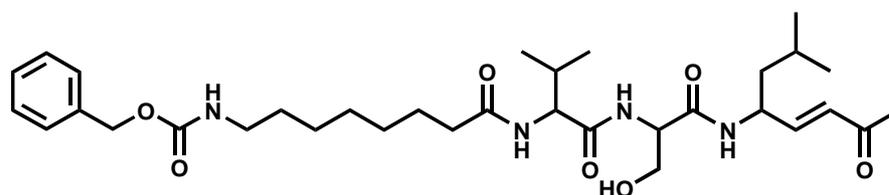
22. H-Val-Ser-Leu-VK



23. Hmb-Val-Ser-Leu-VK



24. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Val-Ser-Leu-VK



25. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-VK

**Figura 25.** Inibitori 21-25.

## Risultati e discussione

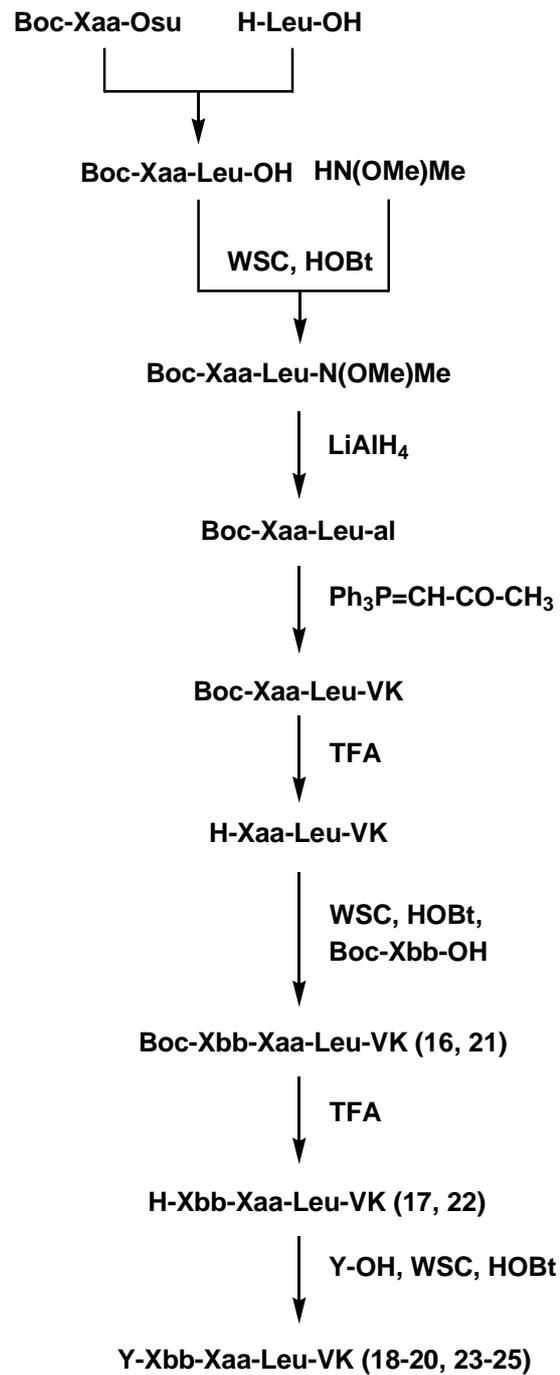
### Sintesi degli inibitori

Nello schema 5 è riportata la sintesi dei derivati pseudotripeptidici vinil chetonici **16-25**. Lo step iniziale prevede la condensazione di aminoacidi Boc protetti all'N-terminale ed attivati al C-terminale come OSu, con Boc-Leu-OH, ad ottenere i corrispondenti dipeptidi carbossile libero.

Per reazione con N-metil,N-metossi ammina via estere attivo con ausilio di WSC/HOBt, si ottiene la corrispondente amide che viene poi ridotta ad aldeide nello step successivo utilizzando LiAlH<sub>4</sub> come riportato dalla metodica descritta da Fehrentz e Castro <sup>31</sup> già citata in precedenza.

La reazione di Wittig con [(acetil)metiliden]trifenilfosforano genera il corrispondente dipeptide Boc protetto alla funzionalità N<sub>α</sub>-amminica e recante l'unità farmacoforica vinil chetonica desiderata in posizione C-terminale. Il successivo sblocco del gruppo uretanico in ambiente acido per TFA e la condensazione via WSC/HOBt con opportuni aminoacidi Boc-protetti, permette di ottenere i primi derivati della serie **16** e **21**. La rimozione del gruppo protettore in seguito a trattamento con acido trifluoroacetico origina gli analoghi **17** e **22** con funzionalità N<sub>α</sub>-amminica libera. L'ultimo step sintetico, che permette di ottenere i composti che completano la serie (**18-20** e **23-25**), consiste in un'acilazione della componente amminica con acido 3-idrossi-2-metil benzoico (Hmb), con acido 8-ammino ottanoico ed 6-ammino esanoico N-protetti con Z, sempre utilizzando come agenti condensanti 1-Etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimide (WSC) ed idrossibenzotriazolo (HOBt).

Dopo purificazione tramite RP-HPLC preparativo, si è valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR. Le caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi composti sono riportate in Tavola 3.



Xaa = Leu, Ser; Xbb = Leu, Val; Y = Hmb, Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-, ZNH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-

**Figura 26.** Schema di sintesi 5.

**Tavola 3.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori vinil chetonici **16-25**.

N° Composto	HPLC T <sub>r</sub> (min)	MP °C	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (c=1, MeOH)	MS M+H <sup>+</sup>
16. Boc-Leu-Leu-Leu-VK	17.01	130-133	-10.9	482.35
17. H-Leu-Leu-Leu-VK	15.02	138-140	-14.9	382.55
18. Hmb-Leu-Leu-Leu-VK	14.80	128-130	-9.2	516.34
19. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Leu-Leu-Leu-VK	16.59	118-121	-8.5	629.42
20. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Leu-Leu-Leu-VK	17.89	140-142	-8.7	657.45
21. Boc-Val-Ser-Leu-VK	13.30	145-148	-22.3	442.29
22. H-Val-Ser-Leu-VK	9.20	141-143	-11.4	342.23
23. Hmb-Val-Ser-Leu-VK	8.47	135-137	-12.9	476.27
24. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Val-Ser-Leu-VK	14.07	123-125	-10.6	589.36
25. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Val-Ser-Leu-VK	15.22	119-124	-9.9	617.39

## Saggi di inibizione enzimatica

Tutti i composti sono stati saggiati quali inibitori delle 3 principali attività del complesso enzimatico isolato secondo le procedure già descritte per le serie sintetizzate in precedenza.

Di tutti si è valutata l'inibizione dell'attività chimotriptica, triptica e post-acidica. Nella figura 27 sono riportati i grafici a 30 min relativi alla inibizione delle subunità  $\beta_5$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_1$  del complesso multicatalitico prodotta dai nuovi composti e dai noti riferimenti MG132 ed epossomicina.

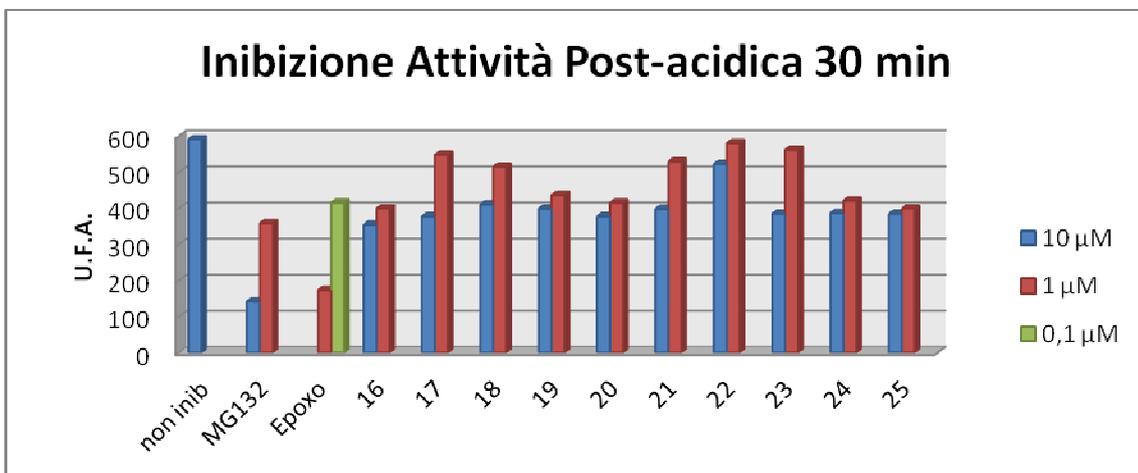
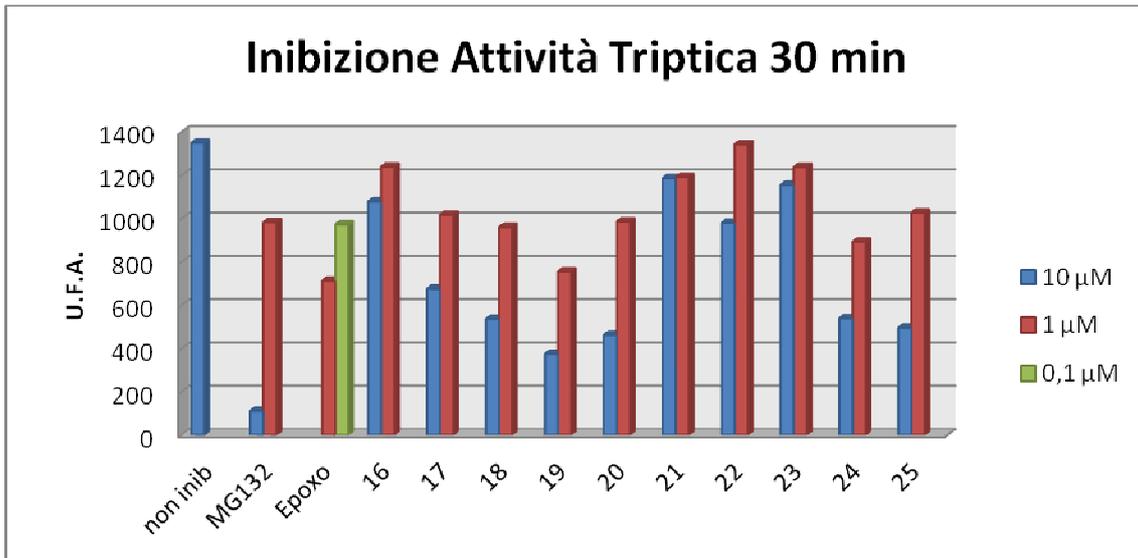
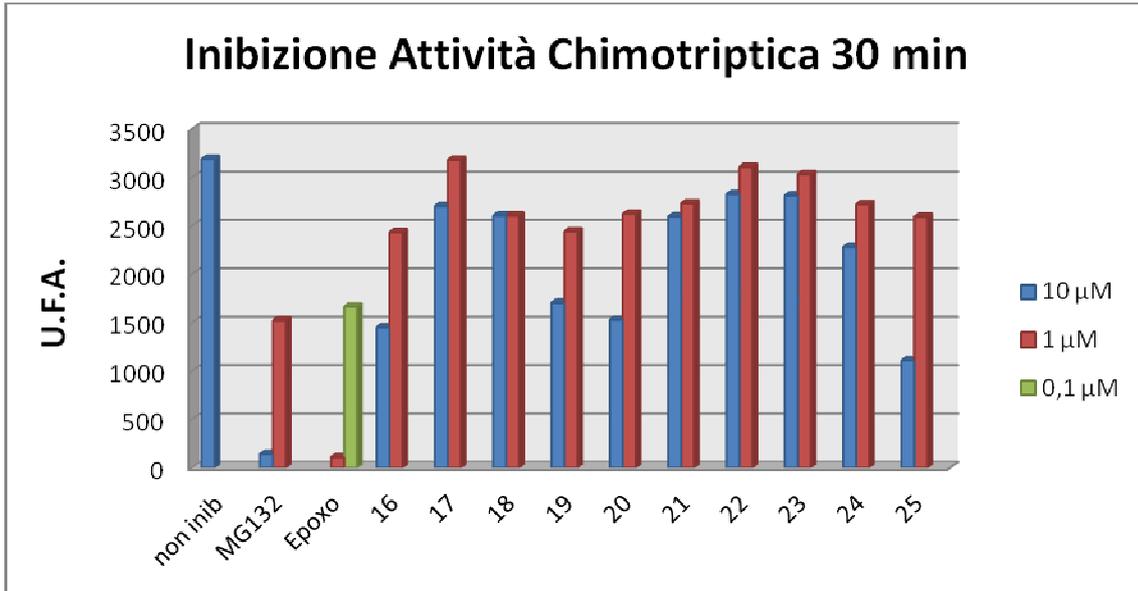
L'analisi generale del profilo biologico della nuova classe di inibitori sintetizzati suggerisce che la nuova unità farmacoforica introdotta non è un buon substrato nei confronti della treonina catalitica. Tutti gli analoghi mostrano una perdita di attività se comparati agli inibitori descritti in precedenza recanti differenti unità farmacoforiche in posizione C-terminale.

L'attività chimotriptica viene inibita in un range  $\mu\text{M}$  dagli analoghi che presentano residui a lunga catena Z-protetti in posizione N-terminale della sequenza lineare aminoacidica. L'inibizione dell'attività triptica (Tabella 2) è relativamente più marcata, con un  $\text{IC}_{50}$  dell'ordine di 3-10  $\mu\text{M}$  per i composti **19**, **20**, **24** e **25**. In linea generale la risposta biologica è indipendente dalla sequenza centrale tripeptidica, ma sembra invece essere correlata ai sostituenti N-terminali; in particolare i composti **20** e **25** che recano gruppi stericamente più ingombranti risultano essere i migliori derivati della serie.

Inoltre, tutti i nuovi composti non possiedono nessuna capacità inibitoria nei confronti dell'attività post-acidica (PGPH).

**Tabella 2.** Valori di IC<sub>50</sub> degli inibitori di riferimento e della serie **16-25**.

N° Composto	Enzima Isolato IC <sub>50</sub> (μM)		
	T-L	ChT-L	PGPH
16. Boc-Leu-Leu-Leu-Vk	> 10	> 10	> 10
17. H-Leu-Leu-Leu-Vk	> 10	> 10	> 10
18. Hmb-Leu-Leu-Leu-Vk	> 10	8.53	> 10
19. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Leu-Leu-Leu-Vk	9.13	4.22	> 10
20. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Leu-Leu-Leu-Vk	7.95	3.81	> 10
21. Boc-Val-Ser-Leu-Vk	> 10	> 10	> 10
22. H-Val-Ser-Leu-Vk	> 10	> 10	> 10
23. Hmb-Val-Ser-Leu-Vk	> 10	> 10	> 10
24. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO-Val-Ser-Leu-Vk	8.54	8.02	> 10
25. Z-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO-Val-Ser-Leu-Vk	6.41	6.65	> 10



**Figura 27.** Dati di inibizione dei composti vinil chetonici 16-25.

## **Conclusioni**

Considerando l'elevato potenziale terapeutico posseduto da inibitori specifici e selettivi nei confronti delle subunità catalitiche del proteasoma 20S, abbiamo sintetizzato e testato una nuova serie di composti a base peptidica recanti una nuova unità farmacoforica vinil chetonica C-terminale in grado di fungere da potenziale substrato per l'addizione di Michael della tronina enzimatica.

In generale l'inibizione dei subsiti proteolitici è nel range  $\mu\text{M}$  per molti dei derivati testati; inoltre la risposta biologica è funzione dei sostituenti N-terminali introdotti e non dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sequenza centrale tripeptidica.

In conclusione quindi, l'unità vinil chetonica introdotta risulta un gruppo elettrofilo sfavorevole per l'interazione primaria con le subunità catalitiche del proteasoma.

## **Serie butadienil, etil esterea parzialmente retroinvertita**

Proseguendo nella ricerca di composti in grado di inibire in modo potente e selettivo le diverse subunità del complesso enzimatico, abbiamo cercato di migliorare l'interazione tra la treonina catalitica e l'unità farmacoforica posta al C-terminale.

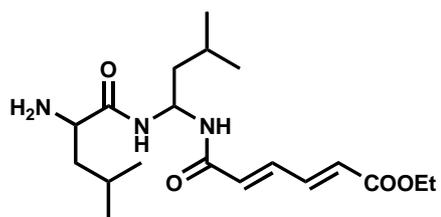
La nuova funzione prevede l'estensione della coniugazione dei doppi legami presenti sull'unità farmacoforica attraverso l'introduzione di un gruppo butadienil, vinil estereo ottenuto per monoesterificazione dell'acido trans, trans muconico.

Quest'ultimo è stato condensato via estere attivo alla sequenza peptidica centrale che reca in posizione C-terminale il derivato diammino geminale della leucina (gLeu).

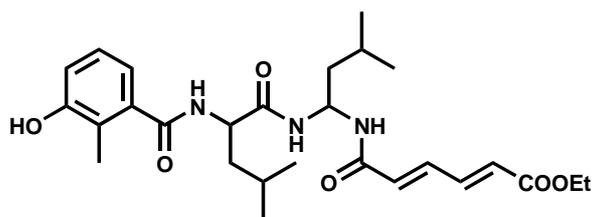
Per la sintesi della sequenza aminoacidica centrale abbiamo utilizzato residui di Leu-Leu (inibitori **26-29**) o Ser-Leu (inibitori **35-38**) che compongono le strutture dipeptidiche a catena più corta; tramite la condensazione di un ulteriore aminoacido opportunamente protetto abbiamo invece ottenuto le rispettive sequenze tripeptiche Leu-Leu-Leu (inibitori **31-34**) o Val-Ser-Leu (inibitori **39-43**) che completano la serie.

In posizione N-terminale sono state introdotte diverse funzionalità, quali un raggruppamento 3-idrossi-2-metil benzilico (Hmb), acido 6-ammino esanoico Z-protetto o acido 8-ammino ottanoico Z-protetto, un gruppo tert-butossi carbonilico (Boc) oppure si è mantenuta la funzionalità N<sub>α</sub>-amminica libera.

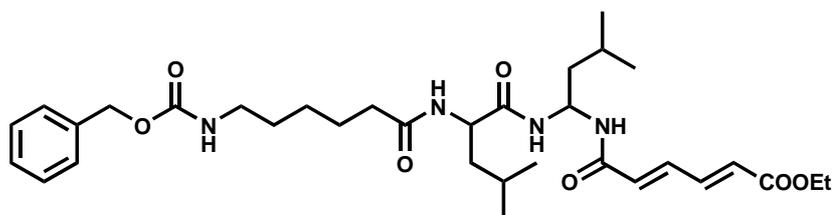
Le strutture dei nuovi composti sono mostrate nelle figure 28, 29, 30.



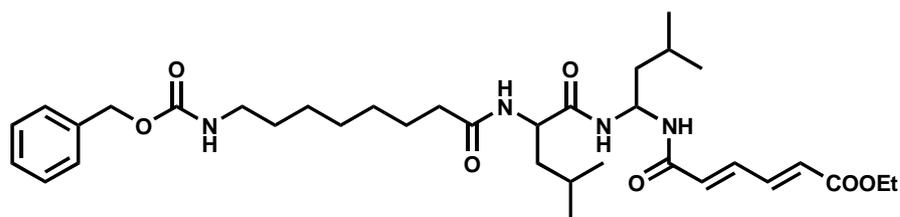
26. H-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



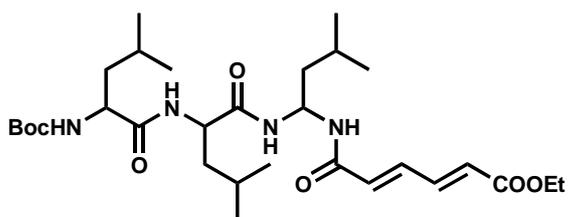
27. Hmb-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



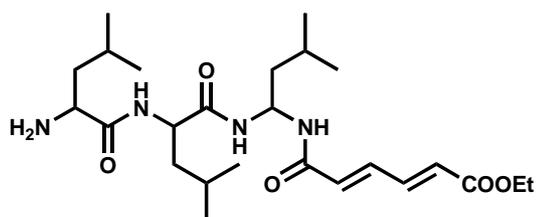
28. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



29. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

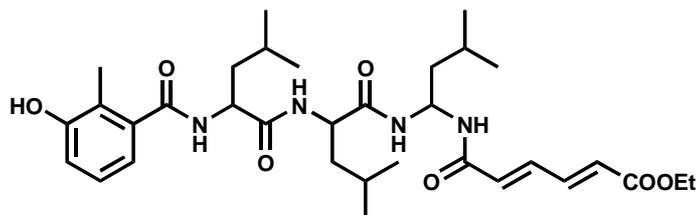


30. Boc-Leu-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

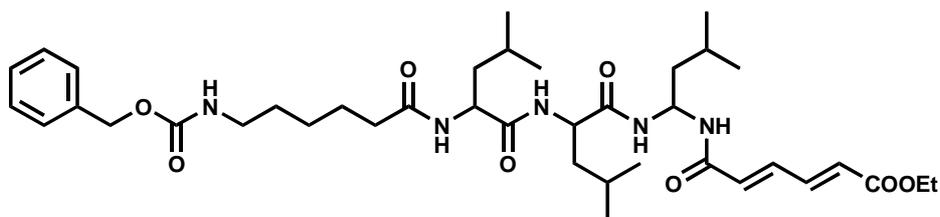


31. H-Leu-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

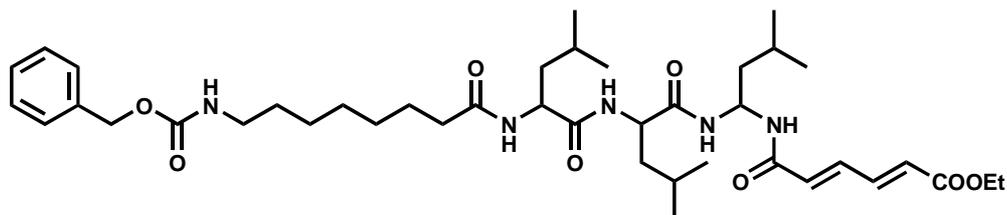
Figura 28. Inibitori 26-31.



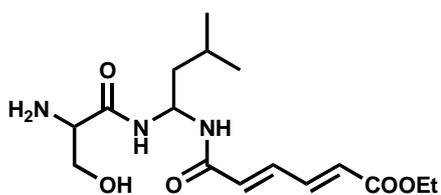
32. Hmb-Leu-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



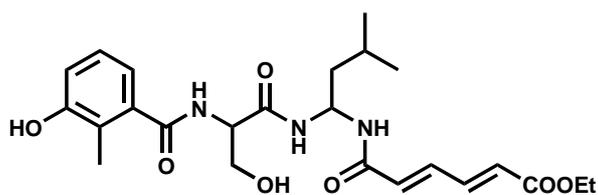
33. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Leu-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



34. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Leu-Leu-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

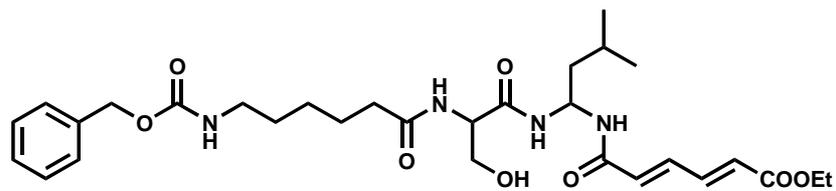


35. H-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

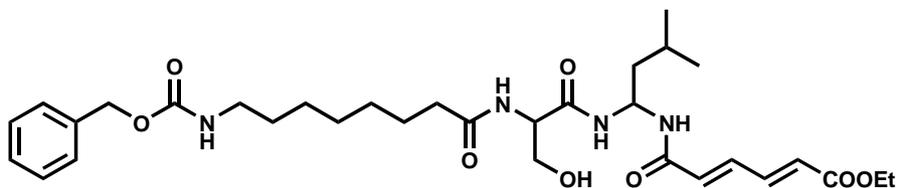


36. Hmb-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

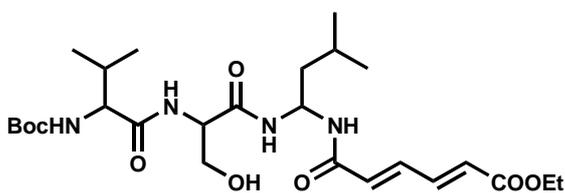
Figura 29. Inibitori 32-36.



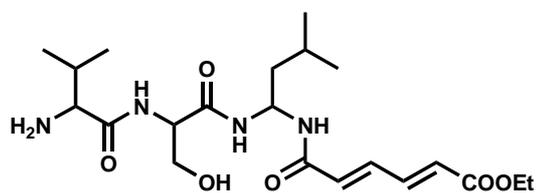
37. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



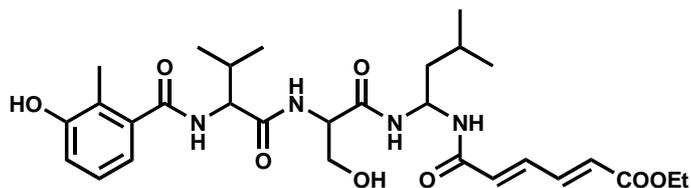
38. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



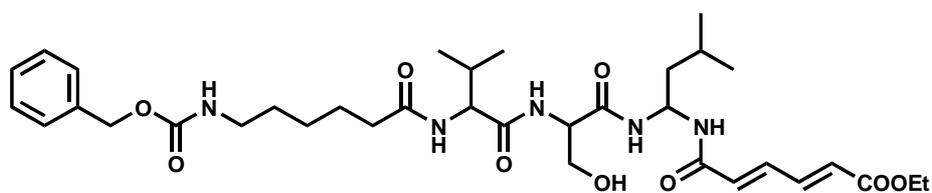
39. Boc-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



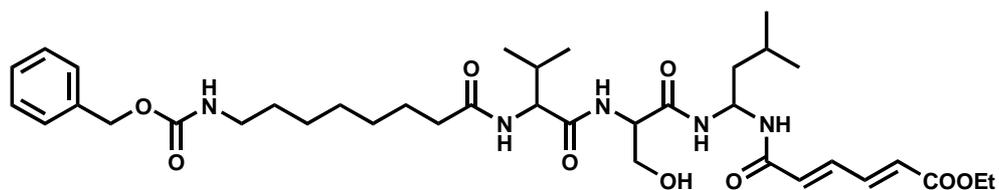
40. H-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



41. Hmb-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



42. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt



43. Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

**Figura 30.** Inibitori 37-43.

## Risultati e discussione

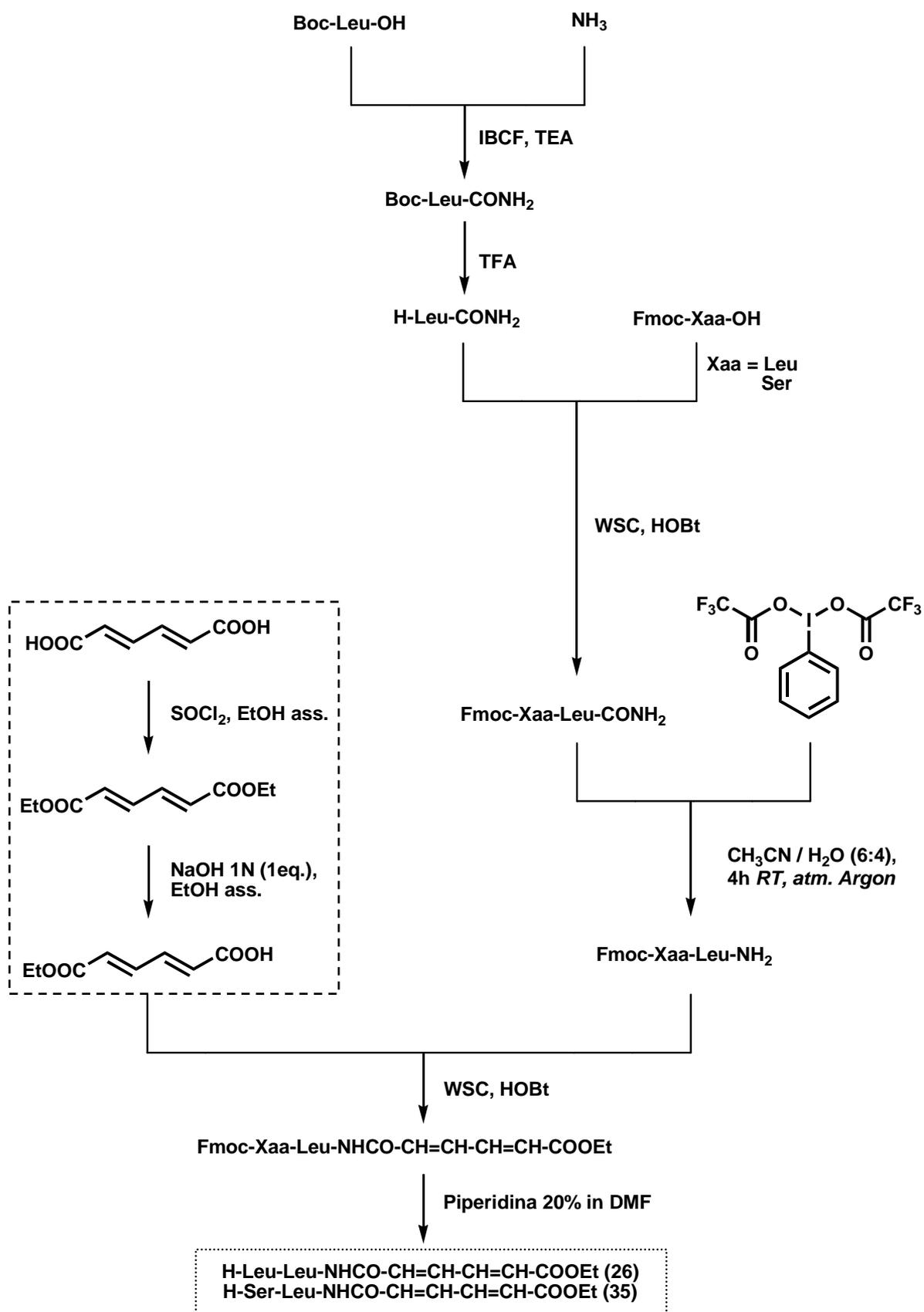
### Sintesi degli inibitori

Nello schema 6 sono riportati gli steps sintetici che hanno permesso di ottenere l'unità farmacoforica butadienil, etil esterea e la retroinversione del legame ammidico C-terminale. Tale strategia ha permesso di ottenere gli analoghi dipeptidici (**26**) e (**35**) dai quali per successivi cicli di condensazione e deprotezione sono stati ottenuti tutti gli altri derivati che completano la nuova serie.

Inizialmente si è preparata l'ammide della Boc-Leu-OH con l'impiego di isobutil cloroformiato (IBCF), TEA e NH<sub>3</sub>. Dopo rimozione del Boc per trattamento acido con TFA abbiamo ottenuto le sequenze dipeptidiche effettuando una condensazione via estere attivo tramite ausilio di WSC/HOBt con gli Fmoc-aminoacidi Leu e Ser. Gli intermedi Fmoc-Xaa-Leu-CONH<sub>2</sub> sono stati fatti reagire con bis(trifluoroacetossi)iodobenzene (TIB) in atmosfera di argon. La trasformazione da ammido ad ammina permette di ottenere la diammina geminale della leucina (gLeu) consentendo la condensazione successiva con il monoestere dell'acido trans, trans muconico e la conseguente retroinversione del legame ammidico. Il monoestere dell'ac. muconico è stato ottenuto, in precedenza, per esterificazione con SOCl<sub>2</sub> ed EtOH e successiva mono saponificazione con NaOH.

Il passaggio sintetico successivo che prevede la rimozione del gruppo protettore Fmoc in piperidina 20% in DMF ha portato agli analoghi **26** e **35**.

Nello schema 7 sono invece riportate le successive condensazioni e rimozioni dei gruppi protettori N-terminali che a partire dai composti **26** e **35** hanno permesso di ottenere i restanti analoghi di- e tripeptidici, opportunamente funzionalizzati all'N<sub>α</sub>, che completano la serie.



**Figura 31.** Schema di sintesi 6.

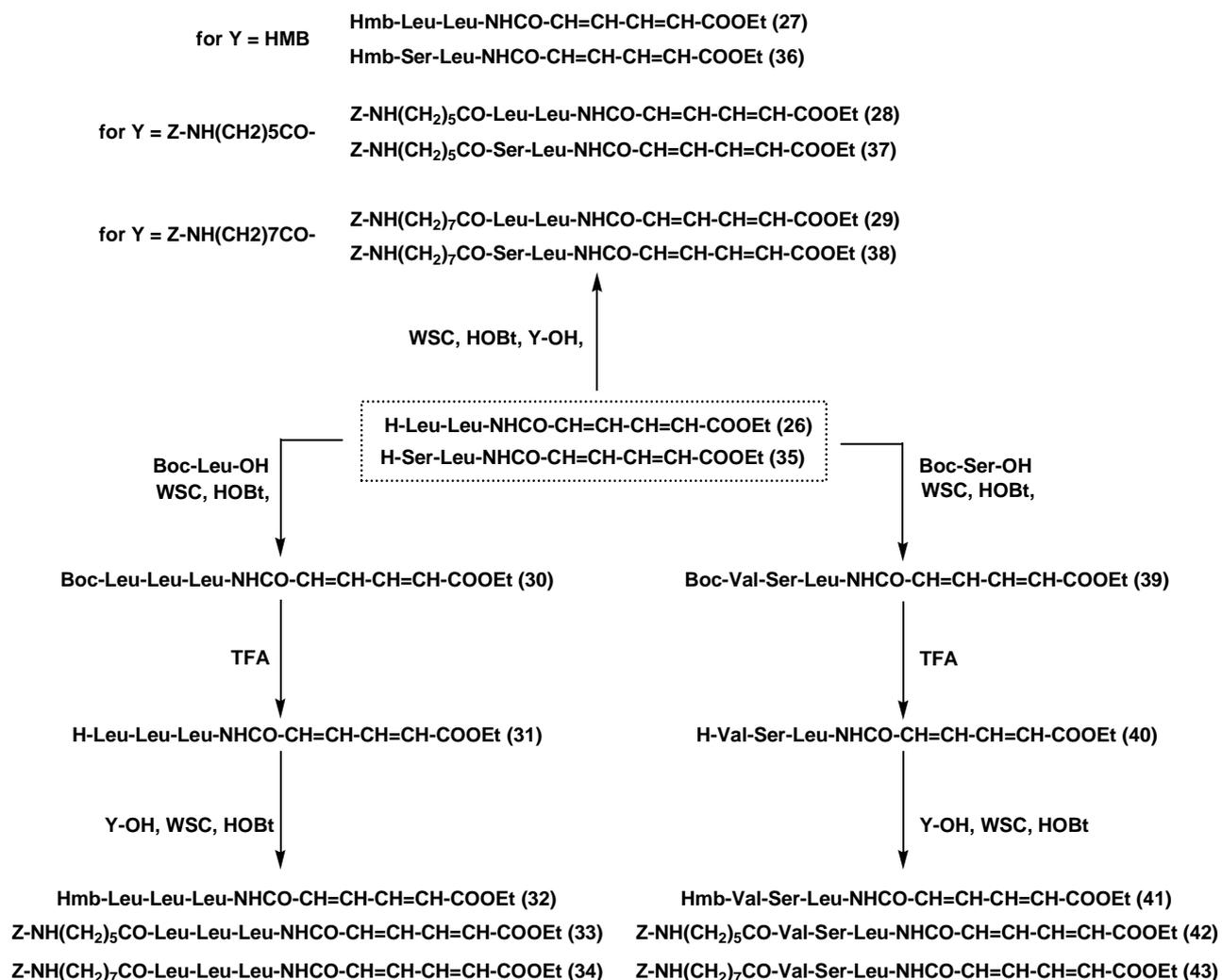


Figura 32. Schema di sintesi 7.

**Tavola 4.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori butadienil, etil esterei parzialmente retroinvertiti **26-43**.

N° Composto	HPLC T <sub>r</sub> (min)	MP °C	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (c=1, MeOH)	MS M+H <sup>+</sup>
Inibitore 26	11.25	138-143	-18.3	368.25
Inibitore 27	14.34	120-125	-16.8	502.29
Inibitore 28	15.68	Olio	-9.5	615.37
Inibitore 29	16.60	Olio	-8.7	643.40
Inibitore 30	17.40	Olio	-16.9	481.33
Inibitore 31	12.70	Olio	-17.3	581.39
Inibitore 32	15.46	Olio	-15.9	615,37
Inibitore 33	16.86	Olio	-10.1	728.46
Inibitore 34	17.86	Olio	-12.8	756.49
Inibitore 35	10.07	129-132	-21.8	342.20
Inibitore 36	11.61	115-118	-19.7	476.24
Inibitore 37	13.68	Olio	-10.1	589.32
Inibitore 38	14.67	Olio	-9.2	617.35
Inibitore 39	15.63	Olio	-17.5	541.32
Inibitore 40	10.89	145-148	-22.4	441.27
Inibitore 41	12.06	Olio	-18.3	575.30
Inibitore 42	14.30	Olio	-8.2	687.39
Inibitore 43	15.30	Olio	-9.4	715.42

## Saggi di inibizione enzimatica

L'isolamento del complesso enzimatico ed i saggi di inibizione delle tre subunità catalitiche del proteasoma sono stati effettuati secondo le procedure sperimentali descritte in precedenza.

Nella figura 33 sono riportati i grafici di inibizione, a 60 min, degli analoghi della nuova serie e dei noti composti di riferimento MG132 ed epossomicina, riguardanti le tre diverse attività (ChT-L, T-L e PGPH) in termini di unità di fluorescenza arbitraria (U.F.A.)

Per quanto riguarda l'attività chimotriptica, i nuovi analoghi non sono in grado di interagire in modo efficace con il subsito enzimatico. Si rileva pertanto una trascurabile inibizione.

La nuova unità farmacoforica introdotta non si dimostra quindi un substrato ideale per l'interazione con la treonina enzimatica come evidenziano anche i dati relativi all'attività tripsino-simile ( $\beta$ 2), con valori omogenei ma tutti nello stesso range del non trattato.

Più interessanti risultano i dati riguardanti l'attività post-acidica. L'analogo **43** ed in misura minore i composti **42** e **41** sono risultati i più attivi della serie, in tutti è presente una sequenza tripeptidica più idrofila ed una funzionalizzazione N-terminale ad elevato ingombro sterico. L'inibizione del sito  $\beta$ 1 delle nuove strutture retroinvertite risulta comunque inferiore ai noti e potenti inibitori di riferimento MG132 ed epossomicina.

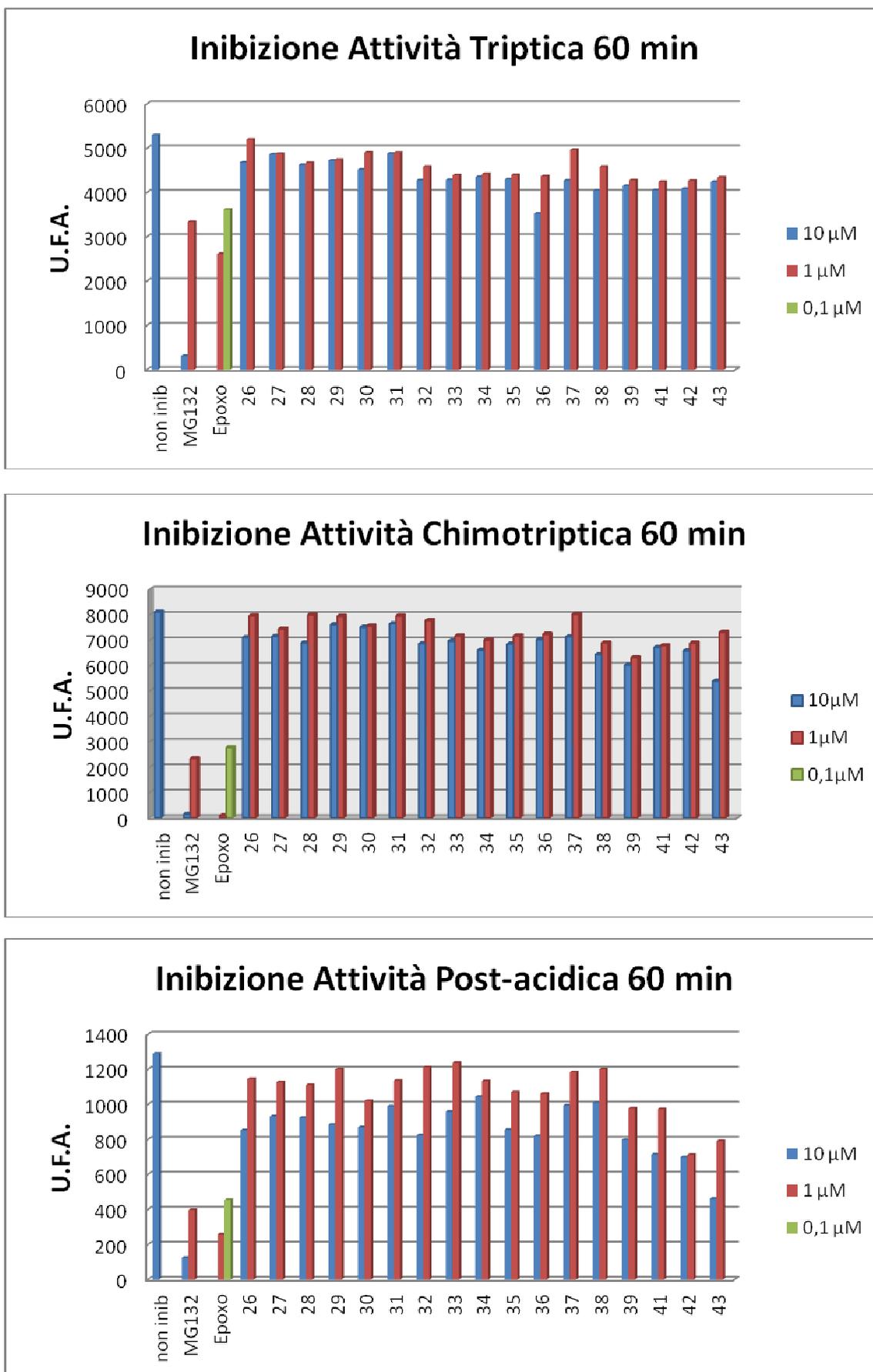


Figura 33. Dati di inibizione dei composti 26-43.

## Conclusioni

Poter disporre di molecole selettive per le singole attività proteolitiche del complesso enzimatico potrebbe rappresentare uno dei maggiori traguardi nella ricerca di agenti citotossici, antiproliferativi e anticancro. Con l'intento di valutare il contributo dato dall'unità farmacoforica nell'interazione con le subunità catalitiche del complesso enzimatico, abbiamo progettato e sintetizzato una nuova classe di inibitori a base peptidica. Rispetto alle serie precedenti, si è estesa la coniugazione sull'unità farmacoforica C-terminale mediante l'inserimento di una funzione butadienil etil esterea condensata alla sequenza oligopeptidica con un legame retroinvertito.

Questo nuovo substrato elettrofilo, progettato con l'intento di favorire un'interazione maggiore con la treonina catalitica dei subsiti enzimatici, non ha prodotto molecole con il profilo biologico desiderato.

Dai dati preliminari di inibizione in vitro, i nuovi composti sono risultati scarsamente attivi, in particolare nei confronti delle subunità  $\beta 2$  (T-L) e  $\beta 5$  (ChT-L) del complesso enzimatico. I derivati **41**, **42** e **43** sono i soli che hanno evidenziato una sensibile inibizione dell'attività simil-caspasica (PGPH).

In ultima analisi si può supporre che le caratteristiche di ingombro sterico della unità farmacoforica introdotta prevalgono nei confronti delle proprietà chimiche della stessa, destabilizzando l'interazione enzima-inibitore.

## Serie divinil chetonica a simmetria C2

Proseguendo nella ricerca di nuove molecole in grado di inibire il complesso enzimatico, si è sviluppata una serie di analoghi divinil chetonici a simmetria C2 (la cui struttura generale è riportata di seguito in figura 34), che si diversificano dalle canoniche sequenze aminoacidiche che caratterizzavano le serie precedenti. Essenzialmente si è cercato di espandere la coniugazione all'interno dell'unità farmacoforica al fine di facilitare l'attacco nucleofilo della treonina catalitica che rappresenta lo stadio primario per un'efficace inibizione.



**Figura 34.** Nuove strutture generali.

Queste nuove molecole sono state progettate anche in base ad evidenze bibliografiche sulla capacità antiproliferativa e antiangiogenica dei calconi (1,3 difenilpropen-1-oni).

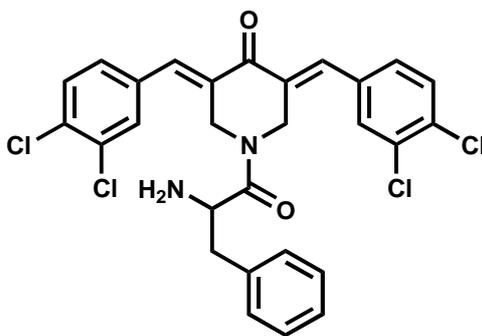
Questa funzione presente in numerosi composti naturali appartenenti alla famiglia dei flavonoidi, che includono curcumina e derivati del tè verde, consente a queste molecole di essere promettenti strumenti per il trattamento di patologie neoplastiche. Sebbene il loro meccanismo di azione risulti per lo più sconosciuto, dati sperimentali suggeriscono per tali strutture una potenziale attività nei confronti dei siti catalitici del proteasoma <sup>36</sup>. Inoltre, derivati boronici, aventi struttura base calconica, mostrano capacità di inibizione del complesso enzimatico <sup>37</sup>.

---

<sup>36</sup> Bazzaro M, Anchoori RK, Mudiam MK, Issaenko O, Kumar S, Karanam B, Lin Z, Isaksson Vogel R, Gavioli R, Destro F, Ferretti V, Roden RB, Khan SR. *J Med Chem.* 2011; 54(2):449-56.

<sup>37</sup> Das U, Pati HN, Sakagami H, Hashimoto K, Kawase M, Balzarini J, De Clercq E, Dimmock JR. *J Med Chem.* 2011; 54(9):3445-9.

Un ulteriore sviluppo di queste molecole ha portato alla sintesi, da parte di altri gruppi di ricerca, di composti come quello sotto riportato che presenta simmetria C2 e l'ammino gruppo del 4-piperidone funzionalizzato con fenilalanina (Figura 35).

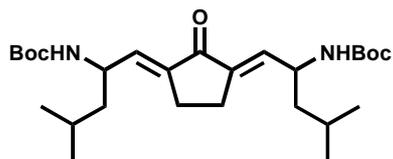


**Figura 35.** Molecola prototipo.

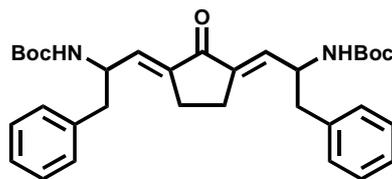
In questi inibitori il sistema carbonilico  $\alpha,\beta$ -insaturo funziona da substrato per l'ossidrile della catena laterale della treonina catalitica, mentre la parte aminoacidica inserita conferisce selettività per i subsiti enzimatici.

Con l'intento di valutare l'importanza delle varie unità molecolari costituenti il prototipo sviluppato da Bazzaro et al. si sono preparati gli analoghi mostrati in figura 36 che presentano un core centrale costituito dal ciclopentanone funzionalizzato con residui di leucina, fenilalanina, lisina o con acido 3-idrossi-2-metil benzoico (Hmb). Nell'altra serie invece, la struttura centrale prevede il 4-piperidone N-metile, N-benzile oppure funzionalizzato con fenilalanina ammidate; il farmacoforo divinil chetonico è stato ottenuto per condensazione di leucina o Hmb (Figura 37).

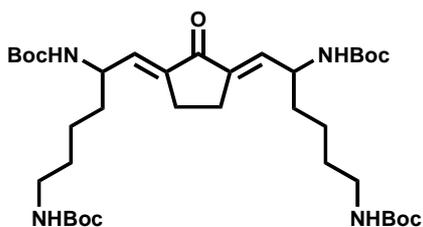
La scelta dei sostituenti legati all'unità ciclo chetonica è stata indirizzata dallo studio del rapporto struttura-attività effettuato su nostre serie precedenti.



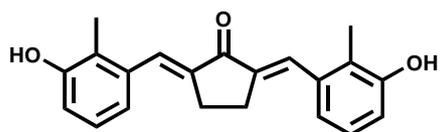
**Composto 44**



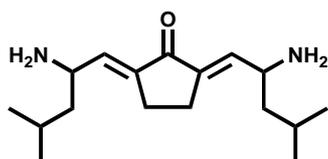
**Composto 45**



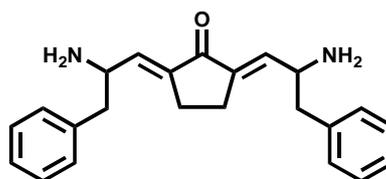
**Composto 46**



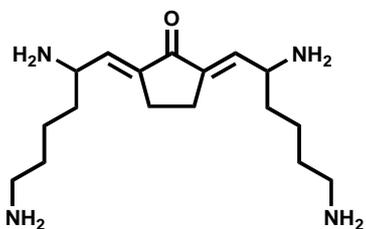
**Composto 47**



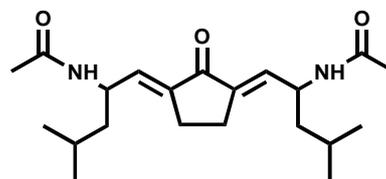
**Composto 48**



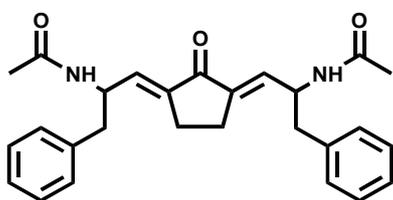
**Composto 49**



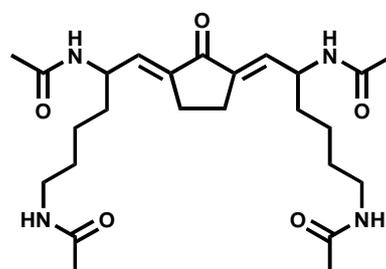
**Composto 50**



**Composto 51**

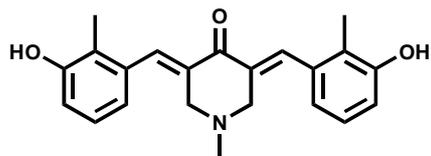


**Composto 52**

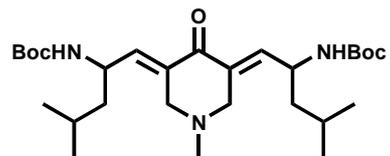


**Composto 53**

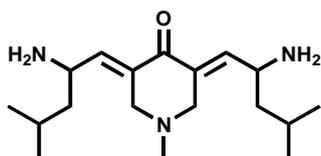
**Figura 36.** Inibitori 44-53.



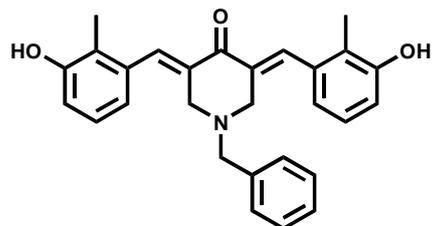
**Composto 54**



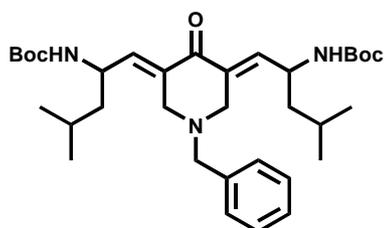
**Composto 55**



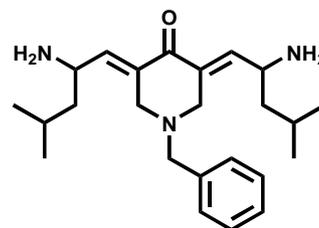
**Composto 56**



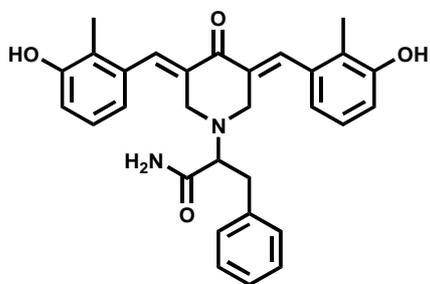
**Composto 57**



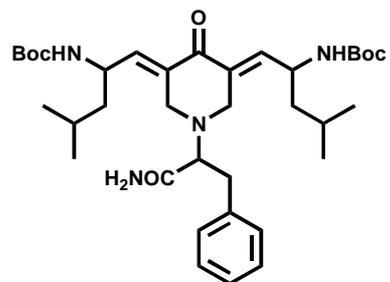
**Composto 58**



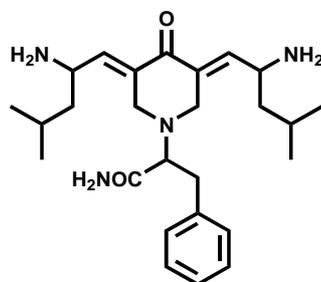
**Composto 59**



**Composto 60**



**Composto 61**



**Composto 62**

**Figura 37.** Inibitori 54-62.

## Risultati e discussione

### Sintesi degli inibitori

La preparazione dei nuovi composti divinil chetonici a simmetria C2 è stata effettuata seguendo gli schemi sintetici 8 e 9. La strategia seguita è quella che ha permesso di ottenere tutti i derivati voluti con il minor numero di passaggi sintetici.

Nello Schema 8 è riportata la sintesi dei composti **44-53** che prevedono un core centrale costituito dal ciclopentanone quale base per la costruzione della struttura divinil chetonica funzionalizzata con gli opportuni aminoacidi. Lo stadio sintetico caratterizzante è rappresentato dalla reazione di Knoevenagel che interviene tra il chetone ciclico ed i derivati aldeidici dei residui Boc-protetti. Le aldeidi dei corrispondenti aminoacidi N $\alpha$ -protetti vengono preparate secondo la metodica di Fehrentz e Castro <sup>31</sup> che prevede la formazione dell'N-metil,N-metossi ammido ottenuta per attivazione dell'aminoacido via estere attivo in presenza dell'ammina. La successiva riduzione con litio alluminio idruro porta alla formazione dei derivati aldeidici utilizzati nella reazione di Knoevenagel effettuata in presenza di idrossido di litio e quantità equivalenti dei reagenti. La reazione procede con buone rese a dare gli analoghi protetti **44-46** a simmetria C2 con isomeria trans confermata mediante analisi NMR. Con lo stesso schema viene preparato l'analogo **47** dove il ciclopentanone è funzionalizzato per condensazione con l'acido 3-idrossi-2-metil benzoico. I successivi derivati **48-50** vengono ottenuti per trattamento con acido trifluoroacetico dai corrispondenti analoghi protetti. Infine, i composti acetilati **51-53** sono stati preparati dai precedenti per reazione con anidride acetica.

Gli analoghi simmetrici aventi come corpo centrale il 4-piperidone sono stati preparati secondo la procedura presentata nello schema 9

partendo dall'N-metil-4-piperidone che viene metilato con ioduro di metile fornendo il sale d'ammonio corrispondente. La reazione successiva con benzilammina o fenilalanina ammide in presenza di carbonato di potassio permette di ottenere la voluta funzionalizzazione del nucleo centrale. Il raggruppamento divinil chetonico viene costruito come in precedenza mediante reazione di Knoevenagel con i derivati aldeidici della leucina Boc-protetta e dell'Hmb a dare i composti **57**, **58**, **60** e **61**. La rimozione del Boc con acido trifluoroacetico porta agli analoghi **59**, **62** mentre i composti **54-56** sono ottenuti direttamente per reazione di Knoevenagel tra N-metil-4-piperidone e le corrispondenti aldeidi della leucina Boc-protetta e dell'Hmb. Di tutti i nuovi derivati divinil chetonici è stata valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR dopo analisi e purificazione tramite RP-HPLC.

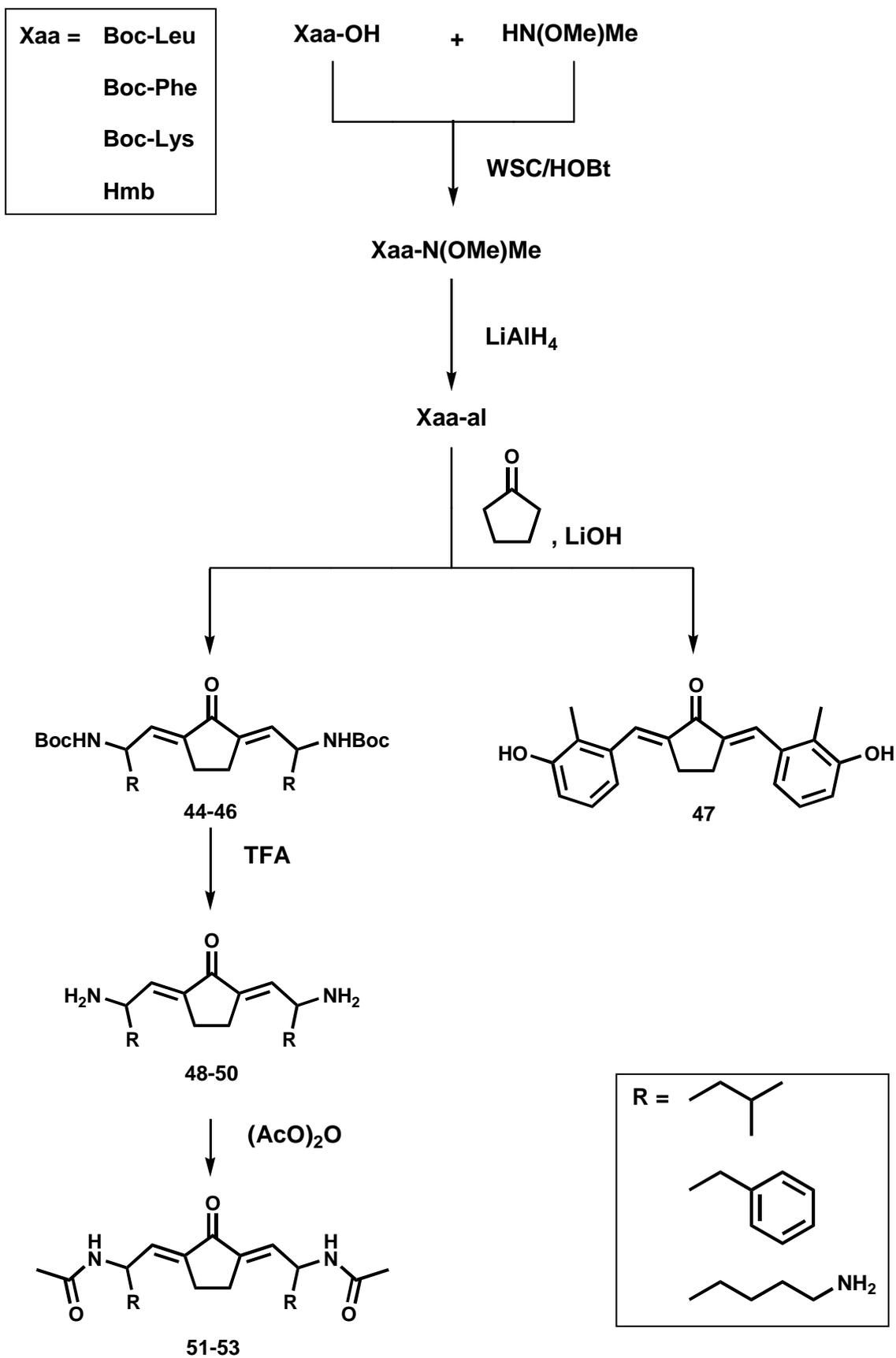


Figura 38. Schema di sintesi 8.

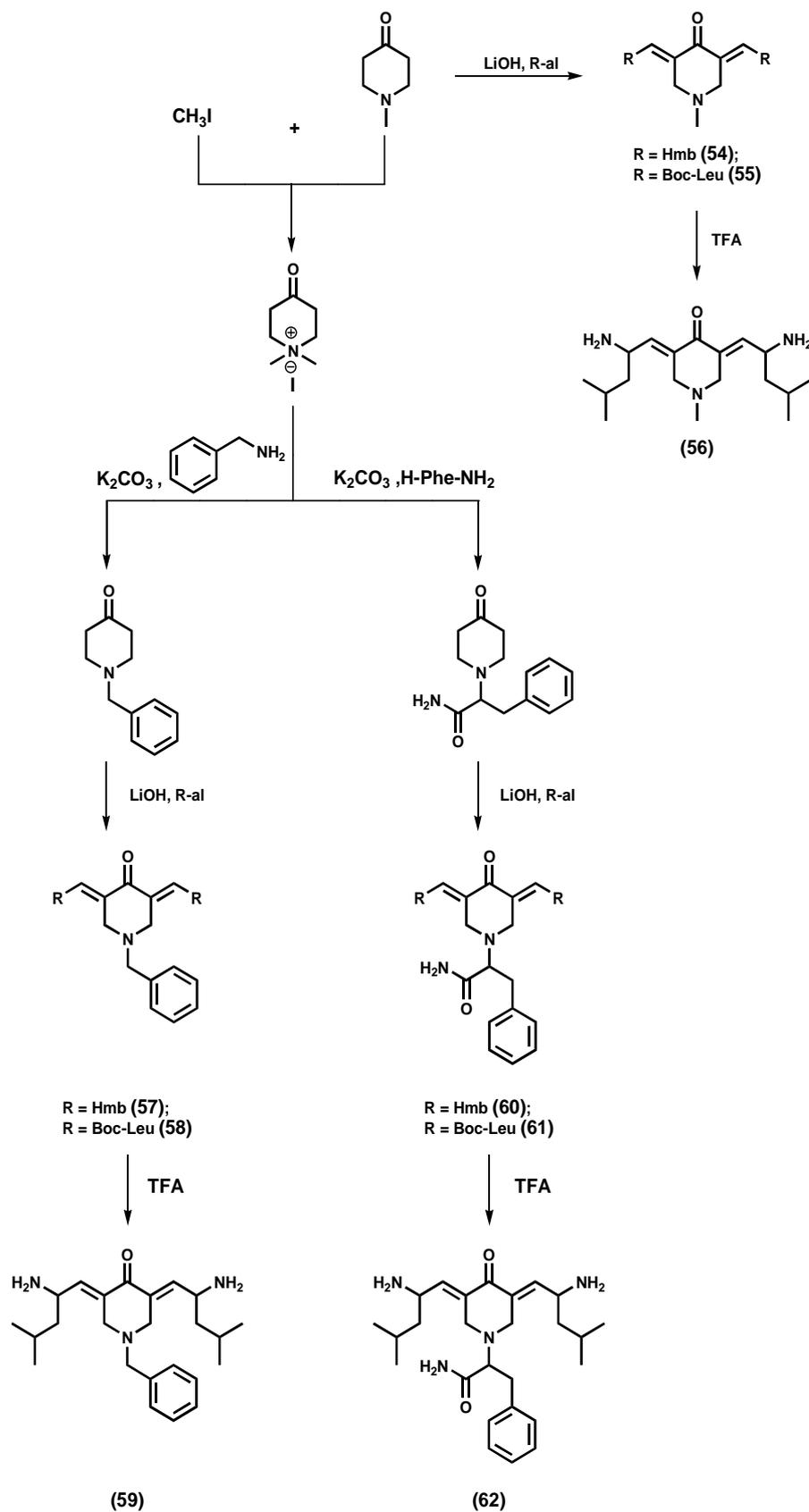


Figura 39. Schema di sintesi 9.

**Tavola 5.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori divinil chetonici a simmetria C2 **44-62**.

N° Composto	HPLC T <sub>r</sub> (min)	MP °C	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (c=1, MeOH)	MS M+H <sup>+</sup>
Inibitore 44	20.69	120-127	+9,8	479,34
Inibitore 45	19.90	Olio	+13.7	547,31
Inibitore 46	19.10	Olio	+5.9	709,47
Inibitore 47	14.33	227-233	-	321,38
Inibitore 48	6.71	151-155	+15.6	279,24
Inibitore 49	9.59	Olio	+18.2	347,21
Inibitore 50	5.98	130-135	+10.5	309,47
Inibitore 51	11.74	Olio	+11.4	363,26
Inibitore 52	12.82	Olio	+15.0	431,23
Inibitore 53	8.54	167-170	+8.8	477,30
Inibitore 54	10.94	235-237	-	350,42
Inibitore 55	15.56	123-125	+31.3	508,37
Inibitore 56	12.91	154-158	+35.7	308,27
Inibitore 57	13.32	198-203	-	426,52
Inibitore 58	16.31	121-124	+18.9	584,40
Inibitore 59	12.24	164-169	+22.5	384,40
Inibitore 60	11.68	170-173	+9.7	483,57
Inibitore 61	15.67	117-122	+19.8	641,85
Inibitore 62	12.83	139-143	+25.6	441,85

## Saggi di inibizione enzimatica

Tutti gli analoghi **44-62** sono stati saggiati, assieme ad MG132 ed epossomicina, quali inibitori del complesso enzimatico isolato nei confronti delle tre attività catalitiche chimotriptica, triptica e post-acidica. Sono state seguite le stesse procedure e le medesime condizioni sperimentali già descritte in modo dettagliato per le serie precedenti.

Nella Figura 40 sono riportati i grafici relativi all'inibizione dopo 60 min delle subunità  $\beta 5$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 1$  del complesso multicatalitico esplicitata dai derivati ciclopentanonici simmetrici **44-53** e dai noti inibitori di riferimento.

Dall'analisi dei dati si può affermare che generalmente i nuovi analoghi non danno un'inibizione significativa, specie se paragonata ai potenti MG132 ed epossomicina. Si riscontra una blanda attività solo nei confronti della subunità post-acidica  $\beta 1$ , anche se di entità poco rilevante. Risulta quindi evidente che in questa serie la semplificazione strutturale apportata ai modelli presentati da altri ricercatori risulta deleteria per la risposta biologica; in particolare, la funzionalizzazione del core centrale ciclo chetonico, (che nei nostri derivati è assente), sembra indispensabile per una significativa inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma. Ininfluenti risultano i vari sostituenti di natura aminoacidica e non, che creano l'unità farmacoforica divinil chetonica. Si può quindi affermare che in questa serie, la sola presenza del potenziale substrato per l'attacco nucleofilo della treonina catalitica, non permette una plausibile interazione con le tasche attive del complesso multicatalitico.

L'attività dei nuovi composti **54-62** (Figura 41) con struttura centrale 4-piperidonica risulta più interessante, anche se in questo caso si hanno solo risultati parziali e derivanti da un unico saggio di inibizione. Un'analisi più accurata della risposta biologica dovrà essere effettuata quando si avranno a disposizione tutti i dati, confermati con prove

ripetute. Per ora si può constatare una blanda inibizione dell'attività post-acidica comunque inferiore a quella esercitata dagli inibitori di riferimento epossomicina ed MG132. I derivati divinil 4-piperidonici N-sostituiti **60** e **62** sono gli analoghi risultati più attivi e lo stesso profilo si è avuto nel saggio di inibizione riguardante la subunità  $\beta 5$ . Anche l'attività nei confronti della cavità catalitica chimotriptica è risultata decisamente inferiore ai noti composti di riferimento. Cercando di analizzare questi risultati si può affermare che si ha una migliore interazione con i siti attivi del proteasoma quando il nucleo centrale è sostituito sull'azoto piperidonico da un residuo di fenilalanina ammidica mentre i sostituenti laterali, che vanno a comporre la funzionalità divinil chetonica, non influenzano in modo evidente il profilo biologico. Infine, tutti i derivati di questa seconda serie sono risultati praticamente inattivi nei saggi di inibizione inerenti il subsito triptico  $\beta 2$ .

La serie 4-piperidonica è quella che maggiormente si avvicina dal punto di vista strutturale ai modelli presentati da altri ricercatori anche se nel nostro caso l'attività non è stata pari alle aspettative facendo supporre una poco efficace interazione primaria con la treonina catalitica non supportata da interazioni secondarie in grado di stabilizzare il legame con il complesso enzimatico.

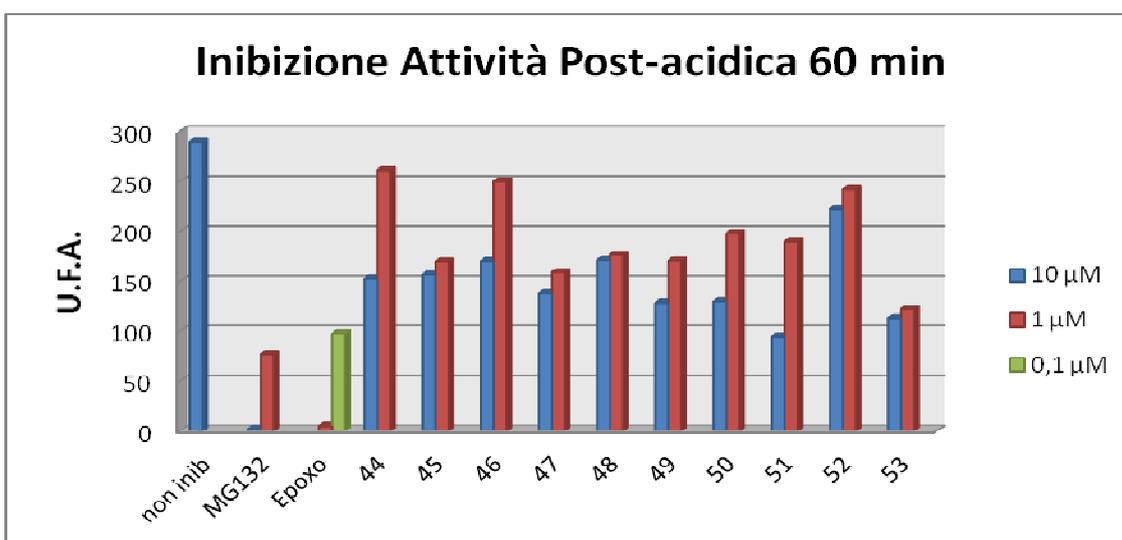
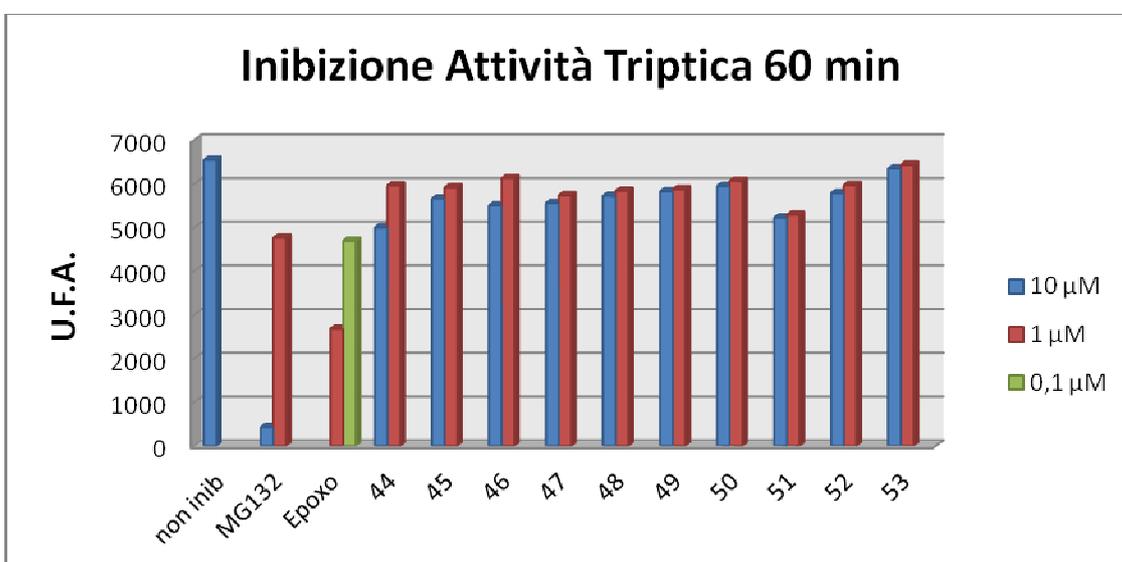
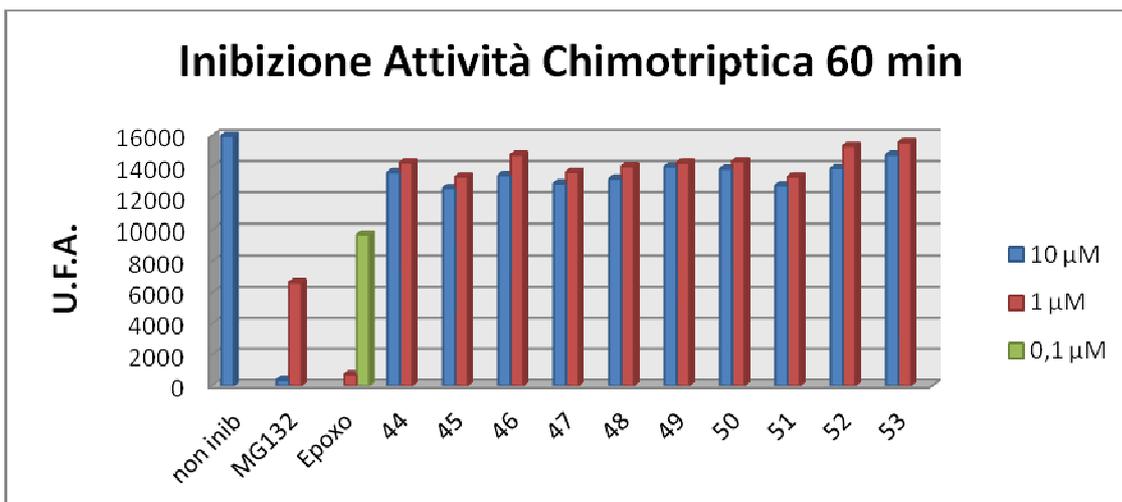
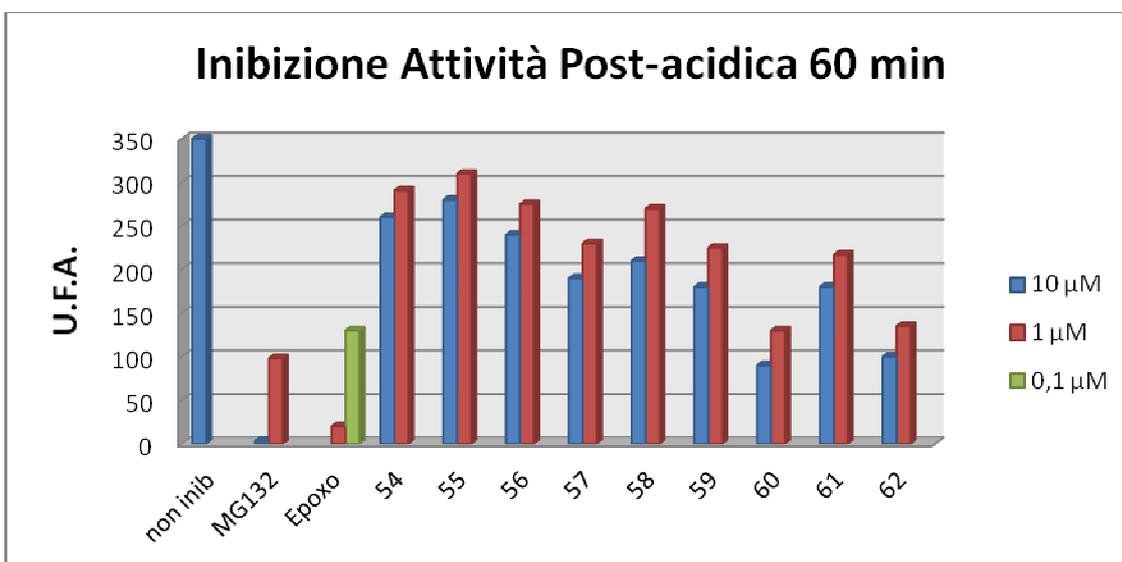
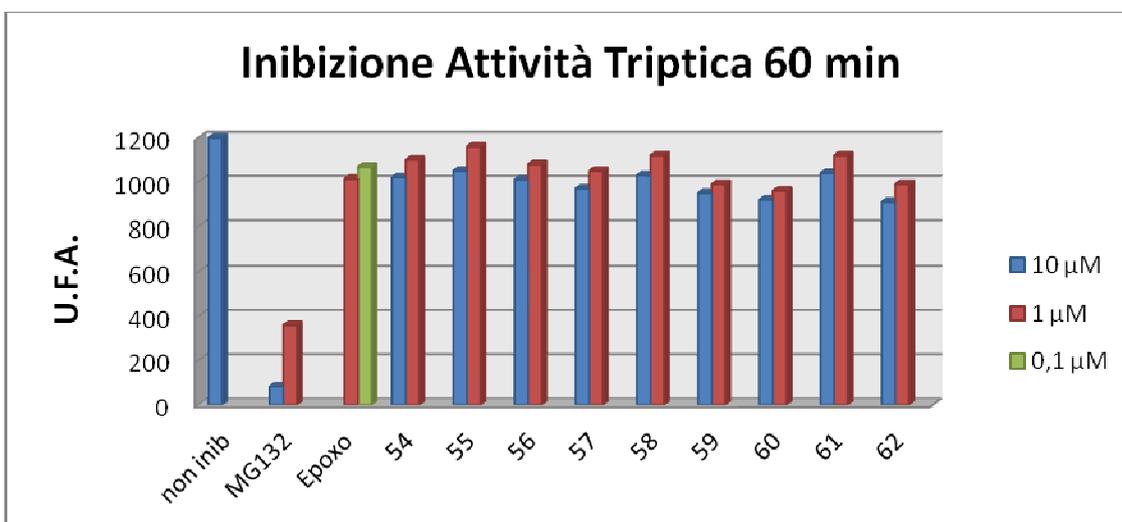
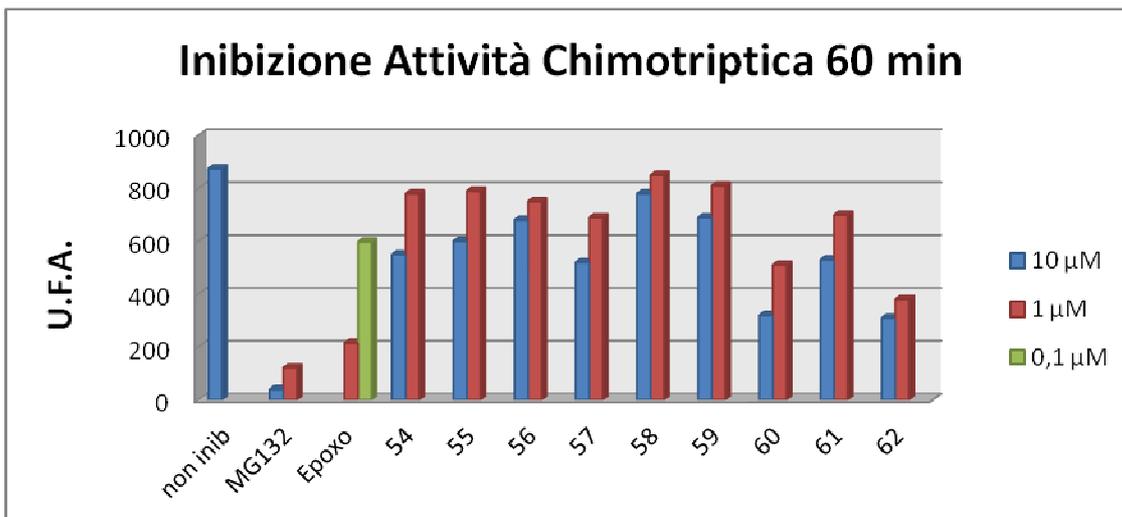


Figura 40. Dati di inibizione dei derivati Ciclopentanonici 44-53.



**Figura 41.** Dati di inibizione dei derivati 4-piperidonici **54-62**.

## **Conclusioni**

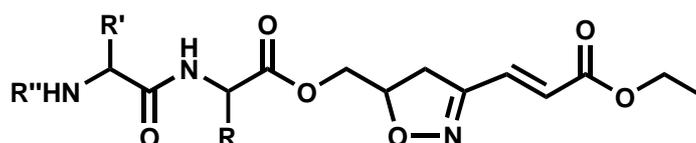
E' stata presentata la sintesi e la risposta biologica di nuove molecole pseudopeptidiche a simmetria C2 aventi una struttura centrale divinil chetonica. I nuovi composti sono stati progettati in base ai risultati ottenuti da altri ricercatori inerenti lo studio di inibitori del proteasoma a potenziale attività antineoplastica.

L'intento di questo lavoro era quello di approfondire la possibilità di surrogare i requisiti strutturali dei modelli precedenti con unità aminoacidiche e valutare l'importanza del nucleo centrale divinil chetonico nell'interazione con i siti enzimatici.

Dai risultati ottenuti in prima analisi, si può affermare che la struttura centrale divinil chetonica, che funziona da unità farmacoforica primaria, risulta in parte efficace quando è funzionalizzata con opportuni sostituenti. Su queste basi e dopo indispensabili conferme dell'attività biologica, sarà possibile progettare e preparare anche con approcci sintetici riconducibili alla chimica combinatoriale, altre molecole recanti diverse funzioni in grado di fornire una più approfondita analisi del rapporto struttura attività.

## Serie isossazolin, vinil esterea

E' stata progettata e sintetizzata una nuova serie di inibitori del complesso enzimatico aventi la struttura generale sotto riportata (Figura 42), dove tra la funzionalità vinil esterea C-terminale e la catena oligopeptidica è stato inserito un ciclo isossazolinico.

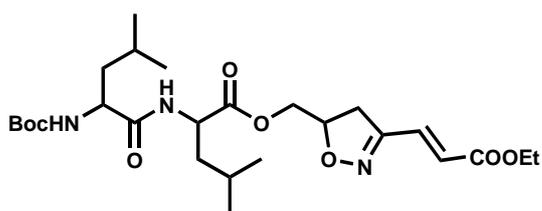


**Figura 42.** Struttura generale dei nuovi inibitori.

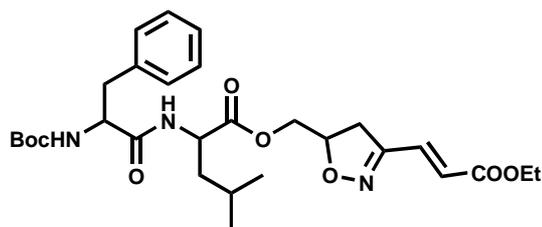
Come citato in precedenza, molecole con coniugazioni estese come i calconi (1,3 difenilpropen-1-oni) hanno mostrato una rilevante capacità antiproliferativa ed antiangiogenica.

La serie di analoghi aventi struttura generale a simmetria C2, presentati in precedenza, malgrado un'estesa coniugazione, hanno fornito una risposta biologica poco soddisfacente, indice di una interazione poco efficace con i siti catalitici del complesso enzimatico

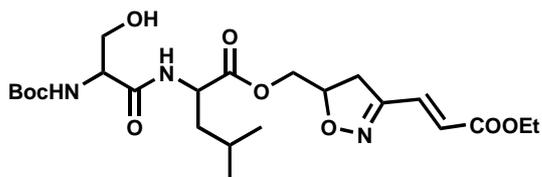
I composti facenti parte della serie isossazolin, vinil esterea hanno invece una struttura più canonica, con il farmacoforo C-terminale legato ad oligosequenze aminoacidiche come mostrato nelle figure 43 e 44.



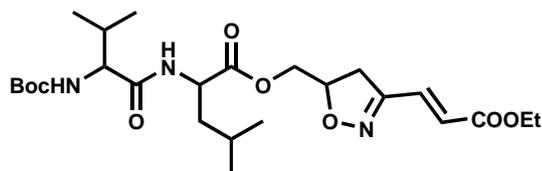
Composto 63



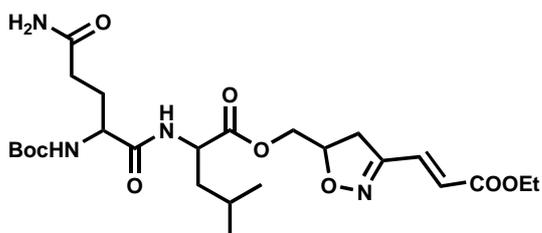
Composto 64



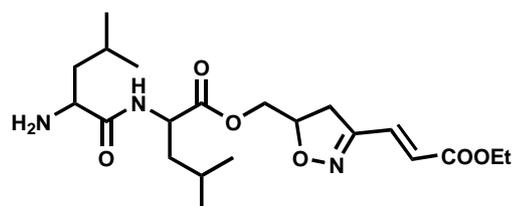
Composto 65



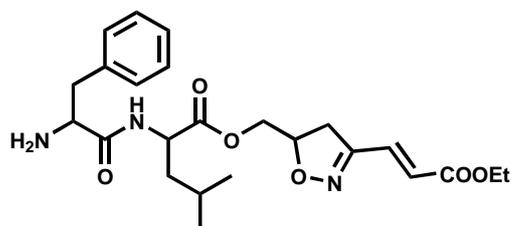
Composto 66



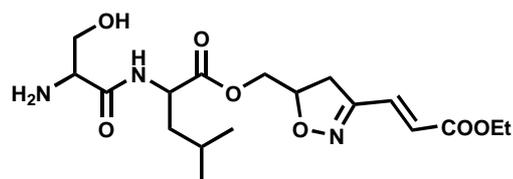
Composto 67



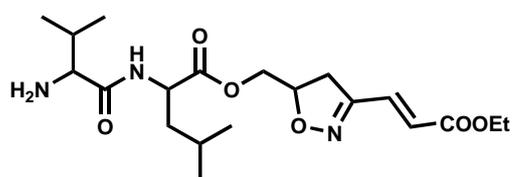
Composto 68



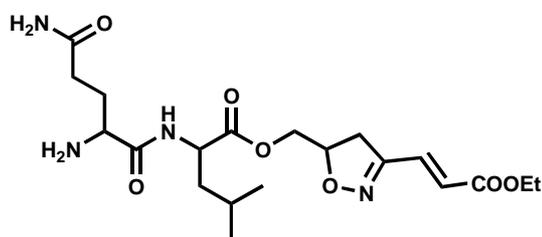
Composto 69



Composto 70

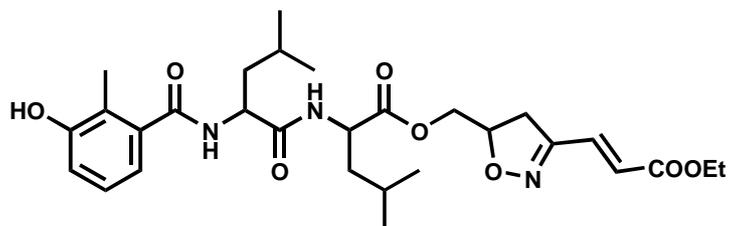


Composto 71

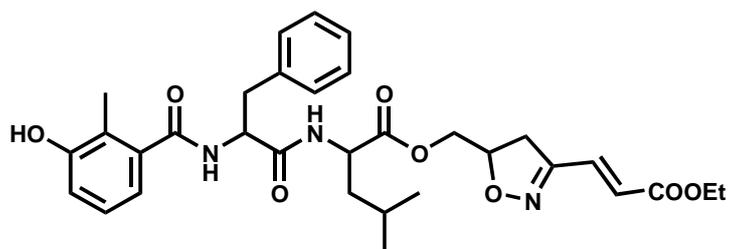


Composto 72

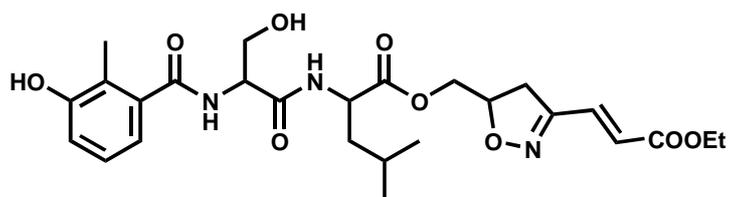
Figura 43. Strutture dei derivati isossazolin, vinil esterei 63-72.



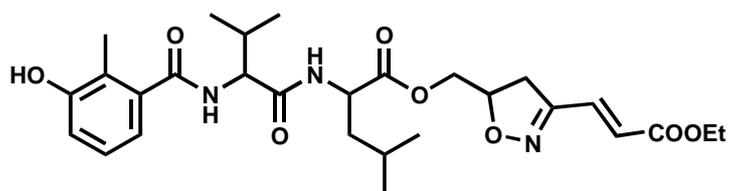
*Composto 73*



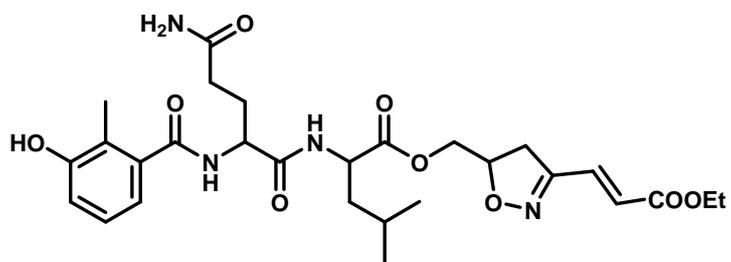
*Composto 74*



*Composto 75*



*Composto 76*



*Composto 77*

**Figura 44.** Inibitori 73-77.

## Risultati e discussione

### Sintesi degli inibitori

La preparazione dei nuovi composti pseudodipeptidici isossazolin, vinil esterei **63-77** è stata effettuata secondo gli schemi sintetici 10 e 11 seguendo la strategia sintetica che ha permesso di ottenere tutti i derivati voluti con il minor numero di passaggi e con le rese migliori.

Nello schema 10 è riportata la procedura utilizzata per la preparazione dell'intermedio necessario ad ottenere il raggruppamento farmacoforico direttamente legato al carbossile della leucina  $N_{\alpha}$ -protetta.

Lo stadio sintetico caratterizzante è rappresentato dalla reazione di ciclo addizione [3+2] tra l'ossima e l'estere allilico della leucina protetta, con l'ausilio di N-clorosuccinimide (NCS), trietilammina (TEA) e piridina. L'ossima viene ottenuta per reazione tra dimetossi-acetaldeide, idrossilammina ed  $\text{NaHCO}_3$ . La leucina allil-estere a sua volta è preparata a partire da Boc-Leu-OH per reazione con allil-bromuro in presenza di  $\text{NaHCO}_3$ .

L'intermedio *I* acetalico viene trattato con TFA ottenendo la contemporanea rimozione del gruppo protettore uretanico ed il ripristino della funzionalità aldeidica. Lo step successivo, riportato nello schema 11, prevede una reazione di Wittig in THF anidro tra l'aldeide ottenuta in precedenza ed [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano che porta alla formazione dell'unità isossazolin, vinil esterea legata al carbossile della leucina.

I composti **63-67** vengono ottenuti per condensazione via esteri attivi (WSC/HOBt) con gli opportuni Boc-aminoacidi. La rimozione del gruppo protettore con acido trifluoroacetico (TFA) permette di ottenere gli analoghi con la funzionalità amminica N-terminale libera **68-72**. Infine, i derivati **73-77** che completano la serie, sono stati preparati dai precedenti per acilazione via WSC/HOBt con acido 3-idrossi-2-metil benzoico (Hmb).

Per problemi legati all'isolamento del proteasoma e alla sua purificazione, solo di alcuni prodotti è stato possibile effettuare i saggi di inibizione enzimatica. Di tutti è stata invece valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR dopo analisi e purificazione tramite RP-HPLC.

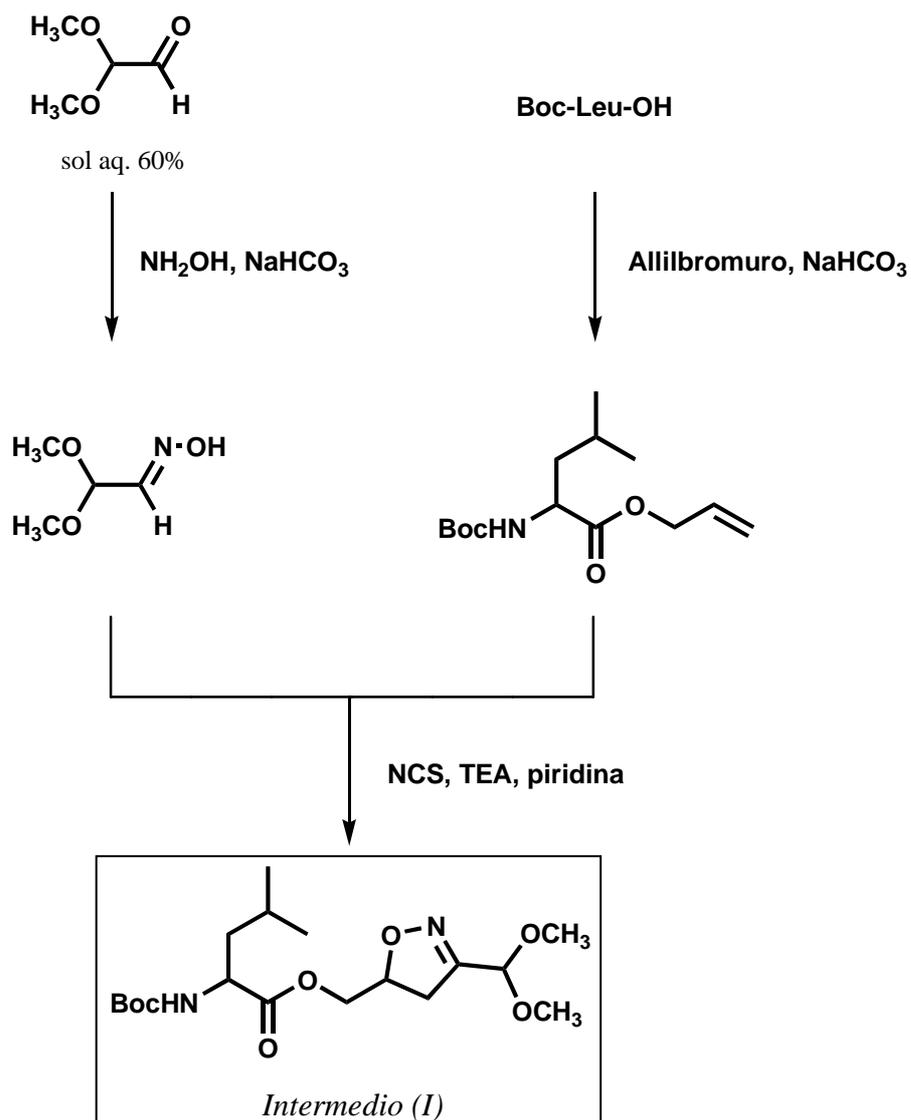


Figura 45. Schema di sintesi 10.

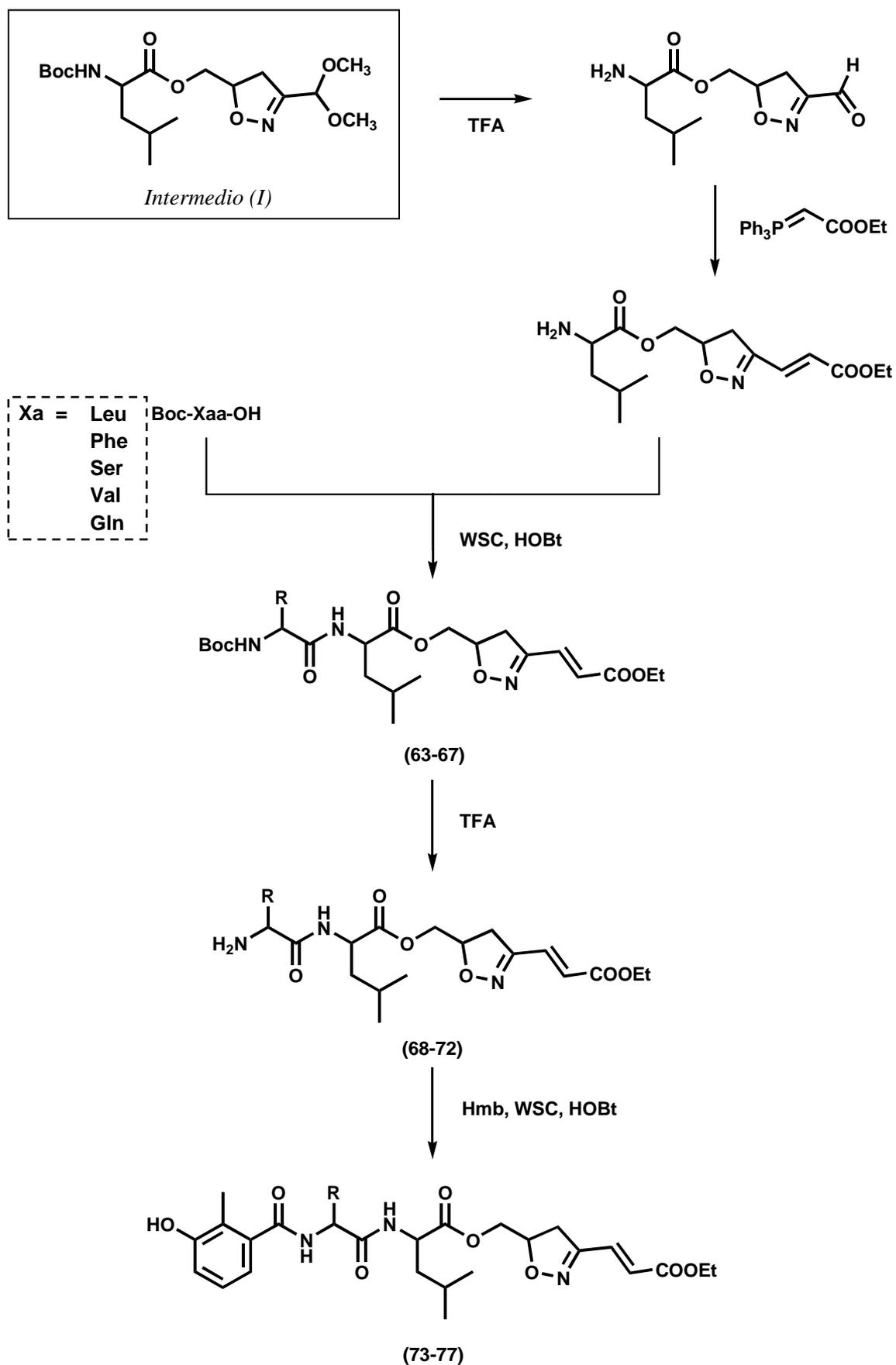


Figura 46. Schema di sintesi 11.

**Tavola 6.** Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori isossazolin, vinil esterei **63-77**.

N° Composto	HPLC T <sub>r</sub> (min)	MP °C	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> (c=1, MeOH)	MS M+H <sup>+</sup>
Inibitore 63	17.23	Olio	-32,0	526,31
Inibitore 64	17.50	Olio	-12,1	560,29
Inibitore 65	13.90	Olio	-21,3	500,26
Inibitore 66	16.53	Olio	-10,0	512,29
Inibitore 67	12.16	Olio	-15,3	541,28
Inibitore 68	11.75	Olio	-18,4	426,26
Inibitore 69	12.01	Olio	-15,7	460,24
Inibitore 70	10.39	Olio	-26,5	400,20
Inibitore 71	10.20	Olio	-13,4	412,24
Inibitore 72	11.24	Olio	-19,8	441,23
Inibitore 73	12.77	Olio	-24,0	560,29
Inibitore 74	12.50	Olio	-17,3	594,28
Inibitore 75	10.70	Olio	-23,4	534,24
Inibitore 76	12.21	Olio	-16,9	546,28
Inibitore 77	11.86	Olio	-17,7	575,27

## Saggi di inibizione enzimatica

Per problemi legati alla strumentazione analitica e all'isolamento dell'enzima, non è stato possibile valutare l'attività biologica della serie completa; solamente gli analoghi **63-70** sono stati saggiati quali inibitori del complesso enzimatico isolato con le note procedure ampiamente riportate nei precedenti paragrafi.

Nella figura 47 sono mostrati i grafici relativi all'inibizione dopo 60 min delle subunità  $\beta 5$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 1$  del complesso multicatalitico riguardante una parte dei nuovi composti isossazolin, vinil esterei comparati agli inibitori di riferimento MG132 ed epossomicina.

I risultati schematizzati riguardano un solo saggio di inibizione nei confronti dell'enzima isolato e quindi i dati ottenuti dovranno essere confermati con prove ulteriori.

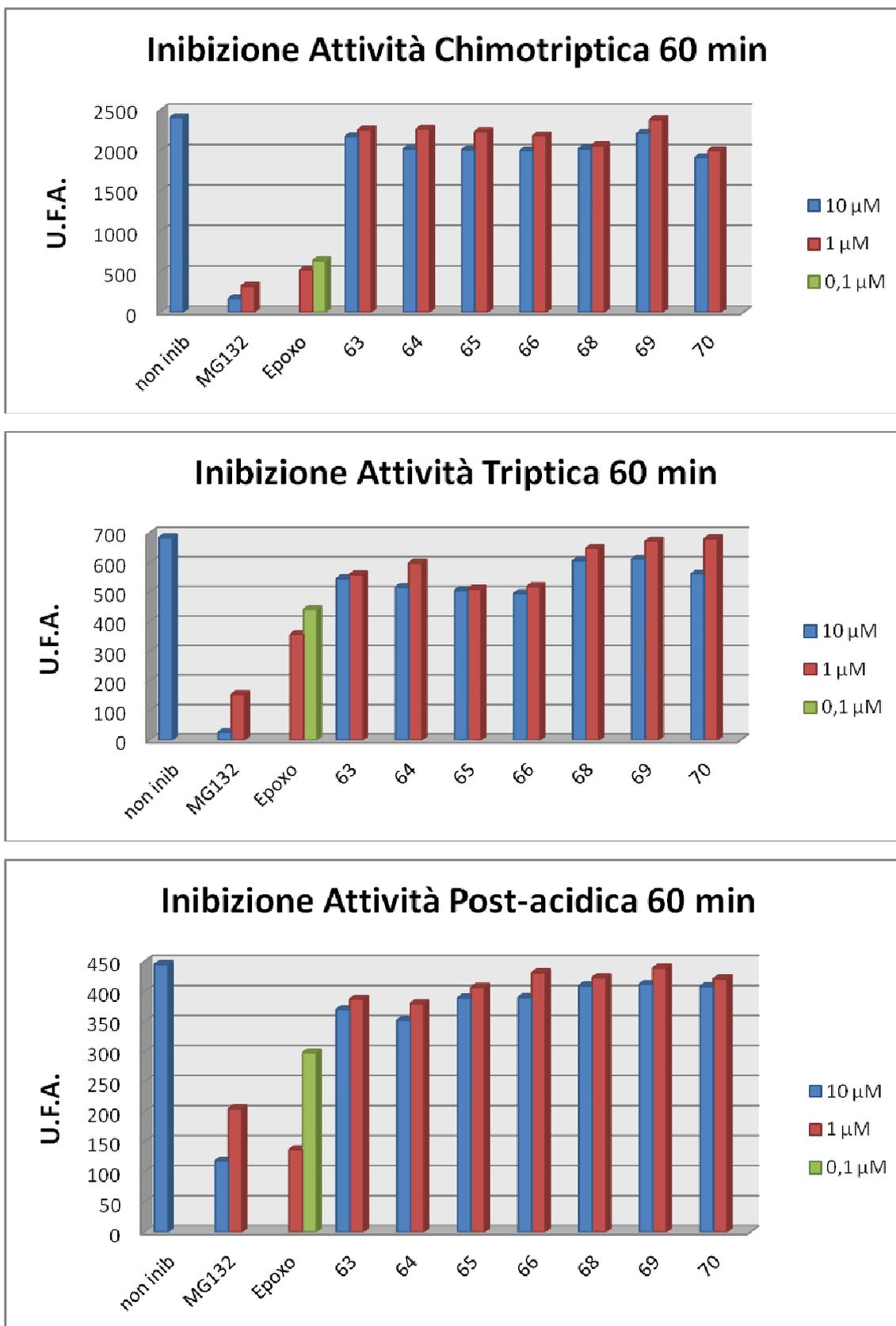
Gli analoghi sottoposti ai saggi di inibizione sono i primi che compongono la serie ed in particolare quelli che presentano il tert-butossicarbonile all'estremità terminale (**63-66**) ed altri tre con la funzione amminica libera (**68-70**).

L'analisi complessiva dei risultati permette di affermare che generalmente l'attività è poco significativa in particolare se comparata ai potenti inibitori di riferimento.

In particolare, l'inibizione delle subunità post-acidica (PGPH) e chimotriptica (ChT-L) è irrilevante alle concentrazioni 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , con minime differenze tra i vari analoghi. Più evidente risulta l'azione nei confronti del subsito catalitico  $\beta 2$  (T-L) anche se ancora sensibilmente inferiore rispetto ai noti composti di confronto epossomicina ed MG132. Si può affermare quindi che l'estensione della coniugazione C-terminale ottenuta mediante l'inserimento di un ciclo isossazolinico tra la leucina e la funzione vinil esterea non permette alla nuova unità farmacoforica un'ottimale interazione con i siti catalitici del proteasoma. I derivati che hanno evidenziato una certa inibizione, anche se molto blanda, nei

confronti dell'attività tripsino-simile sono i composti **65** e **66**, recanti serina e valina in posizione P3 della sequenza. Questo dato conferma, specie per l'analogo **65**, i risultati ottenuti in serie precedenti in cui erano presenti composti attivi e selettivi per la subunità triptica.

Da ricordare che nelle stesse serie precedenti, i componenti dotati di efficace risposta biologica erano quelli aventi il gruppo 3-idrossi-2-metil benzilico (Hmb); per cui una valutazione finale non può prescindere dall'analisi dei dati di inibizione che potranno fornire i composti non ancora testati ed in particolare gli analoghi (**73-77**).



**Figura 47.** Dati di inibizione dei derivati isossazolin, vinil esterei **63-66, 68-70**.

## Conclusioni

La peculiarità dei composti presentati in questa serie è la presenza in posizione C-terminale di un raggruppamento isossazolin, vinil estereo quale unità farmacoforica responsabile dell'interazione primaria con le subunità attive dell'enzima.

Con l'estensione della coniugazione nel farmacoforo abbiamo ideato una struttura molecolare che potesse funzionare ipoteticamente in modo più efficace quale substrato per l'attacco nucleofilo dell'ossidrile in catena laterale della treonina catalitica.

Dati preliminari inerenti la risposta biologica di alcuni analoghi componenti questa nuova serie, hanno evidenziato una capacità di inibizione del proteasoma molto blanda. Solamente alcuni, in particolare i composti **65** e **66**, sono risultati sensibilmente attivi nei confronti della subunità  $\beta 2$  (T-L) seppure con una potenza inferiore rispetto a noti inibitori di riferimento.

Va ricordato comunque che per poter effettuare un'analisi efficace della risposta biologica esplicitata da questa nuova serie di derivati isossazolin, vinil esterei, si deve attendere il completamento dei saggi di inibizione; in particolare degli oligopseudopeptidi funzionalizzati con il gruppo Hmb all'estremità N-terminale.

In base ai risultati ottenuti si potranno proporre opportune modifiche molecolari sulla struttura base, in grado di fornire derivati più attivi nei confronti delle tre subunità catalitiche del complesso enzimatico.

## **CONCLUSIONI GENERALI**

L'importanza della via metabolica ubiquitina-proteasoma (UPS) nei processi biologici intracellulari, rende questo sistema un importante bersaglio per molecole in grado di modularne l'attività.

In particolare, composti in grado di inibire le attività proteolitiche del complesso enzimatico chiamato proteasoma 26S, responsabile della processazione di molte proteine cellulari, possono promuovere lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche nei confronti di importanti patologie come il cancro, processi infiammatori, risposta immune e malattie neurodegenerative.

Innumerevoli sono i derivati, sia sintetici che naturali, in grado di inibire l'attività del complesso enzimatico; alcuni già applicati in studi clinici avanzati oppure già in terapia come il Bortezomib, utilizzato per il trattamento del mieloma multiplo refrattario.

Tuttavia esiste sempre la richiesta di nuovi composti dotati di azione potente, specifica e selettiva nei confronti delle subunità catalitiche del proteasoma con effetti collaterali possibilmente trascurabili.

In questo ambito, durante il periodo di dottorato, mi sono occupato della progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di numerose serie di derivati con struttura a base peptidica, recanti nella porzione C-terminale, un'unità farmacoforica in grado di funzionare da potenziale substrato elettrofilo per l'attacco della treonina catalitica.

In particolare, il mio interesse si è rivolto al disegno di farmacofori carbonilici coniugati con doppi legami, inseriti sia in strutture lineari che cicliche, potenzialmente in grado di subire addizione tipo Michael da parte dell'ossidrile in catena laterale della treonina.

Queste diverse unità farmacoforiche sono sempre legate a sequenze oligopseudopeptidiche in grado di produrre interazioni secondarie con le subunità catalitiche del proteasoma determinando quindi inibizione selettiva.

I risultati di questa ricerca, in alcuni casi, hanno prodotto nuove molecole in grado di inibire selettivamente i subsiti attivi del complesso enzimatico a concentrazioni prevalentemente mM.

Questi risultati potranno permettere la progettazione di nuovi analoghi, sviluppati con l'intento di avere composti con un profilo biologico ottimale e potenzialmente applicabili come farmaci.

## PARTE SPERIMENTALE

### Materiali e metodi

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Kofler (Reicher-Jung, Austria) e non sono stati corretti.

Il potere rotatorio è stato misurato con un polarimetro Perkin-Elmer 241 (Norwalk, CT, USA) avente una cella lunga 10 cm. La concentrazione ed il solvente sono specificati nelle Tavole 1-6.

I pesi molecolari dei prodotti sono stati confermati mediante spettrometro di massa electrospray ZMD MICROMASS 2000.

Gli spettri NMR sono stati registrati con spettrometro Bruker AC200. Gli HPLC analitici sono stati effettuati tramite un cromatografo Beckman dotato di diode array detector. Per l'analisi è stata utilizzata una colonna Kromasil 100-5C18 (250x4.6 mm, dimensioni delle particelle 5  $\mu\text{m}$ ).

I tempi di ritenzione dei composti finali sono stati determinati secondo le seguenti condizioni sperimentali: gradiente lineare da 0 a 100 % di B in 25 minuti ad un flusso di 1 ml/min, dove: A= acqua e B= acetonitrile, entrambi contenenti 0.1 % di TFA (v/v). La purificazione dei composti finali in HPLC preparativo è stata condotta con lo strumento Delta Prep 3000 (Waters, USA) mediante una colonna Delta Pack C-18 300 Å (30x3 cm, 15  $\mu\text{m}$ ). Le condizioni sperimentali ed i solventi usati sono i seguenti: gradiente lineare da 0 a 100 % di B in 25 minuti ad un flusso di 30 ml/min, dove: A= 10 % di acetonitrile in acqua (v/v), B= 60 % di acetonitrile in acqua (v/v), entrambi contenenti 0.1 % di TFA (v/v). Dopo la purificazione tutti i composti hanno dimostrato un grado di purezza superiore al 98 %.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata con lastre di gel di silice F 254 (Merck, Darmstadt, Germania) usando i seguenti eluenti:

A) cloruro di metilene/metanolo/toluene (17: 2: 1).

B) butanolo/acido acetico/acqua (3: 1: 1).

Le cellule utilizzate per la purificazione del proteosoma hanno le seguenti caratteristiche: MINGOZZI LCL. Linee linfoblastoidi Epstein Barr Virus (EBV) positive. Terreno: RPMI 1640 (SIGMA) arricchito con antibiotici (streptomicina e penicillina) e L-Glutamina + 10% Fetal Calf Serum (FCS) + Cyproxim (2.5 mL in 100 mL).

## **Procedure sintetiche generali**

### **1) Serie N-Allil, vinil esterea:**

#### **Condensazione via WSC/HOBt**

Ad 1 mmole di componente carbossilica sciolta in 10 mL di DMF vengono aggiunte 1,1 mmoli di HOBt, 1,1 mmoli di WSC ed 1,1 mmoli di componente aminica. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione per 1 h a 0°C ed overnight a temperatura ambiente. Si evapora la DMF, si riprende il residuo con AcOEt e si lava successivamente con acido citrico 10%, NaHCO<sub>3</sub> 5% e più volte con brine. La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata ed evaporata.

#### **Condensazione via HATU**

Ad una soluzione di 0.5 mmoli di componente carbossilica in 3 mL di DMF vengono aggiunte 0.5 mmoli di HATU, 1 mmole di NMM e 0.5 mmoli di componente amminica a 0°C. Si lascia in agitazione per 24 h a temperatura ambiente. A questo punto si evapora la DMF, si riprende il residuo con 20 mL di acetato d'etile e si lava con acido citrico 10%, NaHCO<sub>3</sub> 5% e brine. La fase organica viene anidrificata, filtrata ed evaporata. Il residuo viene triturato con etere e separato per centrifugazione.

### **Rimozione del Boc**

Il Boc viene rimosso con TFA acquoso 90% per 50 minuti. Dopo evaporazione, il residuo viene triturato con etere etilico più volte e separato per centrifugazione.

### **Preparazione Boc-Leu-al**

L'aldeide della leucina Boc-protetta è stata ottenuta secondo la metodica di Fehrentz e Castro <sup>31</sup> a partire dal Boc-aminoacido, passando attraverso la corrispondente N-metil,N-metossi amide che viene ridotta con LiAlH<sub>4</sub>.

### **Preparazione Boc-Leu-VE tramite reazione di Wittig**

A 2 mmoli di Boc-Leu-al in 10 ml di toluene vengono aggiunte 4 mmoli di [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano e si lascia reagire per overnight a 110°C; successivamente si concentra e la miscela viene direttamente separata su colonna di gel di silice eluendo con etil-acetato/etere di petrolio (1:5).

### **Alchilazione C-terminale di H-Leu-VE**

A 1mmole di H-Leu-VE sciolta in DMF a RT sono state aggiunte 2,2 mmoli di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Mantenendo il sistema in agitazione, dopo 1h, sono state aggiunte 0,8 mmoli di bromuro di allile. La miscela è stata fatta reagire per 1h a 60°C. Terminata la reazione, il solvente è stato evaporato ed il prodotto, ripreso con acetato di etile, è stato lavato con acqua. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato, filtrata ed evaporata. La miscela viene direttamente separata su colonna di gel di silice eluendo con MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:15). Il prodotto si presenta come olio ed è stato caratterizzato:  $[\alpha]_D^{20}$  (c=1, MeOH)= +2.8 ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,85-0,94 (m, 6H); 1.28 (t, 3H); 1.57-1.60 (m, 2H); 1.72-1.81 (m, 1H); 3.40-3.48 (m, 2H); 3.54-3.65 (m, 1H); 4.23 (q, 2H); 5.30-5.55 (m, 2H); 5.71-5.92 (m, 1H); 6.63 (d, J=16.6 Hz, 1H); 6.73 (dd, J=16.5 Hz, 1H).

**Alchilazione N-terminale di H-Leu-Leu-Leu-VE**

Ad 1 mmole di H-Leu-Leu-Leu-VE sciolto in DMF vengono aggiunte 3 mmoli di  $K_2CO_3$  lasciando il sistema in agitazione per 1h. Successivamente si aggiungono 2 mmoli di bromuro di allile ed il tutto viene lasciato reagire overnight a 60°C. Una volta evaporato il solvente, il prodotto è stato ripreso in ACOEt e lavato con acqua. La fase organica è stata quindi anidrificata con solfato di sodio ed evaporata. La miscela è stata purificata mediante HPLC preparativo ad ottenere il composto monoalchilato **5** ed il bisalchilato **9**. Lo pseudotripeptide monoalchilato viene utilizzato anche per ottenere gli analoghi **6-8**.

***<sup>1</sup>H NMR di alcuni derivati N-allil, vinil esterei:***

**HN-(Allil)Leu-Leu-Leu-VE (5):** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.98-1.06 (m, 18H); 1.31 (t, 3H); 1.48-1.53 (m, 2H); 1.60-1.72 (m, 6H); 1.78-1.84 (m, 3H); 3.20-3.25 (m, 2H); 4.11 (q, 1H); 4.23-4.55 (m, 3H); 5.18-5.24 (m, 2H); 5.72-5.80 (m, 1H); 5.99 (d, J=16.4 Hz, 1H); 6.91 (dd, J=16.5 Hz, 1H); 8.11 (br s, 1H).

**N-(Allil)<sub>2</sub>Leu-Leu-Leu-VE (9):** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.99-1.05 (m, 18H); 1.29 (t, 3H); 1.45-1.50 (m, 2H); 1.63-1.75 (m, 6H); 1.82-1.90 (m, 3H); 3.18-3.29 (m, 4H); 4.07 (q, 1H); 4.29-4.53 (m, 3H); 5.09-5.21 (m, 4H); 5.68-5.77 (m, 2H); 5.97 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.93 (dd, J=16.4 Hz, 1H); 8.07 (br s, 1H).

**2) Serie N-acilpirrolica α,β-insatura:****Preparazione di pirrolimetilentrifenilfosforano**

A 25 mmol di N,N'-carbonildiimidazolo in 30 mL di toluene vengono aggiunte 75 mmol di pirrolo e si lascia reagire per 2 ore a 110°C. Si elimina il solvente in pompa meccanica e si tratta il residuo più volte

triturando con etere etilico. L'1,1'-carbonildipirrolo ottenuto viene conservato sotto argon per la preparazione dell'ilide voluta.

Il metilentrifenilfosforano viene ottenuto da una sospensione di 36 mmol di metiltrifenilfosfonio bromuro in THF (15 mL) per aggiunta, a 0°C, di fenil litio in soluzione eterea (36 mmol). La miscela viene agitata per 60 min a 25°C, dopo aver raffreddato a -78°C viene aggiunta una soluzione di 1,1'-carbonildipirrolo (12 mmol) in 18 mL di THF. Si lascia reagire una notte a temperatura ambiente; il trattamento prevede aggiunta di H<sub>2</sub>O ed estrazione per tre volte con AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:1). La fase organica viene lavata con brine e anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Si filtra, si concentra ed il residuo viene purificato per flash cromatografia su colonna di silice eluendo con AcOEt/Etere di petrolio (2:1) ad ottenere l'ilide voluta. Le caratteristiche analitiche sono state confermate mediante NMR e spettrometria di massa.

### **Preparazione di Boc-Leu-VAP**

La reazione di Wittig viene effettuata sospendendo 4 mmol di ilide in 10 mL di toluene ed aggiungendo 3 mmol di Boc-Leu-al. La sospensione viene agitata per 24 ore a 110°C, quindi si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si evapora sotto pressione. Il residuo viene purificato per flash cromatografia su colonna di silice eluendo con AcOEt/Etere di petrolio (1:5). La Boc-Leu-VAP è stata isolata con il 76% di resa: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95 (d, 6H); 1.39-1.47 (m, 19H); 1.63-1.72 (m, 3H); 4.43 (m, 1H); 6.32 (dd, 2H); 6.65 (d, J=16.1 Hz, 1H); 7.09 (dd, J=16.1 Hz, 1H); 7.37 (dd, 2H). M+H<sup>+</sup> = 307.1.

### **Sintesi in fase solida**

La preparazione degli intermedi peptidici N-terminali è stata effettuata utilizzando una resina di Wang a cui è già condensato il residuo N-terminale Fmoc-protetto con un grado di derivatizzazione di 0.7 mmol/gr. La rimozione dello Fmoc viene ottenuta sospendendo la resina per 60 min in una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Dopo aver

lavato più volte la resina con DMF ed etere etilico, la stessa viene sospesa in DMF (5 mL per gr), e per aggiunta di 4 equivalenti di componente carbossilica, WSC ed HOBt si ottiene l'acilazione voluta lasciando reagire la miscela per 8 ore a temperatura ambiente. L'eccesso di reagenti viene eliminato lavando la resina più volte con DMF. Completata la sequenza, la stessa viene rimossa dal supporto solido per trattamento con TFA ed opportuni scavengers per 1 ora a temperatura ambiente. Si filtra la resina, ed il surnatante, dopo evaporazione sotto vuoto, viene trattato con etere etilico; il residuo solido viene separato per centrifugazione e dopo gli opportuni controlli analitici, utilizzato per la condensazione finale via estere attivo con l'unità farmacoforica a completare le strutture desiderate.

### ***<sup>1</sup>H NMR di alcuni derivati N-acilpirrolici $\alpha,\beta$ -insaturi:***

**Hmb-Leu-Leu-Leu-VAP (11):** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.01-1.12 (m, 18H); 1.51 (m, 2H); 1.75-1.79 (m, 4H); 1.83-1.84 (m, 3H); 2.35 (s, 3H); 4.27-4.56 (m, 3H); 5.03 (s, 1H); 6.12 (s, 2H); 6.21 (d, J=16.1 Hz, 1H); 6.63 (s, 2H); 6.74 (t, J=16.2 Hz, 1H); 6.98-7.39 (m, 3H); 8.05 (br s, 3H).

### **3) Serie vinil chetonica:**

#### **Condensazione via Osu**

Si solubilizzano in DMF 10 mmoli degli aminoacidi Boc protetti sulla funzionalità N <sub>$\alpha$</sub> -aminica ed attivati come Osu al C-terminale scelti per la costruzione della sequenza di peptidica. Vengono aggiunte 11 mmoli (1,1 eq) di H-Leu-OH e la miscela viene lasciata in agitazione overnight a RT. Dopo aver evaporato il solvente, il residuo viene ripreso con AcOEt e lavato con acido citrico 10%, NaHCO<sub>3</sub> 5% e brine. La fase organica viene anidrificata e concentrata ad ottenere il dipeptide desiderato.

### **Reazione di Wittig con [(acetil)metiliden]trifenilfosforano**

3 mmoli di Boc-Xaa-Leu-al vengono aggiunte a 4,5 mmoli di [(acetil)metiliden]trifenilfosforano, il tutto viene solubilizzato in circa 15 mL di toluene e lasciato reagire sotto agitazione per una notte a 110°C a refluxo. Si evapora il solvente, si riprende il residuo in AcOEt e si effettuano alcuni lavaggi con acqua e brine. Dopo anidrifcazione e concentrazione della fase organica si effettua una purificazione tramite colonna cromatografica su gel di silice utilizzando una miscela eluente AcOEt/EtPt 1:2. Il farmacoforo, ottenuto con buone rese, viene utilizzato per le condensazioni successive via estere attivo con gli opportuni aminoacidi Boc-protetti a dare i tripeptidi **1** e **6**, che dopo rimozione del gruppo uretanico ed opportune funzionalizzazioni, daranno i composti finali che completano la serie.

### ***<sup>1</sup>H NMR di alcuni derivati vinil chetonici:***

**Boc-Leu-Leu-Leu-VK (16)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\sigma$  1.01–1.12 (m, 18H); 1.50–1.77 (m, 15H); 1.89–1.97 (m, 3H); 2.41 (s, 3H); 4.11 (m, 1H); 4.37–4.49 (m, 2H); 6.18 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.87 (dd, J=16.1 Hz, 1H); 7.36 (br s, 3H).

**Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-Leu-Leu-Leu-VK (19)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\sigma$  0.98–1.08 (m, 18H); 1.27 (m, 2H); 1.50–1.65 (m, 6H); 1.81–1.94 (m, 7H); 2.24 (t, 2H); 2.33 (s, 3H); 2.88 (t, 2H); 4.17 (m, 1H); 4.49–4.60 (m, 2H); 5.18 (s, 2H); 6.21 (d, J=16.4 Hz, 1H); 6.85 (dd, J=16.3 Hz, 1H); 7.11–7.23 (m, 5H); 7.58 (br s, 4H).

**Hmb-Val-Ser-Leu-VK (23)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\sigma$  1.01–1.12 (m, 12H); 1.47 (m, 2H); 1.85 (m, 1H); 2.25 (br s, 1H); 2.34 (s, 3H); 2.45 (s, 3H); 2.83 (m, 1H); 4.10–4.19 (m, 2H); 4.38 (m, 1H); 4.58–4.70 (m, 2H); 5.08 (br s, 1H);

5.97 (d, J=16.0 Hz, 1H); 6.72 (dd, J=16.2 Hz, 1H); 7.05–7.21 (m, 3H); 7.76 (br s, 3H).

**Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CO-Val-Ser-Leu-VK (25)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\sigma$  1.04–1.13 (m, 12H); 1.31-1.42 (m, 6H); 1.55-1.64 (m, 6H); 1.87 (m, 1H); 2.15 (br s, 1H); 2.24 (t, 2H); 2.39 (s, 3H); 2.73 (m, 1H); 3.01 (t, 2H); 4.11 (m, 2H); 4.28 (m, 1H); 4.50-4.59 (m, 2H); 5.37 (s, 2H); 6.07 (d, J=16.3 Hz, 1H); 6.92 (dd, J=16.1 Hz, 1H); 7.09–7.23 (m, 5H); 7.83 (br s, 4H).

#### **4) Serie butadienil, etil esterea retroinvertita:**

##### **Preparazione di Boc-Leu-ammide**

3 mmoli di Boc-Leucina solubilizzate in 10 mL di DMF vengono portate a -20°C. A questa temperatura si aggiungono 431,8  $\mu$ L di isobutil cloroformiato (IBCF) e 462  $\mu$ L di TEA lasciando reagire per 15-20 minuti in modo da attivare la componente carbossilica. Successivamente si insuffla nell'ambiente di reazione NH<sub>3</sub> fino a saturazione e si lascia reagire a temperatura ambiente per una notte. Una volta evaporato il solvente, si riprende con etil-acetato e si effettuano lavaggi della fase organica con acido citrico 10%, NaHCO<sub>3</sub> e brine. Dopo anidrifcazione ed evaporazione del solvente organico si ottiene un solido bianco con rese del 75-80%.

##### **Reazione mediante bis,trifluoroacetossi-iodobenzene**

Si sospendono 1,76 mmoli di Fmoc-Xaa-Leu-CONH<sub>2</sub> in 10 mL di una miscela CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O in rapporto 6:4 in pallone sotto atmosfera di argon. Si aggiungono 2 mmoli di TIB e si lascia reagire a RT per 3-4 ore monitorando la reazione su TLC. Una volta che questa è giunta a completezza si evapora l'acetonitrile e si acidifica il residuo acquoso restante con HCl 2N in modo da precipitare il corrispondente sale cloridrato dell'ammina appena formatasi. Si liofilizza dunque la fase

acquosa e si ricristallizza da EtOH/Et<sub>2</sub>O ottenendo un precipitato bianco.

### **Preparazione del monoestere dell'acido trans, trans muconico**

Si solubilizzano 2 mmoli di acido trans, trans muconico nella minima quantità di EtOH assoluto e si portano a 0°C. Si aggiungono goccia a goccia 2,5 equivalenti di SOCl<sub>2</sub> e si lascia reagire a temperatura ambiente per una notte in modo da formare il diestere. Si evapora l'EtOH, si riprende con etil-acetato e si effettuano lavaggi con NaHCO<sub>3</sub> e brine. Dopo aver anidrificato e concentrato la fase organica si ottiene il doppio estere con rese del 99%.

2 mmoli del diestere vengono poi sciolte in EtOH assoluto, si addiziona 1 equivalente di NaOH 1N e si lascia in agitazione per 1 ora a RT.

Una volta evaporato l'etanolo, si basifica il residuo con NaHCO<sub>3</sub> e si estrae in fase organica per etil-acetato il diestere non reagito. La fase acquosa viene quindi acidificata con acido citrico solido ed estratta nuovamente con AcOEt, che dopo anidificazione per Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporazione porta ad ottenere un solido bianco con rese del 94,5 %.

### ***<sup>1</sup>H NMR di alcuni derivati butadienil, etil esterei retroinvertiti:***

**Z-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CO-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt (43)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): σ 1.01–1.12 (m, 12H); 1.30 (t, 3H); 1.31-1.34 (m, 6H); 1.55-1.58 (m, 4H); 1.73-1.74 (m, 2H); 1.80-1.81 (m, 1H); 2.01 (s, 1H); 2,15-2,18 (t, 2H); 2,65-2,68 (m, 1H); 2,93-2,96 (t, 2H); 3.91-4.16 (m, 2H); 4,19 (q, 2H); 4.52-4.63 (m, 2H); 5.34 (s, 2H); 5,69 (m, 1H); 5,98 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.50 (d, J=16.1 Hz, 1H); 6.95 (dd, J=16.1 Hz, 1H); 7.19-7.25 (m, 5H); 7.41 (dd, J=16.2 Hz, 1H); 8.03-8.10 (br s, 5H).

## **5) Serie divinil chetonica a simmetria C2:**

### **Reazione di Knoevenagel**

L'unità farmacoforica centrale a base vinil chetonica è stata ottenuta mediante la reazione di Knoevenagel tra le aldeidi degli aminoacidi preparate secondo le metodiche già descritte in precedenza ed i rispettivi chetoni: Ciclopentanone, N-metil-4-piperidone, N-benzil-4-piperidone ed N-Phe-amide-4-pieperidone.

1 mmole di chetone viene sciolta in 5 mL di EtOH, si aggiungono 0,1 mmoli di LiOH·H<sub>2</sub>O e si lascia reagire a RT° per 15'. Si aggiungono 2 mmoli delle aldeidi preparate in precedenza e si lascia reagire a RT° overnight. Il solvente viene rimosso per evaporazione, la miscela viene ripresa con 60 mL di AcOEt e lavata con 2 x 20 mL di H<sub>2</sub>O e più volte con brine. La fase organica viene anidrificata per Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata. I prodotti finali sono stati purificati in HPLC preparativo e caratterizzati.

### **Preparazione del sale di N,N-dimetil-4-piperidone ioduro**

10 mmoli di N-metil-4-piperidone vengono sciolte in 30 mL di Et<sub>2</sub>O anidro alle quali si aggiungono 11 mmoli di CH<sub>3</sub>I. Si lascia reagire 2 h a RT° e a Rfx overnight.

Il solido formatosi viene filtrato, lavato con etere etilico e seccato.

Il sale di ammonio ottenuto è stato caratterizzato mediante punto di fusione il cui valore è 186-188°C.

### **Funzionalizzazione del piperidone**

Per la preparazione dell'N-benzil-4-piperidone e dell'N-Phe-amide-4-piperidone, 1 mmole di benzilamina o 1 mmole di H-Phe-NH<sub>2</sub> viene sciolta in 20 mL di EtOH; si aggiungono 0,1 mmoli di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e si lascia reagire a Rfx per 30'.

Si aggiungono 1,5 mmoli del sale N,N-dimetil-4-piperidone ioduro preparato come in precedenza e sciolto nella minima quantità di H<sub>2</sub>O, si lascia reagire per 1 h a Rfx.

Dopo aver evaporato il solvente, si riprende con AcOEt e si lava con brine. La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrata a dare gli intermedi necessari per la preparazione dei prodotti **57-62**.

### **Acetilazione delle funzionalità N<sub>α</sub>-amminiche degli aminoacidi**

Ad 1 mmole dei composti **48,49,50** sciolti in 10 mL di DMF sono stati aggiunti 715 μL di NMM (soluzione 0,25M in DMF) e 2,15 mL di anidride acetica (soluzione 0,5M in DMF). Si lascia reagire in agitazione per 20' a RT°. La DMF viene evaporata e la miscela di reazione, ripresa con AcOEt, viene lavata con Acido Citrico 10% e brine. La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata fino ad ottenere i prodotti grezzi **51,52,53** che sono stati purificati in HPLC preparativo.

### ***<sup>1</sup>H NMR di alcuni derivati divinil chetonici a simmetria C2:***

**Composto (44)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.91-0.92 (m, 12H); 1.41 (s, 18H); 1.48-1.52 (m, 4H); 1.83 (m, 2H); 2.00 (s, 4H); 4.27 (m, J=7.6 Hz, 2H); 6.38 (d, J=8 Hz, 2H); 8.0 (br s, 2H).

**Composto (45)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.39 (s, 18H); 1.47 (s, 4H); 2.93 (m, 4H); 4.66 (dd, 2H); 6.48 (d, 2H); 7.15-7.30 (m, 10H); 8.03 (br s, 2H).

**Composto (47)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2.18 (s, 6H); 2.90 (s, 4H); 6.86-6.88 (d, 2H); 6.99-7.01 (d, 2H); 7.06-7.08 (dd, 2H); 7.60 (s, 2H); 9.52 (s, 2H).

**Composto (54)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2.12 (s, 6H); 2.86 (s, 4H); 4.37 (s, 3H); 6.62-6.66 (d, 2H); 6.89-6.93 (d, 2H); 7.08-7.11 (dd, 2H); 8.02 (s, 2H); 9.69 (s, 2H).

**6) Serie isossazolin, vinil esterea:****Preparazione dell'ossima**

A 14 mmoli di idrossilammina cloridrata sciolte in 80 mL di H<sub>2</sub>O vengono aggiunte goccia a goccia 24 mmoli di NaHCO<sub>3</sub> precedentemente solubilizzate in 20 mL di H<sub>2</sub>O. Si aggiungono poi 14 mmoli di dimetossi-acetaldeide (soluzione acquosa al 60%), 30 mL di Et<sub>2</sub>O e si lascia reagire a RT overnight sotto forte agitazione. La reazione viene controllata su TLC (AcOEt/EtPt 1:1) e la fase acquosa viene estratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata.

**Preparazione di Boc-Leu-Allile**

Si sciolgono 10 mmoli di Boc-Leu-OH in 20 mL di DMF, si aggiungono 20 mmoli di NaHCO<sub>3</sub> e si lascia reagire a RT per 1h. Si aggiungono 15 mmoli di allilbromuro e la miscela viene lasciata in agitazione a RT overnight.

Si evapora la DMF, si riprende con 90 mL di Et<sub>2</sub>O e si effettuano lavaggi con H<sub>2</sub>O e brine. La fase organica viene anidrificata ed evaporata a dare un olio trasparente con buone rese nel range dell'80-85%.

**Reazione di cicloadizione [3+2]**

Si aggiungono 0,07 mL di piridina ad una sospensione di 18,30 mmoli di N-clorosuccinimide in 22 mL di CHCl<sub>3</sub> anidro. Si solubilizzano 14 mmoli di ossima nella minima quantità di CHCl<sub>3</sub> anidro e si aggiungono alla sospensione preparata in precedenza lasciando reagire per 30 minuti a RT. A scomparsa dell' N-clorosuccinimide si aggiungono 2,7 mL di TEA e 18,30 mmoli di Boc-Leu-Allile lasciando la miscela di reazione in agitazione a RT overnight. Successivamente si evapora il solvente, si riprende con AcOEt e si effettuano lavaggi con acido citrico 10%, NaHCO<sub>3</sub> 5% e brine.

Il grezzo di reazione viene purificato in colonna cromatografica utilizzando una miscela eluente AcOEt/EtPt in rapporto 2:5.

### **Rimozione del Boc e ripristino della funzionalità aldeidica**

Il Boc e i gruppi metossilici vengono rimossi in un unico step con TFA acquoso 90% per 50 minuti. Dopo evaporazione, il residuo viene triturato con etere etilico più volte e separato per centrifugazione.

### **Reazione di Wittig**

2 mmoli dell'aldeide, precedentemente trattata con TFA acquoso, vengono solubilizzate in 10 mL di THF anidro, si aggiungono 1,5 eq. di [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano e si lascia reagire a Rfx a 85°C overnight. Si evapora successivamente il THF, si riprende in AcOEt e si effettuano alcuni lavaggi con H<sub>2</sub>O e brine. Il prodotto viene purificato con cromatografia su gel di silice in miscela eluente DCM/MeOH 17:2.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.01-1.03 (m, 6H); 1.27-1.30 (t, 3H); 1.59-1.65 (m, 2H); 1.83 (m, 1H); 2.01 (s, 2H); 2.94-3.17 (dd, 2H); 3.81 (m, 1H); 4.19-4.23 (q, 2H); 4.26 (d, 2H); 4.83 (m, 1H); 6.01 (d, J=16.0 Hz, 1H); 6.30 (d, J=16.1 Hz, 1H).

### **<sup>1</sup>H-NMR di alcuni derivati isossazolin, vinil esterei:**

**Composto (63)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.90-0.95 (m, 12H); 1.27-1.34 (t, 3H); 1.42 (s, 9H); 1.61-1.64 (m, 4H); 1.83 (m, 2H); 2.95-3.18 (dd, 2H); 3.9 (m, 1H); 4.19-4.23 (q, 2H); 4.26 (d, 2H); 4.53 (m, 2H); 6.01 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.30 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.50 (d, 1H); 7.55 (d, 1H).

**Composto (64)** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.85-0.88 (m, 6H); 1.27-1.30 (t, 3H); 1.35 (s, 9H); 1.59-1.64 (m, 2H); 1.83 (m, 1H); 2.94-3.17 (dd, 2H); 3.04-3.08 (d, 2H); 3.8 (m, 1H); 4.19-4.23 (q, 2H); 4.26 (d, 2H); 4.83 (m, 2H);

6.01 (d, J=16.0 Hz, 1H); 6.13 (d, J=16.2 Hz, 1H); 6.50 (d, 1H); 7.22-7.25 (m, 5H); 7.55 (d, 1H).

**Composto (69)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 0.81-0.88 (m, 6H); 1.19-1.26 (t, 3H); 1.59-1.64 (m, 2H); 1.83 (m, 1H); 2.94-3.17 (dd, 2H); 3.04-3.08 (d, 2H); 3.43 (s, 2H); 3.8 (m, 1H); 4.19-4.23 (q, 2H); 4.26 (d, 2H); 4.83 (m, 2H); 6.01 (d, J=16.0 Hz, 1H); 6.13 (d, J=16.1 Hz, 1H); 7.22-7.25 (m, 5H); 8.91 (d, 1H).

**Composto (73)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 0.78-0.88 (m, 12H); 1.20-1.27 (t, 3H); 1.49-1.57 (m, 4H); 1.83 (m, 2H); 2.07 (s, 3H); 2.94-3.17 (dd, 2H); 3.91 (m, 1H); 4.13-4.20 (q, 2H); 4.26 (d, 2H); 4.29 (m, 2H); 5.01 (s, 1H); 6.01 (d, J=16.3 Hz, 1H); 6.30 (d, J=16.1 Hz, 1H); 6.86 (d, 1H); 7.08 (t, 1H); 7.39 (d, 1H); 8.20 (d, 2H).

### **Purificazione dei proteasomi**

Si sospende un pellet di 20x10<sup>6</sup> cellule (variabile a seconda delle esigenze) con tampone Tris-HCl pH 7.4, 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Sucrose 250 mM, Ditiotreitolo (DTT) 1 mM, ATP 2 mM, e un ugual volume di glass beads. Le cellule sono lisate meccanicamente per un tempo complessivo di due minuti in ghiaccio. Si centrifuga a 5000 rpm per 7 minuti a 4°C per eliminare le glass beads, si recupera il surnatante che viene centrifugato a 14000 rpm per 20 minuti a 4°C per due volte. Il surnatante contenente il proteasoma viene conservato a -80°C.

### **Test di attività dei proteasomi**

Questo tipo di esperimento si avvale di substrati fluorogenici specifici per valutare e quantificare le diverse attività del proteasoma. Il

substrato che permette di evidenziare l'attività chimotriptica, dovuta alla subunità  $\beta 5/\beta 5i$ , è formato dalla sequenza N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (SIGMA); per evidenziare l'attività triptica, della subunità  $\beta 2/\beta 2i$ , si utilizza il substrato Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Bachem) mentre l'attività post-acidica viene valutata mediante il substrato Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-metilcumarina (Bachem) <sup>30</sup>. Per questo tipo di test si utilizzano piastre da 96 pozzetti; in ogni pozzetto si piastrano 20  $\mu$ L di proteasoma e 40  $\mu$ L di substrato 100  $\mu$ M diluito in buffer per l'attività dei proteasomi (Tris-HCl pH 7.4, 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 500  $\mu$ M, DTT 1 mM, ATP 2 mM). Come bianco si piastrano 20  $\mu$ L di buffer e 40  $\mu$ L di substrato. La piastra viene lasciata a 37°C per 30 minuti in modo tale che il proteasoma svolga le sue attività tagliando i substrati. Quando il substrato viene tagliato aumenta la fluorescenza emessa dalla coda 7-amido-4-metilcumarina (AMC). La fluorescenza viene rilevata da un fluorimetro che trasforma il segnale luminoso in unità arbitrarie di fluorescenza. Maggiore è il dato registrato maggiore è l'attività mostrata dal proteasoma.

### **Test di inibizione enzimatica**

A 25  $\mu$ L della soluzione del proteasoma purificato, vengono aggiunti 25  $\mu$ L di una soluzione a concentrazioni diverse di inibitore (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M concentrazione finale nel pozzetto di saggio), si lascia incubare per 45 minuti a 37°C e si aggiungono 50  $\mu$ L di substrato (100  $\mu$ M per quanto riguarda i substrati dell'attività triptica e chimotriptica, 200  $\mu$ M per il substrato della post-acidica). Si lascia a 37°C per 30, 60, 120 minuti, ad ogni intervallo di tempo si legge la fluorescenza al fluorimetro. Il non inibito di riferimento si prepara e viene saggiato con la stessa procedura sostituendo i 25  $\mu$ L di soluzione di inibitore con un ugual volume di tampone.

**BIBLIOGRAFIA**

- <sup>1</sup> Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdwl JW, Bennink JR. *J Exp Med* 2001; 193: 1319-26;
- <sup>2</sup> Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. *J Immunol* 2000; 164: 1346-54;
- <sup>3</sup> Boes B, Hengel H, Ruppero T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM. *J Exp Med* 1994; 179: 901-9;
- <sup>4</sup> Mullapudi S, Pullan L, Bishop OT, Khalil H, Stoops JK, Beckmann R, et al. *Biophysical Journal* 2004; 87: 4098-105;
- <sup>5</sup> Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, et al. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 1062-7;
- <sup>6</sup> Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL. *Mol Cell* 1999; 4: 395-402;
- <sup>7</sup> Gaczynska K, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9213-17;
- <sup>8</sup> Huang X, Seifert U, Salzmann U, Henklein P, Preissner R, Henke W, et al. *J Mol Biol* 2002; 323: 771-82;
- <sup>9</sup> Van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, et al. *J Exp Med* 2000; 192: 483-94;
- <sup>10</sup> Rechsteiner M, Hill CP. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 27-33;
- <sup>11</sup> Ben-Neriah Y. *Nat Immunol* 2002; 3: 20-6;
- <sup>12</sup> Ciechanover A. *EMBO Journal* 1998; 17: 7151-60;
- <sup>13</sup> Myung J, Kim KB, Crews CM. *Med Res Rev* 2001; 21: 245-73;
- <sup>14</sup> Miller J, Gordon C. *FEBS Lett* 2005; 579: 3224-30;
- <sup>15</sup> Hershko A. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1191-7;
- <sup>16</sup> Varshavsky A. *Genes Cells* 1997; 2: 13-28;
- <sup>17</sup> Rechsteiner M, Rogers SW. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 267-71;

- <sup>18</sup> Zhou P. *Curr Opin Chem Biol* 2005; 9: 51-5;
- <sup>19</sup> Scheffer M. *Cell* 1990; 63: 1129-1136 ;
- <sup>20</sup> Peter J. Elliot et al. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 637-646;
- <sup>21</sup> Nazif T, Bogyo M. *PNAS* 2001; 98: 2967-2972;
- <sup>22</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Canella A, Gavioli R, De Risi C, Pollini GP, Tomatis R. *J Med Chem* 2004; 47: 1587-1590 ;
- <sup>23</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Cellini S, Gavioli R, Tomatis R. *J Med Chem* 2005; 48: 5038-5042;
- <sup>24</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3125-3130;
- <sup>25</sup> Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 978-984;
- <sup>26</sup> Baldisserotto A, Marastoni M, Trapella C, Gavioli R, Ferretti V, Pretto L, Tomatis R. *Eur J Med Chem* 2007; 42: 586-592;
- <sup>27</sup> Baldisserotto A, Ferretti V, Destro F, Franceschini C, Marastoni M, Gavioli R, Tomatis R. *J Med Chem*. 2010; 53 (17): 6511-5;
- <sup>28</sup> Franceschini C, Trapella C, Sforza F, Gavioli R, Marastoni M. Work accepted by *Journal Of Enzyme Inhibitor And Medicinal Chemistry*;
- <sup>29</sup> Radin NS. *Drug Development Research* 2008; 69: 15-25;
- <sup>30</sup> Radin NS. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 6029-6037;
- <sup>31</sup> Fehrentz JA, Castro B. *Synthesis* 1983; 8: 676-678;
- <sup>32</sup> Gavioli R, Vertuani S, Masucci MG. *Int J Cancer* 2002; 101: 532-38 ;
- <sup>33</sup> Feherentz J.A. et al. *Tetrahedron Lett*. 1994, 35, 9031-9034;
- <sup>34</sup> D.A.Evans, G. Borg, K. A. Scheidt, *Angew. Chem*. 2002;
- <sup>35</sup> S. Matsunaga et al. / *Tetrahedron* 62 (2006) 6630-6639;

<sup>36</sup> Bazzaro M, Anchoori RK, Mudiam MK, Issaenko O, Kumar S, Karanam B, Lin Z, Isaksson Vogel R, Gavioli R, Destro F, Ferretti V, Roden RB, Khan SR. *J Med Chem.* 2011; 54(2): 449-56;

<sup>37</sup> Das U, Pati HN, Sakagami H, Hashimoto K, Kawase M, Balzarini J, De Clercq E, Dimmock JR. *J Med Chem.* 2011; 54(9): 3445-9.