



## UNIVERSITÀ DI PISA

Scuola di Dottorato di Ricerca in  
“Scienza del Farmaco e delle Sostanze Bioattive”

Dottorato di Ricerca in  
“**Scienze del Farmaco e delle Sostanze Bioattive**”  
*XIX CICLO (2004-2006)*

*Progettazione, sintesi e valutazione biologica di nuovi composti  
benzopiranic-4-spirosostituiti come potenziali attivatori dei canali  $K_{ATP}$   
mitocondriali cardiaci.*

CANDIDATO: Federica Tonelli

TUTOR: Prof. A. Balsamo

DIRETTORE DELLA SCUOLA  
(Prof.ssa Claudia Martini)

## **1 CANALI $K_{ATP}$**

I canali ionici sono pori macromolecolari della membrana cellulare che permettono il trasporto passivo degli ioni. I canali del potassio rappresentano uno dei più diversi gruppi di canali ionici esistente nelle cellule eccitabili e non. Essi svolgono importanti funzioni fisiologiche nei processi di comunicazione cellulare che regolano ad esempio il battito cardiaco, la contrazione della muscolatura liscia, la secrezione di insulina e il rilascio di neurotrasmettitori.

La sequenza aminoacidica primaria dell'unità che forma il poro di questi canali ha permesso la classificazione dei canali del potassio in tre principali famiglie: i) voltaggio-dipendenti, contenenti 6 regioni transmembrana con un solo poro; ii) inward rectifiers, contenenti 2 regioni transmembrana con un solo poro; iii) canali a due pori contenenti 4 regioni transmembrana.

Tra le varie tipologie di canali del potassio, una molto importante è rappresentata dai canali ATP-dipendenti ( $K_{ATP}$ ), così chiamati in quanto la loro apertura è regolata dalle variazioni della concentrazione intracellulare di ATP. Questi canali quindi associano l'energia della cellula con il suo stato metabolico.

I canali  $K_{ATP}$  sono stati identificati in molti tessuti tra cui il cuore, le cellule muscolari, le cellule  $\beta$  del pancreas, e alcune cellule neuronali. La loro attività è regolata dal metabolismo cellulare, pertanto questi canali accoppiano l'attività elettrica della cellula con il suo stato metabolico: l'apertura dei canali  $K_{ATP}$  iperpolarizza la membrana plasmatica e riduce l'eccitabilità elettrica della cellula.<sup>1</sup>

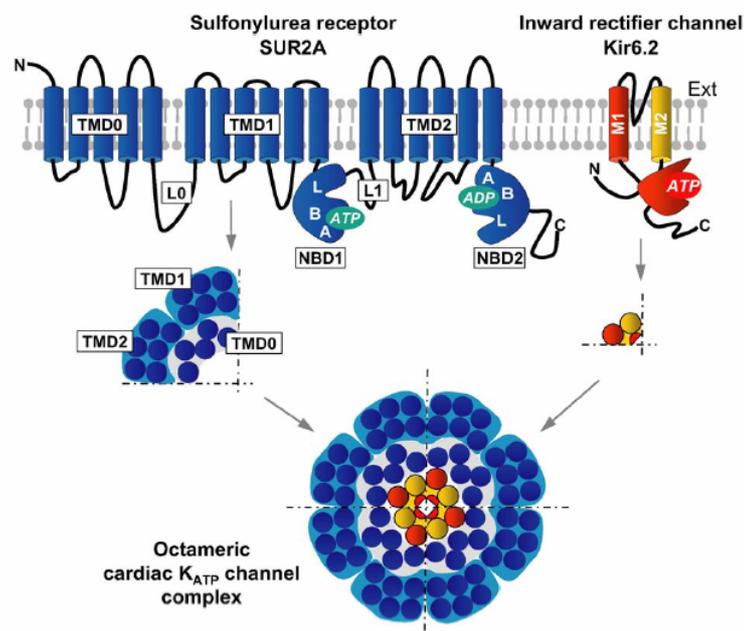
Nel pancreas i canali  $K_{ATP}$  permettono la secrezione di insulina in risposta ad un aumento della concentrazione plasmatica di glucosio<sup>2</sup>; nel cuore questi canali svolgono una funzione protettiva in risposta a ipossia o ischemia, e recenti studi hanno permesso di ipotizzare che siano coinvolti anche in altre situazioni di stress metabolico, come ad esempio l'esercizio fisico.

Nel sistema nervoso centrale i canali  $K_{ATP}$  sembrano avere una funzione protettiva simile a quella del cuore, e sono anche coinvolti nel controllo dei livelli di glucosio nel sangue. L'apertura dei canali  $K_{ATP}$  nelle cellule muscolari lisce provoca vasorilasciamento, inoltre essi contribuiscono al mantenimento del tono muscolare in molti tessuti. Nei muscoli scheletrici i canali  $K_{ATP}$  giocano un ruolo importante sia durante lo sforzo fisico che nell'uptake di glucosio.<sup>3</sup>

## 1.1 Topologia

I canali  $K_{ATP}$  sono complessi ottameric<sup>4</sup> costituiti da due differenti subunità proteiche: quattro canali al potassio formanti il poro, associati con quattro proteine regolatrici, i recettori per le sulfoniluree (SUR). Le subunità che formano il poro sono canali al potassio a corrente invertita (Kir); l'inversione di corrente è rappresentato da un aumento del flusso di ioni all'interno piuttosto che all'esterno ad un dato potenziale di membrana. Sono state individuate sette sottofamiglie Kir (1.0-7.0); quelle dei canali  $K_{ATP}$  appartengono alla sottofamiglia 6.0. Le subunità Kir possiedono due segmenti transmembranali,  $M_1$  e  $M_2$ , uniti da una regione extracellulare che determina la selettività per il  $K^+$  attraverso un residuo di glicina-tirosina, che è sostituito da glicina-fenilalanina nel sottotipo 6.0. Le estremità N e C sono entrambe intracellulari.

La subunità regolatoria SUR appartiene alla superfamiglia ABC (ATP-binding cassette)<sup>5</sup>, e possiede 17 segmenti transmembrana (TM) arrangiati in un dominio di cinque segmenti (TMD0) e due domini di sei segmenti ciascuno (TMD1 e TMD2), uniti tra loro da due larghi loops intracellulari. La subunità SUR1 è altamente espressa nelle cellule pancreatiche mentre la SUR2 è altamente espressa nelle cellule cardiache e nel muscolo scheletrico.



**Figura 1.1** Struttura molecolare dei canali  $K_{ATP}$

Esistono molte isoforme, in cui diverse subunità Kir e SUR si combinano variamente per dare canali  $K_{ATP}$  che differiscono per la loro sensibilità farmacologica e la loro localizzazione (**tabella 1.1**).

	<b>Subunità Kir</b>	<b>Subunità SUR</b>
Pancreas	Kir 6.2	SUR1
Neuroni	Kir 6.2	SUR1
Muscolo cardiaco	Kir 6.2	SUR2A
Muscolo scheletrico	Kir 6.2	SUR2A
Muscolo liscio	Kir 6.2	SUR2B

**Tabella 1.1** Isoforme dei canali  $K_{ATP}$

## 1.2 Regolazione

L'adenosina trifosfato (ATP) e i nucleotidi difosfato (NDPs) rappresentano i due principali fattori capaci di regolare il flusso ionico attraverso i canali del potassio.<sup>6</sup> L'attività dei canali  $K_{ATP}$  è inibita dall'aumento della concentrazione intracellulare di ATP, mentre basse concentrazioni di nucleotide portano alla loro apertura. La sensibilità all'ATP varia a seconda dei tessuti, ma è in genere nell'ordine del micromolare. La capacità di alcuni analoghi non idrolizzabili dell'ATP di inibire i canali al potassio è la dimostrazione che l'inibizione non richiede la fosforilazione o l'idrolisi dell'ATP, ma è dovuta al semplice legame del nucleotide stesso al canale, anche se l'esatto numero di molecole di ATP necessarie all'inibizione non è conosciuto. L'ATP può inibire il canale  $K_{ATP}$  sottoforma di acido libero ( $ATP^{4-}$ ) o di complesso con il  $Mg^{++}$  (MgATP). La maggiore capacità di inibire il canale ionico di una forma rispetto all'altra dipende dal tessuto preso in esame; nel muscolo cardiaco, ad esempio, le due forme ( $ATP^{4-}$  e MgATP) sono equipotenti.<sup>7</sup>

La localizzazione del sito di legame dell'ATP è oggetto di controversie. La presenza di due siti di binding per i nucleotidi sulla subunità SUR e la mancanza di tali siti sulla subunità Kir favorisce l'ipotesi che la chiusura del canale richieda il legame dell'ATP alla subunità SUR. La presenza di questo legame è stata dimostrata con l'utilizzo di ATP radiomarcato.<sup>8</sup> Esistono però evidenze sperimentali che indicano che l'azione inibitoria dell'ATP è mediata invece dall'interazione con la subunità Kir. È stato infatti dimostrato che mutazioni della subunità Kir inducono una marcata diminuzione della sensibilità per l'ATP, mentre mutazioni a livello della subunità SUR influenzano solo moderatamente l'inibizione dell'ATP.<sup>9</sup> Questi dati sperimentali

indicano che il sito di legame dell'ATP è situato sulla subunità Kir, mentre la subunità SUR ne aumenta la sensibilità.

In assenza di ATP i canali  $K_{ATP}$  possono perdere la loro attività ("rundown"), che può però essere ristabilita attraverso vari meccanismi, come le reazioni di fosforilazione/defosforilazione e il disaccoppiamento dei canali  $K_{ATP}$  dal citoscheletro di actina.<sup>10</sup>

I nucleotidi difosfato come ADP o GDP hanno due effetti opposti sull'attività dei canali  $K_{ATP}$ : inibizione e attivazione.<sup>11</sup> Quest'ultima richiede la presenza di ioni magnesio: in assenza di  $Mg^{2+}$ , l'ADP è un debole inibitore dei canali  $K_{ATP}$  paragonato all'ATP. Questi effetti inibitori coinvolgono probabilmente un'interazione con la subunità Kir6.2.

L'attività del canale può essere modulata oltre che dai nucleotidi anche da altri fattori, tra i quali gli ormoni (somatostatina), il pH, l'ossido nitrico (NO), gli acidi grassi, l'adenosina, l'acetilcolina, le endoteline e il polipeptide intestinale vasoattivo.

L'interazione con appropriati recettori associati a proteine G provoca il rilascio di GDP e stimola il legame del GTP. Alcuni mediatori come l'acetilcolina e l'adenosina interagiscono con la proteina G inibitoria ( $G_i$ ) aumentando la probabilità di apertura dei canali  $K_{ATP}$ . L'adenosina, attraverso il sottotipo recettoriale  $A_1$ , può anche attivare la proteina chinasi C (PKC), che a sua volta potrebbe attivare i canali  $K_{ATP}$  riducendo la sensibilità per l'ATP a livello del sito inibitorio. Anche la proteina chinasi A (PKA) è in grado di modulare l'attività dei canali  $K_{ATP}$ ; questo enzima sembra infatti capace di aprire i canali  $K_{ATP}$  in seguito all'interazione dell'adenosina con il sottotipo recettoriale  $A_2$ .

### 1.3 Modulazione farmacologica dei canali $K_{ATP}$

I canali  $K_{ATP}$  hanno numerose proprietà farmacologiche: sono selettivamente inibiti dalle sulfoniluree, farmaci antidiabetici come la glibenclamide e la tolbutamide, e sono attivati da una classe di farmaci vasorilascianti, tra cui il pinacidil, il nicorandil e il cromakalim, comunemente denominati attivatori dei canali del potassio (KCOs).

Allo scopo di determinare i principi farmacologici dell'apertura dei canali  $K_{ATP}$ , la caratterizzazione farmacologica dei KCOs è stata limitata a studi in vitro su tessuti isolati<sup>12</sup> e studi in vivo usando ratti spontaneamente ipertesi. Alla fine degli anni '90 lo sviluppo di KCOs marcati e i progressi nelle tecniche di biologia molecolare hanno permesso la caratterizzazione dei KCOs a livello molecolare attraverso studi di binding in preparazioni di canali sia nativi che ricostituiti.<sup>13</sup>

### 1.3.1 Studi in vitro su tessuti isolati

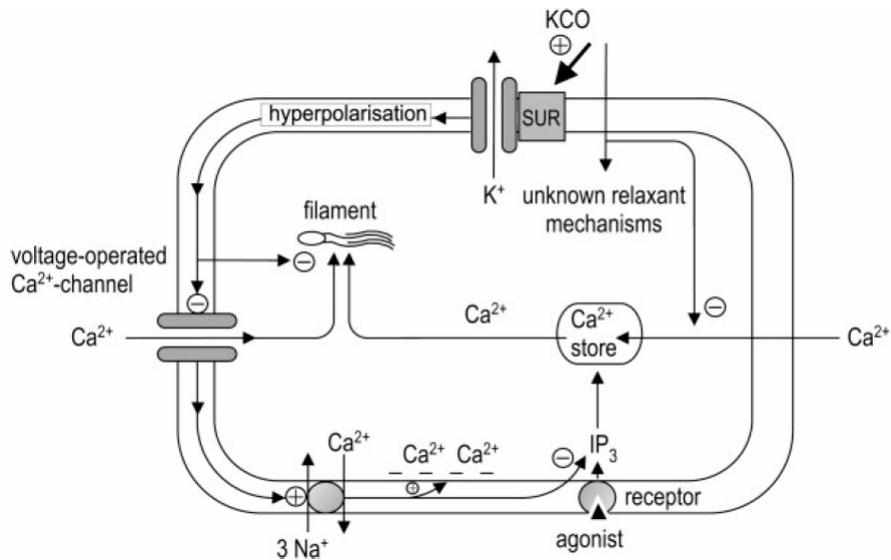
Gli studi in vitro sulle proprietà farmacologiche dei KCOs si sono principalmente focalizzati sulle cellule muscolari lisce dei vasi, nei quali i canali  $K_{ATP}$  rivestono un ruolo significativo nella regolazione del tono basale.<sup>14</sup> Un'elevata quantità di mediatori fisiologici regola l'attività del canale. Vasodilatatori come la calcitonina, l'adenosina e le prostacicline attivano i canali  $K_{ATP}$  attraverso una serie di reazioni mediate dalla proteina chinasi A; alcuni vasocostrittori come la 5-idrossitriptamina (5-HT), la noradrenalina e la vasopressina, inibiscono i canali  $K_{ATP}$  mediante reazioni associate alla proteina chinasi C.

Nei tessuti muscolari lisci isolati, per attribuire l'attività di KCO ad un composto sono stati identificati i seguenti criteri<sup>12</sup>:

1. il legame dei KCOs alla proteina canale crea una corrente di  $K^+$  in uscita, ed una conseguente iperpolarizzazione della membrana cellulare;
2. l'interazione dei KCOs alla proteina canale rallenta le contrazioni indotte dal  $K^+$  solo quando la concentrazione di ioni  $K^+$  è bassa (fino a 20 mM), ma non quando è maggiore di 50 mM.
3. gli effetti indotti dai KCOs sono inibiti dalla glibenclamide a concentrazioni submicromolari.

L'iperpolarizzazione di membrana indotta dai KCOs previene l'ingresso di ioni calcio attraverso i canali voltaggio-dipendenti. Inizialmente i KCOs erano visti come calcio-antagonisti indiretti, e si pensava che avessero lo stesso profilo farmacologico delle diidropiridine. Tuttavia, i KCOs inibiscono anche le contrazioni che sono insensibili ai derivati diidropiridinici.<sup>1</sup> Nell'aorta di ratto, le contrazioni indotte dalla noradrenalina dipendono dalla mobilizzazione di calcio intracellulare; in questo sistema i calcio antagonisti come la nifedipina mostrano solo una marginale efficacia vasodilatatoria, mentre un attivatore dei canali  $K_{ATP}$  come il cromakalim inibisce completamente le contrazioni dovute alla noradrenalina.<sup>15</sup> Pertanto, i KCOs influenzano le contrazioni delle cellule muscolari lisce con meccanismi alternativi oltre a quello di prevenire l'apertura dei canali del  $Ca^{2+}$ .

Il probabile meccanismo vasorilasciante è schematizzato in **figura 1.2** e può essere così riassunto<sup>12</sup>: l'iperpolarizzazione indotta dai KCOs, inibisce la mobilitazione di calcio dovuta al legame degli agonisti con i loro recettori, interferendo con la sintesi di inositolo trifosfato ( $IP_3$ ), e riduce la sensibilità al calcio di tutto il sistema. Possibili conseguenze sono un aumento dell'estrusione di ioni calcio dalla cellula e un aumento del legame del  $Ca^{2+}$  sulla superficie interna della membrana cellulare. L'inibizione del ripristino dei livelli intracellulari di calcio rappresenta un possibile meccanismo di vasodilatazione non collegato con l'iperpolarizzazione.



**Figura 1.2** Possibili meccanismi vasodilatanti dei KCOs.

### 1.3.2 Studi in vivo

Gli effetti antiipertensivi dei KCOs sono stati studiati in ratti spontaneamente ipertesi. La diminuzione dei livelli pressori indotta dai KCOs si manifesta rapidamente e raggiunge la massima efficacia approssimativamente 20 minuti dopo la somministrazione orale. La durata d'azione è di circa 3-4 ore.<sup>16</sup>

Le riduzioni della pressione arteriosa da parte di vasodilatatori diretti sono di solito accompagnate da un'attivazione riflessa del sistema nervoso simpatico, e portano ad esempio a tachicardia e aumento dell'attività della renina. Per minimizzare tali effetti, intense ricerche sono state dedicate allo sviluppo di KCOs con una lenta comparsa d'azione e una lunga durata dell'effetto antiipertensivo.

### 1.3.3 Studi di binding

Studi di binding hanno evidenziato l'esistenza di diversi siti di legame per i KCOs, e la capacità dei nucleotidi di variare sia la loro potenza che la loro efficacia tramite interazioni allosteriche:

- un'interazione allosterica positiva fra i nucleotidi e i KCOs consente a questi farmaci di avere un'elevata affinità di legame per la subunità SUR. I KCOs aumentano l'attività ATPasica della subunità SUR promuovendo l'attivazione dei canali;
- un'interazione allosterica negativa tra i nucleotidi e il legame dei derivati sulfonilureici;

- un accoppiamento allosterico negativo fra il legame dei KCOs e quello dei derivati sulfonilureici, che sottintende un legame reciprocamente esclusivo di questi ligandi alla subunità SUR.

I primi studi avevano mostrato le differenze tra i vari siti di binding dei KCOs nelle preparazioni di muscolo liscio. La glibenclamide, ad esempio, inibiva il composto P1075 marcato ( $pK_i = 6.4$ ), ma non era in grado di inibire gli effetti del cromakalim marcato.<sup>17</sup>

Solo recentemente è stata possibile la caratterizzazione dei siti di binding in preparazioni di membrana native e in subunità SUR eterologhe. Il composto P1075 marcato si lega con alta affinità alle subunità SUR2A e SUR2B, ma non alla SUR1. I rappresentanti delle maggiori classi di KCOs sono in grado di rompere il legame di P1075 marcato da queste subunità; inoltre la maggior parte dei KCOs presenta una maggiore affinità per la subunità SUR2B che per la SUR2A.

In alcuni studi l'affinità dei KCOs osservata per le subunità SUR2A e SUR2B clonate risultava simile a quella misurata nei tessuti nativi, favorendo l'ipotesi che il legame del farmaco non venga influenzato dalla presenza o meno della subunità formante il poro. In contrasto, alcuni ricercatori<sup>18</sup> hanno riportato che il composto KCO912 interagisce molto meglio con i canali nativi dell'aorta di ratto rispetto alla subunità SUR2B isolata. Inoltre, confrontando le affinità del composto P1075 marcato con subunità clonate o in preparazioni native, è stata osservata una affinità 2-3 volte inferiore nelle SUR clonate, rafforzando così l'ipotesi che la subunità Kir possa modulare l'affinità dei KCOs per la subunità SUR.

Il prerequisito necessario per gli studi di binding che utilizzano sia preparazioni native di membrana che subunità SUR2B clonate, è rappresentato dal fatto che il legame dei KCOs è osservabile solo in presenza di MgATP.<sup>19</sup> I nucleotidi infatti influenzano fortemente la potenza e l'efficacia dei modulatori dei canali  $K_{ATP}$  attraverso varie modulazioni allosteriche.

Alcuni esperimenti mostrano che l'MgATP facilita il legame del P1075 marcato attraverso i due siti di legame per i nucleotidi (NBFs) presenti sulla subunità SUR. È sufficiente mutare un singolo NBF per abolire il legame di P1075, quindi entrambi gli NBFs sembrano partecipare all'azione modulatoria di MgATP. Altri Mg-nucleotide trifosfato (GTP, CTP, UTP) e difosfato (ADP e GDP) modulano il legame di P1075 marcato alla subunità SUR2B.

Gli effetti modulatori di MgADP sono diversi per la subunità SUR2A e per quella SUR2B: il complesso MgADP aumenta il legame alla SUR2A e inibisce fortemente quello alla SUR2B.

## 1.4 I canali $K_{ATP}$ nella muscolatura liscia vascolare

I canali  $K_{ATP}$  sono stati descritti in un'ampia varietà di tessuti, in particolare sulla muscolatura liscia, dove modulano la contrattilità attraverso variazioni del potenziale di membrana. La loro attivazione, fisiologica o indotta da ligandi farmacologici, porta all'iperpolarizzazione della membrana e al rilasciamento muscolare. I canali  $K_{ATP}$  della muscolatura liscia vascolare sono quelli maggiormente studiati, e attualmente costituiscono il principale target terapeutico degli attivatori dei canali  $K_{ATP}$  (KCOs).<sup>3</sup>

La natura molecolare dei canali  $K_{ATP}$  vascolari è meno definita di quella dei canali  $K_{ATP}$  presenti nelle cellule pancreatiche o cardiache. I canali  $K_{ATP}$  vascolari mostrano una diversa sensibilità ai KCOs rispetto a quelli pancreatici o cardiaci, i quali sono attivati da pinacidil, levcromakalim e diazossido, e mostrano anche una forte sensibilità per i nucleotidi difosfato.

Molti vasodilatatori attivano i canali  $K_{ATP}$  e causano iperpolarizzazione di membrana; ne risulta una diminuzione nella probabilità di apertura dei canali al calcio voltaggio-dipendenti, che contribuisce all'azione vasorilasciante.<sup>20</sup> Analogamente questo avviene per i canali presenti in altri tessuti (vedi paragrafo sulla regolazione).

In conclusione, sembra che tutte questi processi servano a mantenere un'attività basale dei canali per ridurre le resistenze vascolari e contribuire al mantenimento del flusso sanguigno, e che un'ulteriore attivazione dei canali  $K_{ATP}$  contribuisca ad aumentare il flusso sanguigno in risposta ad un'aumentata esigenza metabolica tissutale.<sup>3</sup>

## 1.5 Canali $K_{ATP}$ della muscolatura liscia non-vascolare

### 1.5.1 Vescica urinaria

I canali  $K_{ATP}$  sono espressi nelle cellule muscolari lisce della vescica, e possono essere attivati da diversi KCOs. L'attivazione farmacologica di una piccolissima porzione della popolazione totale di canali  $K_{ATP}$  porta ad una significativa inibizione dell'eccitabilità elettrica, ed a contrazioni fasciche della vescica.<sup>21</sup> I canali  $K_{ATP}$  giocano quindi un ruolo chiave nella regolazione del potenziale di membrana delle cellule vescicali, della loro eccitabilità e contrazione; la modulazione dei canali  $K_{ATP}$  rappresenta perciò un potente mezzo per controllare la funzionalità contrattile della vescica. Grazie al potenziale terapeutico dei canali  $K_{ATP}$  nel trattamento dell'incontinenza urinaria, la ricerca si è rivolta allo sviluppo di KCOs selettivi per i canali  $K_{ATP}$  della vescica.

### 1.5.2 Tratto gastrointestinale

Studi sulla muscolatura liscia intestinale hanno mostrato la capacità rilasciante dei KCOs anche in questo tessuto; è stato inoltre osservato che la glibenclamide riduce la conduttanza basale del potassio e provoca depolarizzazione e aumento della durata del potenziale d'azione. Questo suggerisce che i canali  $K_{ATP}$  contribuiscono al ripristino del potenziale di membrana delle cellule intestinali, e quindi alla regolazione della loro eccitabilità e contrattilità.<sup>22</sup>

### 1.5.3 Vie aeree

Esistono pochi studi sul ruolo fisiologico dei canali  $K_{ATP}$  nella muscolatura liscia bronchiale, ma è noto che la stimolazione muscarinica inibisce la corrente di  $K^+$ , mediante l'attivazione della PKC nelle cellule della trachea, e ciò è in accordo con il ruolo dei canali  $K_{ATP}$  nella modulazione del potenziale di membrana e della contrattilità delle vie aeree.<sup>23</sup> Un'ampia varietà di KCOs risulta capace di rilasciare la muscolatura bronchiale sia in vitro che in vivo, indicando la presenza di una significativa popolazione di canali  $K_{ATP}$ . Gli attivatori dei canali  $K_{ATP}$  rappresentano potenziali farmaci per il trattamento dell'ipercontrattilità delle vie aeree.

### 1.5.4 Muscolo cardiaco

I canali  $K_{ATP}$  sono stati descritti per la prima volta nella membrana plasmatica dei miociti ventricolari cardiaci<sup>24</sup>: studi più recenti hanno permesso la classificazione dei canali  $K_{ATP}$  cardiaci in sarcolemmatici ( $sarcK_{ATP}$ ) e mitocondriali ( $mitoK_{ATP}$ ), presenti nella membrana mitocondriale interna delle stesse cellule. I canali  $K_{ATP}$  cardiaci si chiudono in presenza di concentrazioni fisiologiche di ATP intracellulare, e si aprono quando i livelli di ATP diminuiscono. Nella cellula cardiaca questi canali hanno la funzione di proteggere la cellula da un sovraccarico di calcio durante ipossia prolungata, e pertanto rappresentano potenziali target per agenti terapeutici in grado di proteggere il cuore dal danno ischemico. I canali  $K_{ATP}$  cardiaci sono infatti coinvolti in un meccanismo fisiologico per cui brevi episodi di ischemia/riperfusion rendono il cuore più resistente nei confronti di un successivo evento ischemico prolungato: tale fenomeno è noto come preconditionamento ischemico<sup>25</sup> e verrà descritto dettagliatamente in seguito.

I canali  $K_{ATP}$  cardiaci sono costituiti da subunità Kir6.2 e SUR2A, si aprono in assenza di ATP e si chiudono in presenza di concentrazioni micromolari di ATP. I canali sarcolemmatici sono attivati da molti KCOs come il pinacidil, il cromakalim, l'aprikalim e il nicorandil, ma non dal

diazossido. L'apertura dei canali  $\text{sarcK}_{ATP}$  da parte di questi farmaci in condizioni fisiologiche ha un effetto inotropo negativo dovuto alla riduzione della durata del potenziale d'azione cardiaco.

La sensibilità dei canali  $K_{ATP}$  all'ATP è modulata da altri fattori intracellulari, che potrebbero essere alterati durante l'ischemia. Per esempio, la sensibilità dei canali è diminuita da nucleotidi difosfato (ADP, GDP, UDP) e dall'acidosi, condizioni che si ritrovano nelle cellule miocardiche ischemiche. I canali  $\text{sarcK}_{ATP}$  cardiaci sono regolati anche dalla fosforilazione da parte della PKC, che aumenta la loro attività in presenza di livelli millimolari di ATP. I canali  $\text{sarcK}_{ATP}$  sono inoltre accoppiati con le funzioni mitocondriali, così che variazioni nella produzione mitocondriale di ATP sono rapidamente convertite in cambiamenti nei livelli sub-sarcolemmali di nucleotide.<sup>26</sup>

Basandosi sull'elevata conduttanza dei canali  $\text{sarcK}_{ATP}$  e sul loro alto livello di espressione nei miociti cardiaci, alcuni ricercatori<sup>27</sup> hanno calcolato che l'apertura di meno dell'1% dei canali sarebbe sufficiente a causare una riduzione del 50% della durata del potenziale d'azione cardiaco. Per capire come l'apertura dei canali  $\text{sarcK}_{ATP}$  e il risultante aumento della corrente di  $K^+$  possa portare alla protezione cellulare, è necessario rivedere la natura cellulare del danno da ischemia/riperfusione. Questo è particolarmente importante, in quanto la cellula miocardica subisce una sequenza di eventi durante l'ischemia che la "preparano" all'insulto, il quale poi viene effettivamente evidenziato durante la riperfusione. Tra questi eventi, alcuni sono influenzati dall'eccitabilità elettrica e dal potenziale di membrana della cellula, e sono quindi modulati dall'apertura dei canali  $K_{ATP}$ .

La cascata di eventi innescati dalla riperfusione, e che provocano la distruzione delle funzioni mitocondriali, è incentrata sull'aumento della disponibilità di ATP e sul sovraccarico di ioni  $Ca^{2+}$ . Questo dà inizio ad una grave ipercontrazione, che porta alla apertura dei pori di permeabilità mitocondriali, e quindi al danno a livello del mitocondrio.<sup>28</sup>

Affinché i KCOs siano in grado di preservare la funzionalità cardiaca durante l'ischemia e la riperfusione, essi devono essere capaci di ridurre l'accumulo di calcio e/o di modulare la risposta metabolica dei mitocondri alla riperfusione. Oltre ai canali  $K_{ATP}$  sarcolemmatici, le cellule cardiache possiedono un secondo tipo di canali  $K_{ATP}$  nella membrana mitocondriale interna, che sembrano essere responsabili della protezione della funzionalità dei mitocondri durante le fasi di ischemia e riperfusione, e che verranno discussi più avanti.

#### 1.5.4.1 Coinvolgimento dei canali $\text{sarcK}_{ATP}$ nell'adattamento allo stress

Sembra improbabile che i canali  $K_{ATP}$  cardiaci svolgano la loro principale funzione solo in condizioni patologiche come l'ischemia, e infatti recentemente è stato individuato il loro ruolo fisiologico.<sup>29</sup> L'adattamento fisiologico a situazioni di forte stress è caratterizzato da un aumento

dei livelli di catecolamine, che consentono di migliorare la capacità di sopportare uno sforzo fisico. L'incremento delle catecolamine circolanti è responsabile del mantenimento dell'attività cardiaca anche in condizioni di iperkaliemia indotta dallo sforzo, che altrimenti potrebbe portare a significative disfunzioni elettriche.<sup>30</sup>

D'altra parte, alti livelli di stimolazione adrenergica (catecolamine circolanti e noradrenalina rilasciata dai neuroni) possono essere deleteri, portando ad accumulo di  $Ca^{++}$  e aritmie.<sup>31</sup> Comunque, la risposta adattativa fisiologica di un individuo sano allo stress indica che la normale funzionalità cardiaca non è compromessa, e le cellule mantengono i loro normali meccanismi omeostatici.

Sebbene i canali  $sarcK_{ATP}$  siano chiusi in condizioni fisiologiche, un recente studio su topi privi della subunità Kir6.2 ha suggerito il coinvolgimento di tale subunità nella risposta adattativa allo stress.<sup>29</sup> I topi privi della subunità Kir6.2 mostravano una significativa riduzione della tolleranza allo stress legato all'esercizio fisico; ciò potrebbe essere dovuto all'incapacità di ridurre la durata del potenziale d'azione per mezzo dei canali  $sarcK_{ATP}$ , con conseguente perdita dell'omeostasi del calcio. Inoltre, una forte stimolazione adrenergica con l'isoprenalina porta ad una mortalità del 70% nei topi privi della Kir6.2, rispetto alla sopravvivenza del 100% nei topi normali, e questa mortalità risulta abolita dal verapamil, un bloccante dei canali del  $Ca^{++}$ .

### 1.5.5 Muscolo scheletrico

Molte delle proprietà dei canali  $K_{ATP}$  presenti nelle cellule dei muscoli scheletrici, come l'inibizione da parte dell'ATP o l'attivazione da parte dell'adenosina e dei KCOs, sono simili a quelle dei canali sarcolemmatici cardiaci, tuttavia la composizione molecolare precisa dei canali  $K_{ATP}$  muscolari non è ancora stata determinata.

I muscoli scheletrici subiscono forti cambiamenti metabolici a seconda dell'attività che svolgono. I canali  $K_{ATP}$  sono quasi totalmente chiusi a riposo, ma si aprono durante uno sforzo in risposta a variazioni metaboliche.<sup>32</sup> Il ruolo fisiologico dei canali  $K_{ATP}$  durante l'esercizio fisico è stato determinato studiando l'effetto del loro blocco da parte della glibenclamide o della loro attivazione da parte dei KCOs. Sebbene la glibenclamide sia in grado di influenzare il potenziale di membrana durante uno sforzo, il blocco dei canali  $K_{ATP}$  non causa un decremento della forza contrattile durante l'affaticamento.<sup>33</sup>

L'apertura farmacologica dei canali  $K_{ATP}$  dei muscoli scheletrici ha un effetto addizionale durante lo sforzo, in quanto riduce la forza contrattile, l'ampiezza e la durata del potenziale

d'azione, e aumenta la velocità della sua scomparsa durante lo sforzo, mantenendo costanti i livelli di ATP e migliorando il recupero dopo la fatica.

### 1.5.6 Canali $K_{ATP}$ nel sistema nervoso

I canali  $K_{ATP}$  sarcolemmatici sono localizzati in tutto il sistema nervoso, inclusa la substantia nigra,<sup>34</sup> la corteccia,<sup>35</sup> l'ippocampo e l'ipotalamo,<sup>36</sup> e le fibre nervose periferiche.<sup>37</sup>

Per quanto riguarda i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali, è stato ipotizzato che i mitocondri cerebrali ne contengano addirittura un numero maggiore rispetto al cuore o al fegato.<sup>38</sup> Nel sistema nervoso centrale e periferico questi canali controllano diversi processi fisiologici, come la protezione dei neuroni, il rilascio di neurotrasmettitori, la propagazione dell'impulso, la percezione del dolore e la secrezione ormonale. La natura molecolare di questi canali sembra essere varia: in molte regioni del cervello sono stati identificati canali costituiti da subunità Kir6.2/SUR1, ma anche da subunità Kir6.1 e SUR2.<sup>39,40</sup>

#### 1.5.6.1 Danno da ischemia/riperfusion e protezione neuronale

Sebbene il fenomeno del preconditionamento ischemico sia stato identificato inizialmente nel cuore, esso non è limitato alle cellule miocardiche, infatti è stato osservato anche nel cervello di ratto, dove episodi ischemici sub-letali proteggono le cellule dell'ippocampo da un danno ischemico prolungato.<sup>41</sup>

Il meccanismo di protezione ha molte caratteristiche simili a quello che avviene nel cuore, in quanto coinvolge l'attivazione del recettore  $A_1$  dell'adenosina, la proteina chinasi C (PKC) e l'apertura dei canali  $K_{ATP}$ . Il diazossido, che ha effetti cardioprotettivi marcati che mimano il preconditionamento, è risultato efficace anche nel proteggere i neuroni, sebbene ancora una volta il meccanismo preciso non sia stato chiarito. Il diazossido riduce l'entità dell'infarto nella corteccia soggetta ad occlusione dell'arteria cerebrale, e in colture di neuroni dell'ippocampo depolarizza i mitocondri, previene il rilascio di citocromo c e la morte cellulare durante l'ipossia.<sup>42</sup>

I canali  $K_{ATP}$  sono anche largamente espressi nel sistema nervoso periferico e sono presenti nei neuroni pre- e post-sinaptici delle fibre simpatiche. L'apertura dei canali  $K_{ATP}$  presenti in questi neuroni modula il rilascio di noradrenalina. Durante l'ischemia, nel cuore si verifica un aumento di questo neurotrasmettitore, che è piuttosto dannoso in quanto porta all'attivazione dei canali del  $Ca^{++}$  e aumenta il rischio di aritmie associate all'accumulo di questo ione. Alcuni studiosi hanno suggerito che l'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  neuronali durante l'ischemia possa invece ridurre il rilascio di noradrenalina e quindi ridurre il sovraccarico di ioni calcio; questo potrebbe in ultima analisi essere un meccanismo alternativo per il preconditionamento.

## 1.6 Canali $K_{ATP}$ mitocondriali

Il canali  $K_{ATP}$  mitocondriali (mito $K_{ATP}$ ) furono inizialmente identificati in mitocondri di fegato di ratto attraverso studi di patch-clamp.<sup>43</sup> In contrasto con le precise informazioni strutturali sui canali  $K_{ATP}$  “classici”, la composizione dettagliata dei canali mito $K_{ATP}$  rimane al momento sconosciuta. Basandosi sulle analogie tra i canali  $K_{ATP}$  sarcolemmatici e quelli mitocondriali, è stato ipotizzato che anche questi ultimi siano composti da subunità Kir e SUR; tuttavia per i canali mito $K_{ATP}$  manca ancora una precisa caratterizzazione molecolare.

Essi sono regolati in modo complesso da metaboliti e farmaci e, a differenza di quelli sarcolemmatici, la presenza di ioni  $Mg^{2+}$  è fondamentale per l'attività. L'ATP, l'ADP e gli esteri dell'acilCoA sono tra loro inibitori competitivi del flusso di potassio mitocondriale: questo tipo di inibizione è antagonizzata competitivamente dai nucleotidi guanosidici. Il GTP è in grado di legarsi ad un sito ad alta affinità e ad uno a bassa affinità mentre il GDP si lega a due siti a bassa affinità.<sup>44</sup>

Inizialmente la funzione dei canali mito $K_{ATP}$  sembrava essere legata alla modulazione del volume della matrice mitocondriale piuttosto che all'attività elettrica. Infatti un eccessivo influsso di ioni potassio all'interno del mitocondrio, seguito dal conseguente ingresso di acqua, porta al rigonfiamento della matrice e, se non regolato, alla rottura della membrana mitocondriale.

L'apertura dei canali mito $K_{ATP}$  porta ad una serie di processi, come la depolarizzazione della membrana, il rigonfiamento della matrice, il rallentamento nella sintesi di ATP e l'aumento della respirazione cellulare. I canali mito $K_{ATP}$  rivestono un ruolo centrale anche nel meccanismo di cardioprotezione fisiologico del preconditionamento ischemico.

### 1.6.1 Ruolo fisiologico dei canali mito $K_{ATP}$ nel cuore

Il fenomeno del preconditionamento ischemico è presente in moltissime specie, anche in quelle generalmente non soggette a disturbi del cuore ischemico. Pertanto è improbabile che questo processo si sia sviluppato solo per creare resistenza nei confronti dell'ischemia e che la protezione sia una conseguenza dovuta all'innescamento di normali risposte fisiologiche.

È importante quindi capire il meccanismo attraverso il quale i canali mito $K_{ATP}$  partecipano alla normale fisiologia del mitocondrio. A questi canali sono stati assegnati molteplici ruoli nella fisiologia della cellula, ad esempio fornire un efficace trasferimento di energia, impedire il sovraccarico di calcio e prevenire l'apoptosi. Tutti questi processi derivano da eventi diretti a carico

del mitocondrio. Gli effetti fisiologici principali dell'apertura dei canali mito $K_{ATP}$  in condizioni normali sono:

1. aumento del volume della matrice;
  2. alcalinizzazione della matrice;
- 
1. Durante l'ischemia, la matrice si contrae a causa della diminuzione del potenziale d'azione di membrana. Ciò causa un aumento dello spazio tra la membrana esterna e quella interna del mitocondrio, con conseguente aumento della permeabilità della membrana esterna all'ADP e all'ATP, e successiva idrolisi di ATP. L'apertura dei canali mito $K_{ATP}$  aumenta la conduttanza al  $K^+$ , per compensare l'abbassamento del gradiente elettrico, mantenendo così il volume della matrice praticamente costante. L'apertura dei canali mito $K_{ATP}$  riduce quindi l'idrolisi di ATP durante l'evento ischemico.
  2. Dato che il trasporto totale di ioni deve essere elettricamente neutro, l'influsso di  $K^+$  viene esattamente bilanciato da un efflusso di  $H^+$  tramite una pompa scambiatrice  $K^+/H^+$ . Se questa pompa fosse l'unico sistema a funzionare, lo scambio  $K^+/H^+$  porterebbe ad un innalzamento del pH intracellulare. In realtà la perdita di protoni è compensata da un ingresso di acido fosforico elettricamente neutro, anche se tale compensazione è solo parziale, e ne risulta comunque una alcalinizzazione della matrice.

Recenti studi indicano anche che questi canali giocano un ruolo importante nei processi di trascrizione del segnale che portano alla crescita cellulare, e che in tali processi le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono il ruolo di secondi messaggeri.

## Bibliografia

1. Mannhold R. *Med. Res. Rev.* 2004, 24, 213-266
2. Proks P., Lippiat J.D. *Curr. Phar. Des.*
3. Rodrigo G.C., Standen N.B. *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11, 1915-1940
4. Shyng S.L., Nichols C.G. *J. Gen. Physiol.* 1997, 110
5. Higgins C.F. *Cell.* 1995, 82, 693-696
6. Ashcroft F.M., Gribble F.M. *Trends Neurosci.* 1998, 21, 288-294
7. Terzic A., Jahangir A., Kurachi Y. *Am. J. Physiol.* 1995, C525-C545
8. Ueda K., Inagaki N., Seino S. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 22983-22986
9. Gribble F.M., Tucker S.J. Ashcroft F.M., *EMBO J.* 1997, 16, 1145-1152
10. Furukawa et al. *Pflugers Arch.* 1996, 431, 504-512
11. Tung R., Kurachi Y. *J. Physiol.* 1991, 437, 239-256
12. Quast U. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14, 332-337
13. Gribble F.M., Reimann F. *Biochem. Soc. Trans.* 2000, 30, 333-335
14. Xu X., Lee K.S. *Pflugers Arch.* 1994, 427, 110-120
15. Bray K.M., et al. *Br. J. Pharmacol.* 1991, 102, 337-344
16. Paciorek K. et al. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990, 15, 188-197
17. Howlett D.R., Longman S.D. *Br. J. Pharmacol.* 1992, 107, 396P
18. Buchheit K.H. et al. *Naunyn-Shmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2002, 365, 220-230
19. Hambrock A. et al. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 125, 577-583
20. Quayle J.M., Nelson M.T., Standen N.B. *Physiol. Rev.* 1997, 77, 1165-1232
21. Petkov G.V. et al. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, R1427-R1433
22. Koh S.D. et al. *Biophys. J.* 1998, 75, 1793-1800
23. Nuttle L.C., Farley J.M. *Am. J. Physiol.* 1997, 273, L478-L484
24. Noma A. *Nature* 1983, 305, 147-148
25. Cole W.C. et al. *Circ. Res.* 1991, 69, 571-581
26. Sasaki N. et al. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, H1882-H1888
27. Nichols C.G., Lederer W.J. *Am. J. Physiol.* 1991, 261, H1675-H1686
28. Halestrap A.P. et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1366, 79-94
29. Zingman L.V. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 13278-13283
30. Paterson D.J. et al. *J. Appl. Physiol.* 1992, 73, 1413-1418
31. Todd G.L. et al. *Cardiovasc. Res.* 1986, 20, 645-651
32. Light P.E. et al. *J. Physiol.* 1994, 475, 495-507
33. Matar W. et al. *Am. J. Physiol.* 2000, 278, C404-C416
34. Roper J., Ashcroft F.M. *Pflugers Arch.* 1995, 430, 44-54
35. Ohno-Shosaku T., Yamamoto C. *Pflugers Arch.* 1992, 422, 260-266
36. Reshef A., Sperling O., Zoref-Shani E. *Pharmacol. Ther.* 2000, 87, 151-159
37. Dunn.Meynell A.A et al. *Brain Res.* 1998, 814, 41-54
38. Bajgar R. et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 33369-33374
39. Liss B., Roeper J. *Mol. Membr. Biol.* 2001, 18, 117-127
40. Karashin C. et al. *FEBS Lett.* 1997, 401, 59-64
41. Nishi S. et al. *Brain Res.* 1993, 615, 281-288
42. Liu D et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 431-443
43. Inooue I. et al. *Nature* 1991, 352, 244-247
44. Pauceck P., Yarov-Yarovoy V., Sun X., Garlid K.D. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 32084-32088

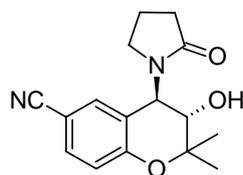
## 2. ATTIVATORI DEI CANALI $K_{ATP}$ (KCOs)

### 2.1 KCOs di prima generazione

I ligandi dei canali ionici in genere esibiscono una pronunciata diversità chimica, e questo vale anche per gli attivatori dei canali  $K_{ATP}$ , che comprendono differenti classi strutturali; quelli cosiddetti di “prima generazione”, i primi ad essere sviluppati, comprendono i benzopirani, le cianoguanidine, le tioformammidi, le tiadiazine e i piridilnitrati. Successivamente sono stati sintetizzati nuovi composti, migliori dal punto di vista dell’attività e della selettività; questi vengono definiti di seconda generazione, e includono i ciclobutenedioni, i derivati delle diidropiridine e i carbinoli terziari.

#### 2.1.1 Benzopirani

I KCOs benzopirani mostrano un largo spettro di modificazioni chimiche e rappresentano la classe di KCOs più conosciuta e studiata. Il capostipite di questa classe è il cromakalim,<sup>1</sup> sviluppato negli anni '80 in Inghilterra. Il cromakalim contiene due centri stereogenici, i carboni 3 e 4: l’attività di KCO risiede nell’enantiomero 3*S*,4*R*- detto levcromakalim (**1**).

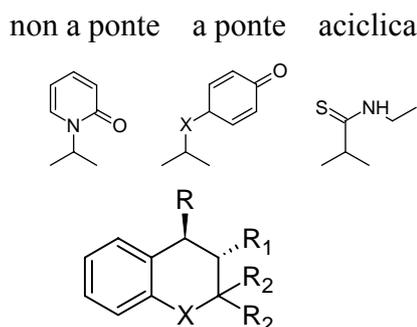


levcromakalim **1**

##### 2.1.1.1 Variazioni in posizione 4

La posizione 4 è forse quella più studiata, e le maggiori modificazioni chimiche comprendono (**figura 2.1**):

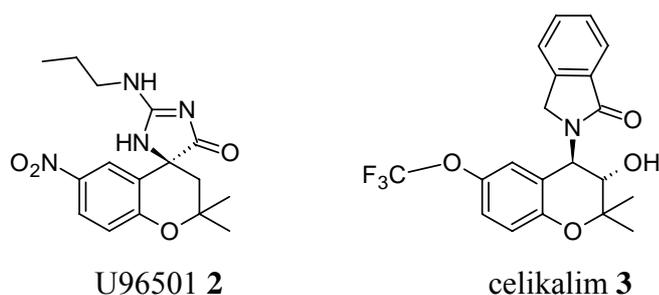
- sostituenti ciclici non- “a ponte”
- sostituenti ciclici “a ponte”
- sostituenti aciclici



**Figura 2.1:** rappresentazione dei vari tipi di sostituzione effettuati in posizione 4 sui KCOs a struttura benzopiranic.

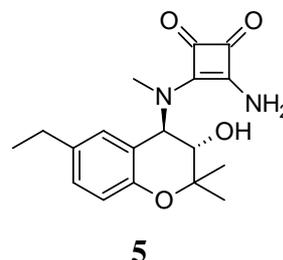
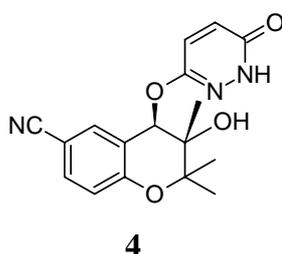
La grandezza dell'anello nei sostituenti ciclici non a ponte ha un forte impatto sulla potenza: i cicli a 6 termini presentano una potenza superiore rispetto a quelli a 5 termini, i quali a loro volta sono più potenti degli anelli a 4, 7 e 8 membri.<sup>2</sup> Anche la sostituzione con gruppi biciclici riduce la potenza, ma un'eccezione è rappresentata dal celikalim (**3**), che ha la stessa potenza vasorelasciante del cromakalim, ma ha una comparsa d'azione più lenta e una maggiore durata d'azione.<sup>3</sup>

Informazioni importanti riguardanti la conformazione bioattiva dei benzopirani sono state ottenute con composti spirociclici come U96501 (**2**). Analisi ai raggi X hanno rivelato che nell'eutomero il gruppo carbonilico è rivolto verso il basso rispetto al piano del nucleo benzopiranic. Questo rafforza l'ipotesi che la conformazione bioattiva dei composti in cui c'è libera rotazione al C4 presenti la stessa ortogonalità.<sup>4</sup>

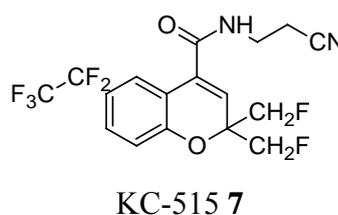
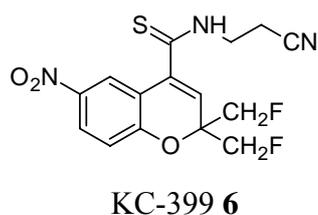


Legare il sostituito ciclico in posizione 4 all'anello benzopiranic attraverso un ponte amminico o etereo (composti **4** e **5**) spesso conferisce una migliore potenza. I rapporti attività-struttura dei benzopirani con sostituenti a ponte sono diversi dagli analoghi non- a ponte.<sup>5</sup> La posizione del gruppo carbonilico non è essenziale, e l'ossigeno carbonilico è spesso sostituito da un azoto appartenente ad un ciclo.

L'introduzione di un metile in posizione 3 è dannoso per i composti non-a ponte, ma vantaggioso per quelli a ponte, in quanto probabilmente stabilizza la loro conformazione bioattiva.

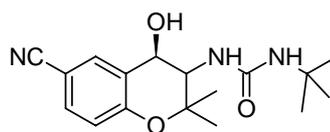


L'introduzione di sostituenti aciclici al posto dell'originario anello lattamico è stato l'approccio più efficace per ottenere nuove potenti strutture; la classe delle tioammidi è particolarmente interessante e comprende derivati molto attivi come ad esempio KC-399 (**6**), il quale possiede un gruppo *N*-β-cianoetilico legato alla funzione tioammidica e un'insolita sostituzione, con due gruppi fluorometilici, in posizione 2. KC-399 è circa 100 volte più potente del levromakalim, e mostra un effetto antiipertensivo lento e duraturo, con riduzione della tachicardia riflessa.<sup>6</sup> Un profilo farmacologico simile è descritto per il composto KC-515 (**7**), analogo di **6**. Questo composto possiede un sostituito carbossamidico in 4 e un gruppo pentafluoroetilico in posizione 6 al posto del nitro gruppo. Il composto è di circa 1.5 unità logaritmiche meno potente di KC-399 nei test in vitro, indicando la superiorità del sostituito carbottioammidico.



### 2.1.1.2 Variazioni in posizione 3

La maggior parte dei benzopirani non sono sostituiti o hanno un gruppo idrossilico in posizione 3, e la sostituzione del gruppo OH in genere diminuisce la potenza antiipertensiva. Composti che, al posto del OH, presentano un gruppo CHO o CH<sub>2</sub>OH, mantengono una moderata attività, mentre la sostituzione con un atomo di bromo o con un metile porta a scomparsa dell'attività.<sup>7</sup> Alcuni autori hanno studiato la possibilità di scambiare la posizione 3 con la 4: un esempio è il composto **8**, che ha una potenza circa paragonabile al cromakalim.

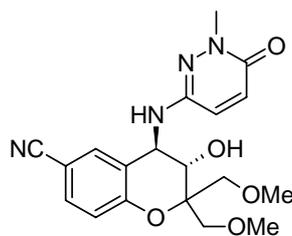
**8**

L'importanza del gruppo OH è tuttavia ambigua. La presenza di tale gruppo nel levromakalim aumenta la potenza di 15 volte rispetto all'analogo non sostituito,<sup>8</sup> tuttavia composti come KC-399 (**6**), che mancano del sostituito in C3 sono molto più potenti del levromakalim. Quindi è improbabile pensare che sia il gruppo idrossilico stesso ad interagire con il sito d'azione. È più probabile che il sostituito OH in 3 serva a stabilizzare la conformazione bioattiva. Infatti solo in presenza dell'idrossile in 3 si osserva un significativo rapporto eudismico nel cromakalim, mentre in assenza di tale gruppo la differenza nell'attività dei due enantiomeri è marginale.<sup>8</sup>

### 2.1.1.3 Variazioni in posizione 2

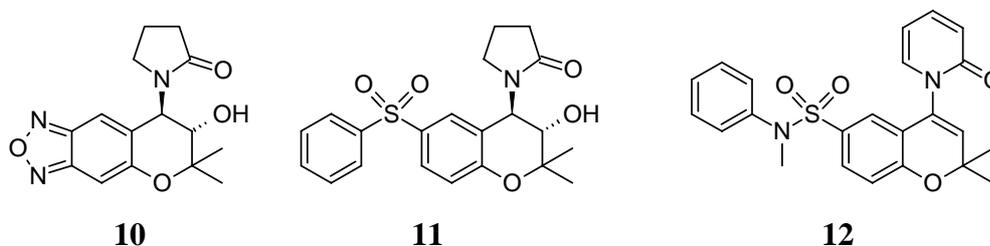
I sostituenti in posizione 2 influenzano in modo diverso la potenza dei KCO a seconda della natura del sostituito in posizione 4. Per il cromakalim la sostituzione ottimale è attribuita al gruppo dimetilico, che risulta migliore di un solo metile e molto superiore al gruppo dietilico. Il diidroderivato risulta praticamente privo di attività.<sup>9</sup> Tuttavia in una serie di benzopirano-4-carbottioammidi, sostituenti più ingombranti risultano positivi: in particolare composti che presentano gruppi spiro-ciclobutilici o ciclopentilici in posizione 2 sono tra i derivati più potenti.

La sostituzione con due gruppi metossimetilici conferisce una selettiva vasodilatazione coronaria in vivo: il composto JTV-506 (**9**) provoca un aumento del 100% del flusso coronario con solo il 5% di riduzione della pressione arteriosa.<sup>10</sup>

**JTV-506 9**

#### 2.1.1.4 Variazione della porzione aromatica

La posizione e la natura dei sostituenti aromatici mostrano una forte influenza sull'attività di questa classe di KCOs (composti **10-12**).<sup>11</sup> La posizione 6 è migliore della 7, mentre la sostituzione in 5 e in 8 abolisce completamente l'attività. Recenti studi attribuiscono l'attività ottimale a piccoli gruppi elettronegativi, con il seguente andamento: NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, CN, OCF<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>5</sub> > MeCO > CHO > H. Recentemente è stato osservato che anche gruppi arilsolfonammidici conferiscono una elevata potenza. Da studi conformazionali e di SAR è stato ipotizzato che questi sostituenti solfonammidici estendano il sito di legame dei KCOs benzopiranic: oltre ad un sito che interagisce con il gruppo parzialmente polarizzato SO<sub>2</sub>, ci potrebbe essere un piccolo sito che permette interazioni  $\pi$  favorevoli con la porzione fenilica.<sup>12</sup>



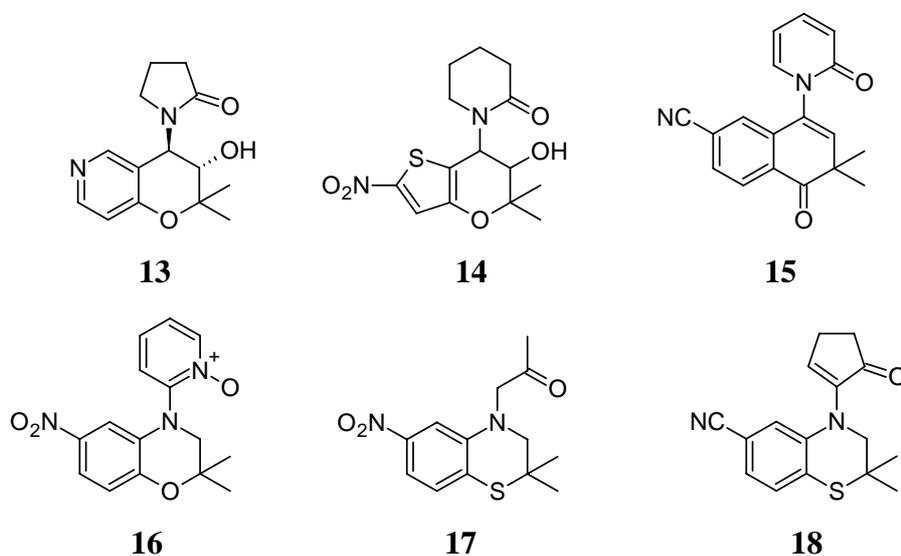
#### 2.1.1.5 Trasformazioni del nucleo benzopiranic

Il sito di legame per i benzopirani consente modificazioni sia dell'anello aromatico che di quello piranico. Un gruppo piridile può sostituire la porzione cianofenilica, come nel composto **13** (**schema 2.1**); l'azoto deve essere in posizione 6 o 7, mentre se si trova in posizione 5 o 8 l'attività diminuisce.<sup>11</sup> Un'altra sostituzione favorevole è rappresentata dall'anello tiofenico nel composto **14**.

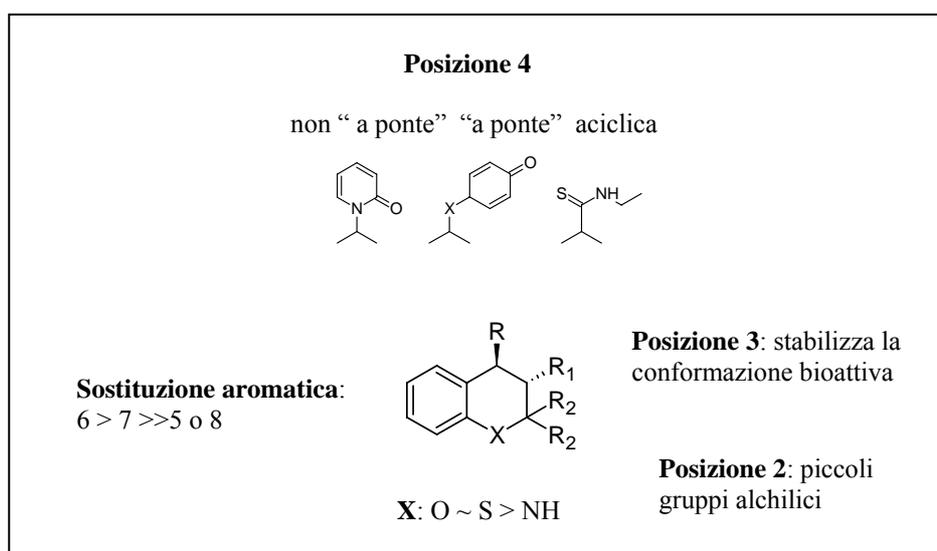
La sostituzione dell'anello piranico spesso porta a composti solo moderatamente attivi. L'introduzione di un NH o CH<sub>2</sub> riduce l'attività di 10 volte rispetto al cromakalim, mentre se l'ossigeno viene sostituito con un atomo di zolfo la potenza si mantiene pressoché uguale; tuttavia l'ossidazione a solfossido o a solfone è deleteria.<sup>13</sup> I derivati dialchilnaftalenonici come il composto **15** sono da sottolineare, in quanto alcuni sono selettivi per i canali K<sub>ATP</sub> della trachea.

Sostituzioni vantaggiose dell'anello piranico comprendono le 1,4-benzossazine, come il composto **16**, che è un potente vasodilatatore, con attività pronunciata particolarmente sulle arterie coronarie.<sup>14</sup> La migliore sostituzione dell'anello piranico è stata però trovata con i derivati

benzotiazinici (**17** e **18**), i quali hanno azione vasorilasciante, nell'ordine del sub-nanomolare, sia in vitro che in vivo.



**Schema 2.1:** strutture di KCOs con varie sostituzioni del nucleo benzopiranoico.

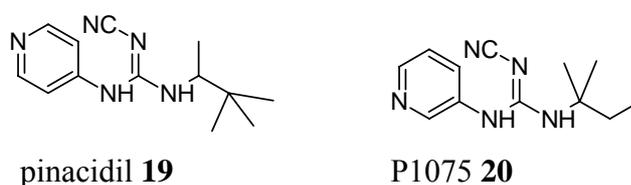


**Figura 2.2:** SAR dei KCOs di tipo benzopiranoico di prima generazione.

### 2.1.2 Cianoguanidine

Il pinacidil (**19**) è il prototipo dei KCOs cianoguanidinici: è stato prodotto da una serie di piridiltiuree con note proprietà ipotensive, e la sua attività risiede nell'enantiomero R-(-).<sup>15</sup>

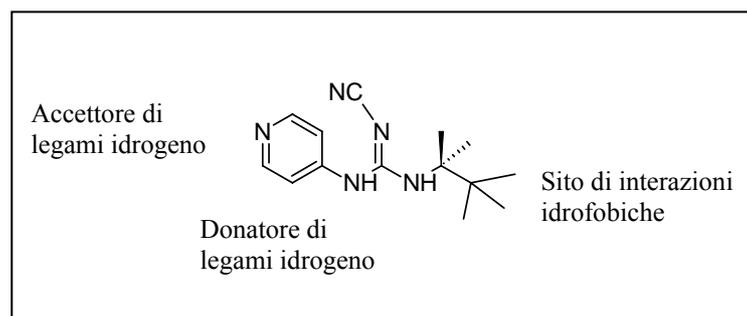
I primi studi di SAR su derivati del pinacidil si sono basati su dati in vivo ottenuti su ratti spontaneamente ipertesi. I derivati 3-piridilici come P1075 (**20**) sono più potenti dei corrispondenti 4-piridinici, ad eccezione del pinacidil stesso. Nella porzione centrale, la catena cianoguanidinica si è rivelata migliore della tiourea e molto superiore all'urea. Lo scambio del gruppo ciano con altri gruppi polari porta invariabilmente a composti privi di attività. Nella parte terminale della catena lipofila sono ottimali gruppi alchilici piccoli e ramificati.<sup>15</sup>



Molti studi farmacologici<sup>16</sup> mostrano che il pinacidil è in grado di rilasciare i vasi sanguigni con un meccanismo addizionale indipendente dall'apertura dei canali  $K_{ATP}$ ; quindi i valori di pressione sanguigna non sono molto affidabili per affrontare studi di SAR che spieghino le proprietà di KCO delle cianoguanidine. Di conseguenza alcuni ricercatori<sup>17</sup> hanno effettuato misurazioni dell'attività miogenica spontanea per verificare l'attività di KCOs di una serie di derivati tipo pinacidil a struttura cianoguanidinica, nitroeten-diaminica, tioureaica ed ureica.

Da questi studi è poi stato sviluppato un modello farmacoforico, che comprende le seguenti interazioni recettoriali:

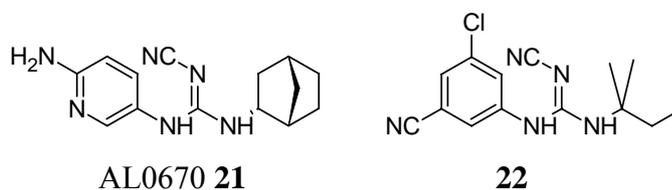
- ✓ un sito donatore di legami ad idrogeno, rappresentato dall'NH legato al gruppo piridile;
- ✓ un sito accettare di legami ad idrogeno, rappresentato dall'azoto piridinico;
- ✓ un sito di interazioni idrofobiche, rappresentato dalla catena alchilica laterale.



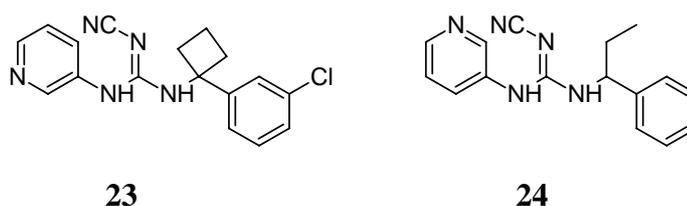
**Figura 2.3:** Modello farmacoforico per i KCOs di tipo cianoguanidinico.

La posizione del sostituente sull'anello piridinico nei derivati cianoguanidinici e tioureici non influenza significativamente la potenza in vitro, ma la massima risposta ipotensiva si ottiene con la sostituzione in C6. Il gruppo NH<sub>2</sub> si è dimostrato il migliore, mentre sostituenti ingombranti sono deleteri. In accordo con i dati in letteratura, i derivati cianoguanidinici sono superiori agli analoghi tioureici. Porzioni cicliche più rigide, come nel caso del derivato norbornilico (**21**), che presenta un norbornano nella regione lipofila terminale, sono migliori rispetto alla catena alchilica.<sup>18</sup>

Gli studi di SAR per le cianoguanidine fenil sostituite indicano che sostituenti elettronattrattori in posizione 3 e gruppi lipofili in posizione 5 (come nel composto **22**) forniscono la migliore attività di vasorilasciamento della muscolatura liscia. Inoltre, i dati mostrano che l'anello piridinico non è essenziale per il legame ai canali K<sub>ATP</sub> e che l'azoto legato all'anello e la catena lipofila terminale sono requisiti sufficienti.<sup>19</sup>



I composti **23** e **24** (schema 2.2) meritano di essere menzionati in quanto presentano un'attività di tipo bloccante sui canali K<sub>ATP</sub>. La loro principale differenza rispetto ai composti descritti precedentemente è data dalla presenza di un anello fenilico sulla catena terminale. Questi composti antagonizzano il rilasciamento indotto dal pinacidil. Per gli analoghi racemi, l'attività bloccante era stata attribuita all'enantiomero *S*. Attraverso esperimenti di patch-clamp e di binding con il composto **24**, alcuni studiosi hanno dimostrato per la prima volta un comportamento opposto: l'attività bloccante è attribuita all'enantiomero *R*, mentre l'*S* è un debole attivatore. Gli autori hanno ipotizzato che non sia l'attività del ligando di per sé, ma che siano la capacità di modulare il legame dell'ATP al canale e l'attività ATPasica della subunità SUR a determinare le proprietà bloccanti o attivanti di un ligando.<sup>20</sup>

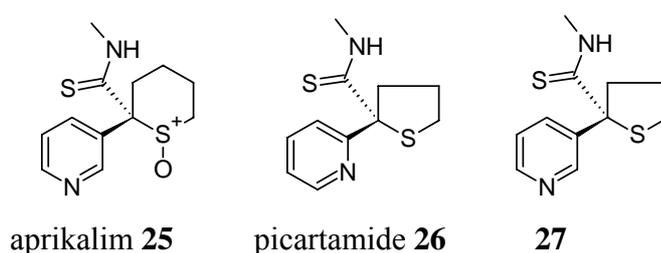


**Schema 2.2:** cianoguanidine ad attività bloccante.

### 2.1.3 Tioformammidi

Il prototipo dei KCO di tipo tioformammidico è l'aprikalim (**25**, **schema 2.3**): i precursori di questo composto sono i derivati tioamidici di tetraidrotiofene, tetraidrofurano, 1,3-ossatiano o 1,3-ditiano con note proprietà anti-ulcera e anti-secretorie, e recanti una porzione piridilica in posizione 2.

La picartamide **26**, ha mostrato un'attività anti-ulcera 10 volte superiore alla cimetidina. La picartamide e una serie di suoi derivati sono stati sottoposti a numerosi test per valutarne il profilo biologico, e il derivato **27** ha mostrato una marcata attività anti-ipertensiva, mentre è inattivo come anti-ulcera. L'effetto ipotensivo è stato attribuito al metabolita di ossidazione, cioè al solfossido.



**Schema 2.3:** KCOs a struttura tioformammidica.

Gli studi di SAR si riferiscono principalmente alle tre porzioni più importanti: la funzione tioamidica, l'eterociclo aromatico e l'eterociclo saturo.<sup>21</sup>

#### 2.1.3.1 Funzione tioamidica

In questa regione della molecola sono permesse solo pochissime modificazioni. La preferenza per piccoli gruppi alchilici indica la presenza di una tasca idrofobica ristretta sul sito recettoriale. I gruppi migliori sono l'etile o il propile, ma il butile o il fenile sono ancora di dimensioni accettabili. L'enorme perdita di attività che si verifica quando si sostituisce la tioamide con un'ammide sottolinea i precisi requisiti strutturali necessari per l'interazione in questa parte della molecola.

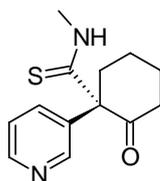
#### 2.1.3.2 Gruppo eterociclico aromatico

La posizione dell'azoto nell'anello piridinico ha un forte impatto sulla potenza, come dimostrato dalla drastica perdita di attività dei derivati 2 e 4 sostituiti. Questo può essere compensato da un'adeguata sostituzione con gruppi elettronattrattori: il derivato 3,4-dicloro sostituito mostra l'attività migliore. Particolarmente interessante è il fatto che il gruppo 3-chinolil sia migliore del 3-piridile, e il 2-naftil meglio del fenile. Questo dimostra una buona tolleranza

nell'ingombro sterico in questa parte della molecola, e sostiene l'ipotesi delle interazioni idrofobiche.

### 2.1.3.3 Eterociclo saturo

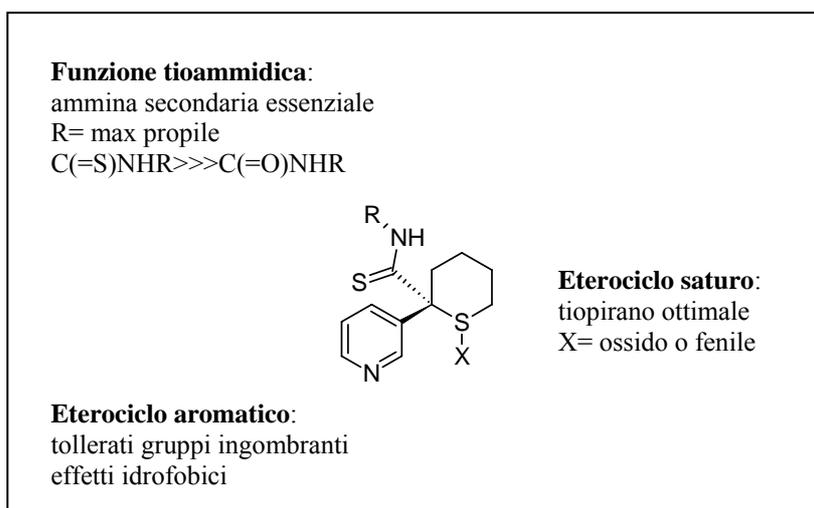
Modificazioni del gruppo tiopiranico dimostrano chiaramente che questa porzione corrisponde esattamente ai requisiti recettoriali. Analoghi contenenti un solfone, un gruppo tetraidrotiofenico o tetraidrofuranico mostrano un drastico calo dell'attività. Solo con un cicloesano l'attività viene quasi mantenuta. Questa scoperta ha dato inizio allo sviluppo di una nuova serie di composti contenenti la porzione cicloesamica. Il chetone **28** è un prodotto intermedio della sintesi che porta all'alcool trans.



**28**

In contrasto con la debole attività del prodotto finale, il composto **28** è equipotente al racemo dell'aprikalim. La sua inaspettata potenza ha dato origine ad una moltitudine di nuovi derivati, comunemente chiamati analoghi cicloesanonici, come ad esempio derivati di tipo solfonammidico, ossimico, idrossilamminico e amminico.<sup>22</sup>

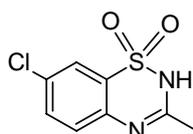
Gli studi di SAR di questi analoghi cicloesanonici rispecchiano quelli dell'aprikalim per ciò che riguarda l'enantioselettività, la configurazione assoluta dell'eutomero, così come le modificazioni delle porzioni piridilica e tioformammidica. Il significativo miglioramento nell'attività di questi composti, contenenti un nucleo aromatico in più, supporta l'ipotesi di un modello farmacoforico più esteso.



**Figura 2.4:** rappresentazione dei dati di SAR per i KCOs tioformamidici.

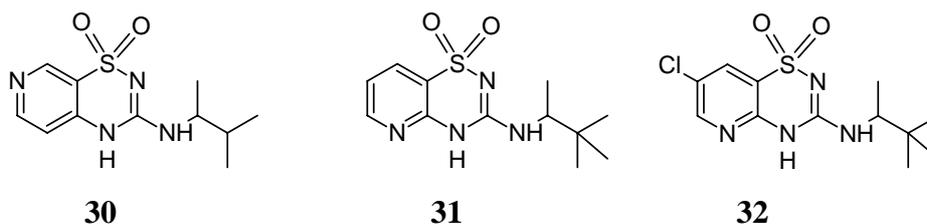
#### 2.1.4 Benzo- e piridotiadiazine

Il prototipo delle tiadiazine è il diazossido (**29**): le sue proprietà sono state determinate attraverso studi funzionali<sup>23</sup> e di binding.<sup>24</sup> Il diazossido differisce per molti aspetti dagli altri KCOs. Il suo sito di legame è localizzato in un'altra regione della subunità SUR, diversa da quella di benzopirani e cianoguanidine.<sup>25</sup> Il diazossido è l'unico KCO che si lega con affinità simile alle subunità SUR1 e SUR2B, pertanto esso rilascia la muscolatura liscia e inibisce la secrezione di insulina in maniera praticamente equipotente.<sup>26</sup>

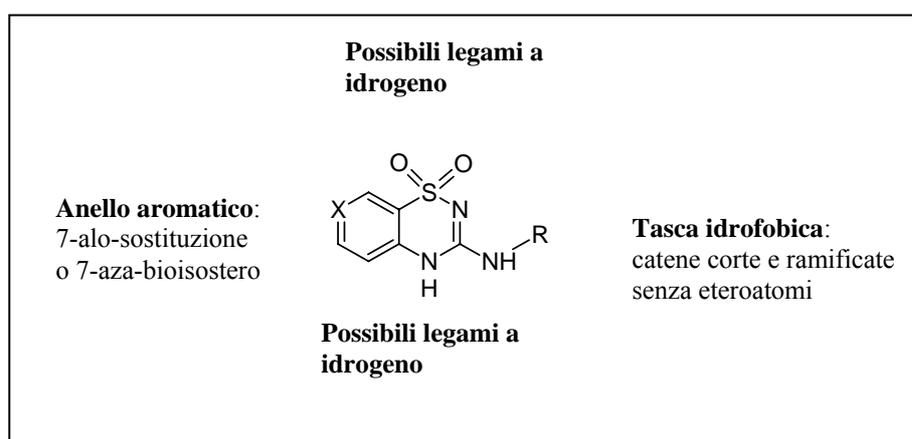
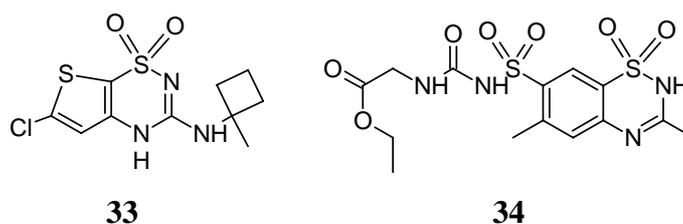


diazossido **29**

Partendo dal diazossido come lead compound, sono stati sviluppati alcuni derivati del diazossido selettivi sia per il pancreas che per la muscolatura liscia.<sup>27</sup> Queste nuove strutture sono ibridi tra diazossido e pinacidil. Da questi studi è derivato un modello farmacoforico per l'attività agonista di tali composti sui canali  $K_{ATP}$  delle cellule  $\beta$  del pancreas. In particolare, la sostituzione dell'anello 7-clorobenzenico con il bioisostero piridinico aumenta significativamente la selettività: un esempio è il composto **30**. Cambiare la posizione dell'azoto nella piridina porta a composti con una selettività tissutale opposta: sia **31** che **32** sono infatti più selettivi nel rilasciamento dell'aorta. Questo conferma come anche sottili variazioni strutturali possano influenzare la selettività tissutale.



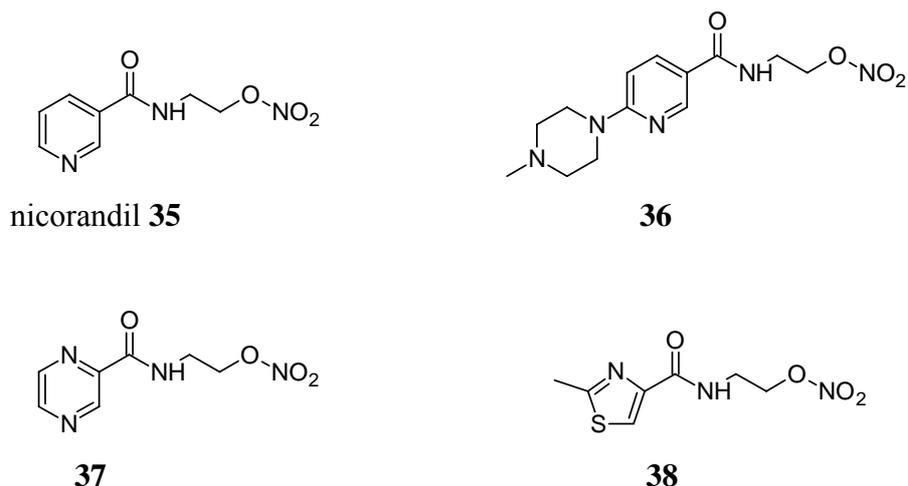
Sempre usando l'approccio di creare strutture ibride, altri studiosi<sup>28</sup> hanno sviluppato composti ancora più potenti e selettivi sostituendo la piridina con un tiofene. Il composto **33** attiva le cellule pancreatiche nel range del nanomolare, ed è almeno mille volte più potente del diazossido. Infine, gli ibridi delle benzotriazinone con le solfoniluree, come il composto **34**, mostrano attività vasorilascianti comparabili con quelle del cromakalim.<sup>29</sup>



**Figura 2.5:** modello farmacoforico per i KCOs tiadiazinici.

### 2.1.5 Piridil nitrati

L'esempio classico è il nicorandil (**35**), ma i dati di SAR su questa classe di composti sono pochi, e il numero di analoghi del nicorandil presenti in letteratura limitato. Tra questi ci sono il composto **36**, che presenta la sostituzione dell'anello piridinico con uno piperazinico, e il **37** e **38**, che presentano rispettivamente un anello pirazinico o tiazolico.



## 2.2 KCOs di seconda generazione

Considerando il ruolo chiave che i canali  $K_{ATP}$  svolgono nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, e grazie al loro potenziale nel proteggere la cellula in condizioni di stress metabolici, i KCOs rappresentano potenziali farmaci che potrebbero essere presto inseriti nella pratica clinica in aggiunta alle terapie esistenti. I KCOs possiedono infatti un vasto potenziale terapeutico per molte patologie tra cui l'asma, l'ischemia cardiaca o l'incontinenza urinaria.<sup>30</sup> La loro utilità terapeutica dipende però dalla loro selettività tissutale, che nei composti definiti di "prima generazione" è risultata limitata. Infatti solo quattro KCOs sono stati introdotti nella pratica clinica: il nicorandil per l'angina, il minoxidil per l'alopecia, il diazossido e il pinacidil per l'ipertensione.<sup>31</sup>

Attraverso studi successivi è stato possibile ottenere una seconda generazione di composti, che presentano un migliore profilo soprattutto dal punto di vista della selettività, e che pertanto potrebbero essere presto impiegati in alcuni settori terapeutici.

In questo capitolo saranno considerate le patologie per le quali i KCOs di seconda generazione hanno dimostrato di possedere una buona selettività in vivo.

### 2.2.1 Composti cardioselettivi

Il ruolo benefico dei KCOs nell'ischemia del miocardio è stato inizialmente suggerito da studi sul nicorandil<sup>32</sup>; in seguito, sono stati analizzati gli effetti di altri KCOs in un modello di ischemia e riperfusione, ed è stata osservata l'attività cardioprotettiva di molti KCOs, tra cui il cromakalim, il pinacidil, il bimakalim e l'aprikalim. La conferma che i canali  $K_{ATP}$  sono coinvolti nel meccanismo di preconditionamento ischemico ha intensificato ulteriormente gli studi su questi composti.

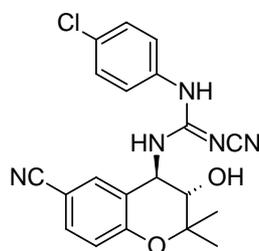
I KCOs di prima generazione tuttavia non sono stati utilizzati per il trattamento delle patologie del cuore ischemico a causa degli effetti secondari dovuti all'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  in diversi tessuti, ad esempio il potente vasorilasciamento dovuto all'apertura dei canali  $K_{ATP}$  presenti nella muscolatura liscia vascolare.

È quindi risultata evidente la necessità di sviluppare composti più selettivi nei confronti dei canali  $K_{ATP}$  cardiaci.

#### 2.2.1.1 Benzopiranyl cianoguanidine

I primi studi<sup>33</sup> sul cromakalim avevano mostrato il suo effetto cardioprotettivo in vitro e in vivo, tuttavia la sua efficacia in clinica era limitata dal concomitante effetto ipotensivo.

Il primo KCO cardioselettivo ad essere sintetizzato è stato il composto BMS-180448 (**39**), un ibrido tra la struttura benzopiranic del cromakalim e quella cianoguanidinica del pinacidil.<sup>34</sup>

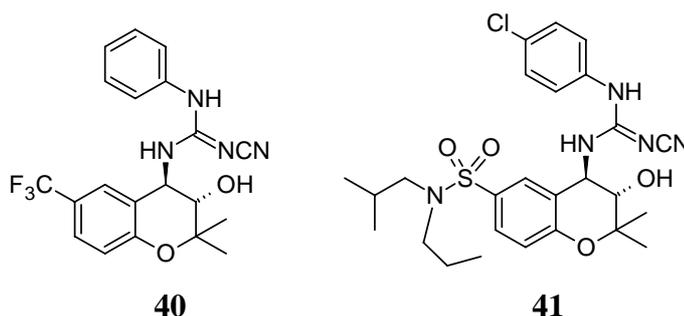


BMS-180448 **39**

Partendo da questo composto come lead, alcuni ricercatori hanno sviluppato dettagliati studi di SAR per ottimizzare le proprietà antiischemiche e cardioselettive.

Per quanto riguarda le modificazioni dell'anello benzopiranoico, la sostituzione dell'ossigeno con un metilene è tollerata, mentre è deleteria la sostituzione con un atomo di azoto. Il gruppo gem-dimetilico è essenziale, i composti che ne sono privi risultano inattivi. La presenza dell'idrossile in 3 non è fondamentale ma, se presente, l'enantiomero trans è più attivo del cis. L'introduzione di un doppio legame tra i carboni 3 e 4 abolisce le proprietà antiischemiche, indicando che è necessario un carbonio ibridizzato  $sp^3$  in posizione 4.<sup>35</sup>

Analizzando l'influenza del sostituente in posizione 6 si è concluso che piccoli gruppi elettronegativi, in particolare il  $CF_3$ , presente nel composto **40**, favoriscono le proprietà antiischemiche. Uno studio successivo<sup>36</sup> ha inoltre dimostrato che anche gruppi solfonamidici ingombranti migliorano significativamente la cardioselettività: un esempio è rappresentato dal composto **41**.

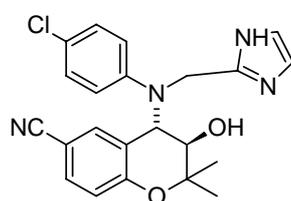


La sostituzione della porzione cianoguanidinica con una ureica o tioureica non offre vantaggi per la selettività, in quanto aumenta leggermente sia l'attività antiischemica che le proprietà vasorilascianti.

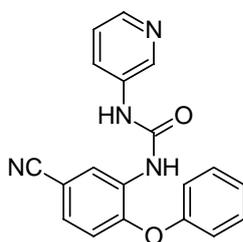
Altre variazioni di questa porzione della molecola hanno evidenziato che il gruppo fenilcianoguanidinico o fenilureico favoriscono nettamente la selettività per il miocardio, e che l'aumento o la diminuzione della distanza tra l'azoto anilिनico e l'anello aromatico attenua sia la potenza che la selettività; questi due gruppi devono stare tra loro ad una distanza ben definita. Anche la sostituzione dell'azoto anilिनico con atomi di O, S o  $CH_2$  è sfavorevole, mentre lo scambio del fenile con un anello piridinico è tollerato.<sup>37</sup>

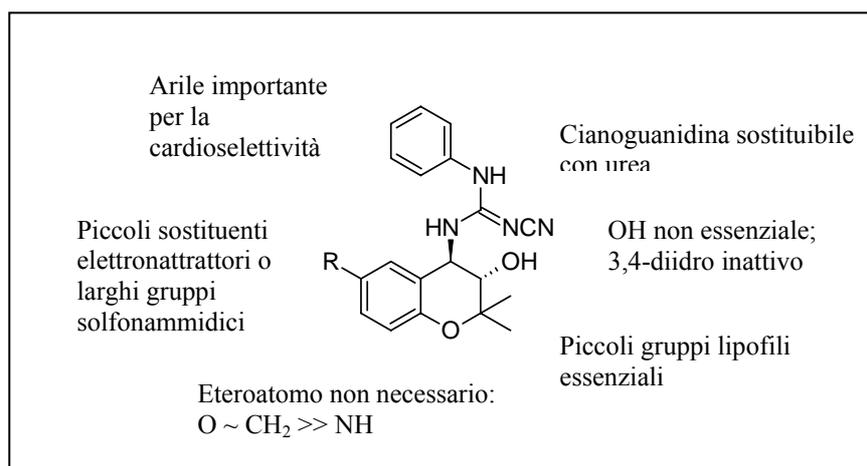
Con l'intento di ridurre ulteriormente l'attività vasorilasciante di BMS-180448 a favore di quella antiischemica, è stata sintetizzata una serie di benzopirani *N*-aril sostituiti; all'interno di questa serie il composto BMS-191095 (**42**) ha mostrato di possedere la potenza e la selettività più

alte nei confronti del miocardio.<sup>38</sup> BMS-191095 è almeno 30 volte più selettivo di BMS-180448: la sua attività antiischemica risiede principalmente nell'enantiomero 3*S*,4*R*-, e questa enantioselettività è opposta a quella di BMS-180448. Le ragioni di questo comportamento sono ancora sconosciute, ma potrebbero essere collegate ad una differente modalità di legame al recettore. Il profilo farmacologico di BMS-191095 è stato ampiamente studiato in vitro ed in vivo: questo composto non è impiegato in clinica a causa dei suoi effetti tossici sul sistema nervoso, ma rimane un importante lead per futuri studi.

BMS-191095 **42**

Un interessante lavoro ha dimostrato che la porzione benzopiranic non è essenziale per l'attività antiischemica né per la cardioselettività.<sup>39</sup> Considerando il fatto che né l'ossigeno benzopiranic né il gruppo idrossilico in C3 sono essenziali per l'attività, è stato sviluppato un derivato aciclico (**43**) che mostra una modesta riduzione dell'attività ma una cardioselettività comparabile a quella di BMS-191095.

**43**



**Figura 2.6:** SAR delle benzopirani cianoguanidine.

### 2.2.2 Composti selettivi per le vie aeree

Le prove dell'attività broncodilatatoria dei KCOs risalgono al 1986, quando fu dimostrato che il cromakalim riduceva spontaneamente il tono colinergico e istaminergico nella trachea in vitro.<sup>40</sup> Ulteriori studi dimostrarono questo comportamento anche in altre specie animali, incluso l'uomo.

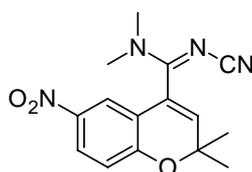
Il potenziale terapeutico dei KCOs nel tessuto polmonare riguarda principalmente l'asma e i disturbi da ostruzione polmonare cronica. L'asma bronchiale è caratterizzata da ampie variazioni, in brevi periodi di tempo, nella resistenza al flusso delle vie respiratorie. Questa patologia è spesso trattata con broncodilatatori. Al giorno d'oggi l'asma non è più vista come un'ostruzione reversibile delle vie respiratorie, ma è considerato una patologia infiammatoria; il trattamento farmacologico ampiamente utilizzato in clinica prevede l'uso di antiinfiammatori e broncodilatatori. Recentemente vengono utilizzati anche altri farmaci, quali gli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE), gli inibitori della sintesi delle interleuchine, gli antagonisti del trombossano e anche gli attivatori dei canali K<sub>ATP</sub>.<sup>41</sup>

#### 2.2.2.1 Benzopirani e dialchilnaftalenoni

L'uso clinico della maggior parte dei KCOs di prima generazione è limitato a causa dei concomitanti effetti sul sistema cardiovascolare e centrale (emicrania). Una migliore selettività verso le vie aeree e la somministrazione per via inalatoria hanno portato ad una seconda generazione di KCOs maggiormente utilizzabili in terapia.

I dati riguardanti la seconda generazione di KCOs variano significativamente: per alcuni composti sono disponibili solo dati in vitro, mentre altri sono già in fase di valutazione clinica. I KCOs selettivi per le vie aeree derivano esclusivamente dalla classe dei benzopirani o da quella correlata dei dialchilnaftalenoni.

Uno dei pochi esempi di KCOs selettivi in vitro per le vie respiratorie è il composto KC-128 (**44**), membro di una serie di benzopiran-4-(*N*-ciano)carbossamidine.<sup>42</sup> L'attività rilasciante di questi composti è stata valutata misurando l'effetto sull'aorta di ratto isolata precontratta con KCl 30mM.

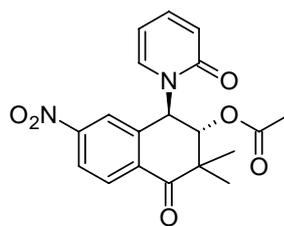


KC-128 **44**

La selettività dipende fortemente dalla sostituzione sull'azoto della porzione carbossamidinica. KC-128, che presenta un gruppo dimetilico in tale posizione, inibisce il tono spontaneo in preparazioni di trachea con un pIC50 di 7.3, ma è inattivo in preparazioni di aorta. In contrasto ai KCOs classici, l'attività rilasciante di KC-128 non è antagonizzata competitivamente dalla glibenclamide, suggerendo che questo composto agisce su un sito diverso da quello dei KCOs classici.

In uno studio successivo è stato valutato l'impatto del sostituente in 6 e di modificazioni della porzione cianoimminica. La sostituzione in C6 con un gruppo nitro è risultata ottimale, mentre la sostituzione del gruppo cianoimminico ha portato alla perdita di attività, indicando che tale gruppo è essenziale.

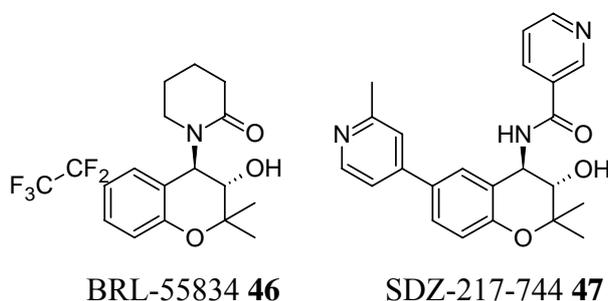
Un altro esempio di KCO selettivo appartiene alla classe dei dialchilnaftalenoni, in cui l'ossigeno benzopiranicico è sostituito da un gruppo carbonilico (**45**).<sup>43</sup> L'attività rilasciante di questo composto è stata valutata sulla vena porta di ratto isolata: il composto **45** è selettivo per le vie respiratorie di un fattore pari a 12, con un IC50 di 23 μM.

**45**

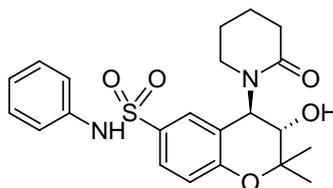
I dati clinici riguardanti **44** e **45** non sono ancora disponibili, pertanto tali composti possono essere visti solo come interessanti lead per ulteriori approfondimenti.

Il composto BRL-55834 (**46**), caratterizzato dalla presenza di un gruppo pentafluoroetilico in posizione 6, non mostra selettività per le vie aeree in vitro, ed ha una potenza simile sia per il rilascio di vena porta precontratta con KCl, sia per il rilascio del tono indotto da vari agonisti in anelli isolati di trachea di ratto. Paragonato al levromakalim, BRL-55834 è da 8 a 27 volte più potente nella trachea, ma solo 3 volte più potente nella vena porta. Questo confronto indica una selettività relativa in vitro; altri esperimenti hanno mostrato per questo composto anche una selettività in vivo.<sup>44</sup>

Il composto SDZ-217-744 (**47**) differisce strutturalmente dal cromakalim per il gruppo 2-metil-4-piridinico in C6, e per la porzione 3-piridincarbossamidica in C4. Questo composto ha mostrato di possedere una buona selettività in vitro rispetto al cromakalim e al bimakalim.<sup>45</sup>

BRL-55834 **46**SDZ-217-744 **47**

Il composto KCO-912 (**48**) è l'esempio più studiato tra i KCOs benzopiranic selettivi per le vie respiratorie.<sup>46</sup>



KCO-912 48

È caratterizzato da un sostituito *N*-solfonammidico in posizione 6 e da una porzione piperidonica in C4. Dal momento che i composti con tale sostituito in C6 mancano di selettività per le vie aeree, il piperidone in C4 insieme alla struttura cromanolica potrebbe essere responsabile della selettività tissutale di questo composto. Il blocco dell'attività di KCO-912 da parte della glibenclamide indica che il meccanismo d'azione è collegato all'attivazione dei canali  $K_{ATP}$ . Per quanto riguarda gli effetti collaterali a carico del sistema cardiovascolare, è stato evidenziato che KCO-912 non influenza la pressione sanguigna o il battito cardiaco alle dosi che inducono dilatazione delle vie respiratorie. Un buon profilo farmacocinetico, cioè un lento passaggio dai polmoni alla circolazione sistemica, e una rapida eliminazione dal circolo sistemico, supportano ulteriormente la selettività in vivo di questo composto.

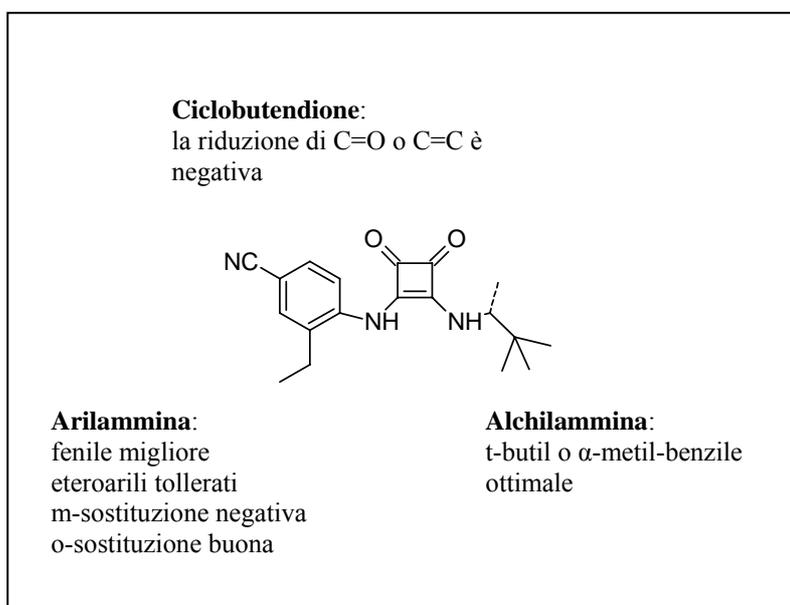


Figura 2.7: SAR dei diamino-ciclobutendioni

### 2.2.3 KCOs selettivi per le vie urinarie

L'incontinenza urinaria è classificata in 3 tipologie principali: da stress, da stimolo e riflessa. L'eziologia dell'incontinenza è molto varia e include instabilità neurogeniche e miogeniche. Nella maggior parte dei casi si ha difficoltà a trattenere le urine nella vescica, e solo in qualche caso la patologia è legata alla difficoltà di riempimento della vescica stessa.

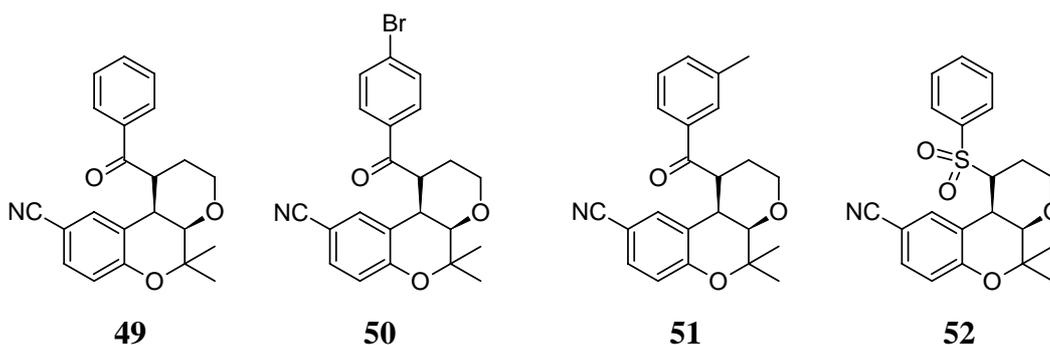
Il trattamento farmacologico è volto a diminuire l'iperattività del muscolo detrusore e ad aumentare la capacità della vescica. I farmaci più impiegati sono gli anti-muscarinici, che inibiscono efficacemente gli stimoli riflessi della vescica, ma che purtroppo hanno molti effetti collaterali, tra cui l'inibizione della normale attività contrattile della vescica e il blocco dei recettori muscarinici in altri organi. Gli attivatori dei canali  $K_{ATP}$  rappresentano quindi una valida alternativa.<sup>47</sup>

Molti KCOs hanno mostrato di rilasciare la vescica in vitro in molte specie incluso l'uomo.<sup>48</sup> In preparazioni di muscolo detrusore di vescica umana isolato, il cromakalim e il pinacidil risultano capaci di inibire il tono basale e l'attività contrattile spontanea. Purtroppo i risultati in vitro non sono sempre predittivi di quelli in vivo. In studi clinici pilota, il cromakalim ha mostrato effetti positivi nei confronti dell'instabilità della vescica umana, ma l'efficacia è limitata dagli effetti collaterali come ipotensione e tachicardia.<sup>49</sup>

I KCOs con una migliore selettività includono sia composti appartenenti ai KCOs di prima generazione che presentano variazioni strutturali sul sistema centrale benzopiranicico o ciclobutendionico, sia composti completamente nuovi come i carbinoli terziari.

#### 2.2.3.1 Strutture di tipo benzopiranicico

Esistono pochi KCOs di tipo benzopiranicico selettivi per la vescica (**schema 2.4**). I benzopirani che presentano un certo grado di selettività (**49**) mostrano pronunciate variazioni strutturali rispetto ai composti di prima generazione. I sostituenti in posizione 3 e 4 sono orientati in cis e collegati da un ponte etilenico. La loro capacità di attivare i canali è stata valutata in vitro su preparazioni di vena porta di ratto spontaneamente contratta o con strisce di muscolo detrusore di ratto precontratte con KCl. In uno studio preliminare, l'enantiomero (-) del composto **49** ha mostrato una selettività di 4 volte superiore per il muscolo detrusore ( $IC_{50} = 8.15 \mu M$ ) rispetto alla vena porta ( $IC_{50} = 34.5 \mu M$ ).<sup>50</sup> Successivamente è stato studiato l'effetto del sostituente benzammidico sulla potenza e selettività. Il derivato 4-bromo sostituito **50** ha mostrato una maggiore selettività per la vescica, mentre il 3-metil derivato **51** risulta più selettivo per la vena porta. La sostituzione bioisosterica del carbonile con una porzione sulfonilica, come nel composto **52**, porta ad un ulteriore miglioramento della selettività per la vescica.



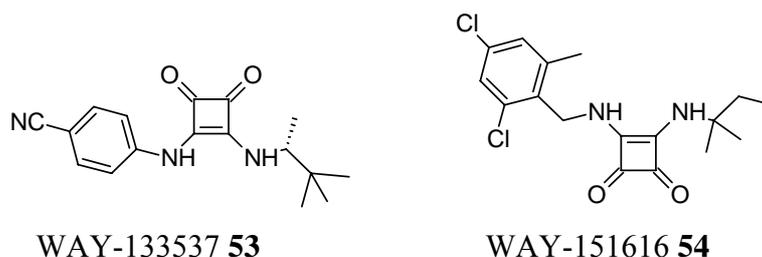
**Schema 2.4:** KCOs a struttura benzopirànica selettivi per le vie urinarie.

### 2.2.3.2 Diaminociclobutendioni

I diaminociclobutenedioni, come WAY-133537 (**53**, **schema 2.5**) e WAY-151616 (**54**) sono stati sviluppati utilizzando il gruppo 1,2-diaminociclobuten-3,4-dionico come bioisostero della porzione cianoguanidinica.<sup>51</sup> La potenza in vitro di questi composti è stata valutata sul muscolo detrusore di ratto precontratto con KCl. Per la valutazione della loro selettività i composti sono stati testati anche sull'aorta di ratto. L'efficacia in vivo è stata misurata per i composti selezionati in un modello di ratto con instabilità della vescica. I composti che avevano la capacità di ridurre la frequenza delle contrazioni spontanee in vivo sono poi stati sottoposti ad test emodinamici, registrando la pressione arteriosa e il battito cardiaco dopo somministrazione del farmaco per via orale.

Sono stati riportati studi di SAR dettagliati<sup>52</sup> relativi alle variazioni strutturali sulla porzione centrale ciclobutendionica e sulle catene laterali aril- ed alchilamminiche. Il nucleo ciclobutendionico risulta essenziale, e la sostituzione con altri bioisosteri porta a perdita di attività. Per quanto riguarda la catena laterale arilamminica è generalmente preferita la presenza di un gruppo fenilico. I sostituenti in posizione orto sull'anello aromatico aumentano la potenza, mentre quelli in meta la riducono; il gruppo CN in 4 è ottimale. Nella catena achilamminica sono preferiti gruppi ingombranti e ramificati. La potenza dilatatoria risiede nell'enantiomero *R*. Il candidato più interessante di questa classe è WAY-133537: gli sforzi per migliorare il suo profilo farmacologico si sono rivolti a migliorare la stabilità metabolica e hanno portato al composto WAY-151616.<sup>53</sup>

Entrambe queste molecole rilasciano la vescica con valori rispettivamente di IC<sub>50</sub> di 0.09 e 0.1 μM, e mostrano selettività in vivo dopo somministrazione orale.



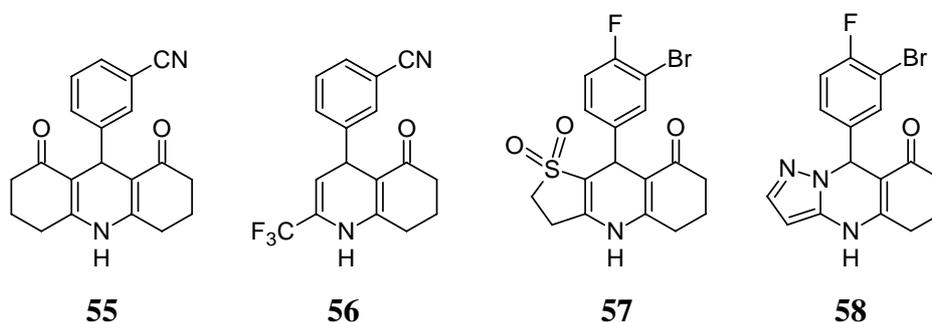
**Schema 2.5:** KCOs diaminociclobutendionici selettivi per la vescica.

### 2.2.3.3 Composti a struttura diidropiridinica

Le diidropiridine sono conosciute soprattutto come agenti antiipertensivi: il blocco dei canali al calcio voltaggio-dipendenti, la riduzione dell'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  e il rilascio della muscolatura liscia rappresentano il meccanismo di azione di questi farmaci. Inoltre le diidropiridine interagiscono anche con altri canali ionici: la nifedipina blocca i canali del potassio Ca-dipendenti ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ).<sup>54</sup> Non sorprende quindi che strutture simili alle diidropiridine interagiscano con i canali  $\text{K}_{\text{ATP}}$ .

Un esempio di KCO a struttura diidropiridinica è ZM-244085 (**55**, **schema 2.6**). I suoi effetti sono stati valutati in vitro, e confrontati con quelli di alcuni KCOs di prima generazione come il cromakalim e il pinacidil; per il composto **55** è stato riscontrato un profilo tipico di un attivatore dei canali  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . In uno studio successivo si è potuto osservare che ZM-244085 possiede anche una marcata selettività per il muscolo detrusore della vescica in vivo.<sup>55</sup>

La sostituzione di uno degli anelli cicloesenonici con anelli eterociclici o eteroaromatici porta ad un'altra serie di composti, tra cui ZD-0947 (**56**) tuttora in fase clinica, **57** e **58**.



**Schema 2.6:** KCOs diidropiridinici selettivi per le vie urinarie.

Nel composto **57**, un tiofene diossido sostituisce uno degli anelli cicloesenonici di ZM-244085: tale composto attiva i canali  $\text{K}_{\text{ATP}}$  nelle cellule muscolari lisce della vescica con un  $\text{EC}_{50}$

di 102 nM, e tale effetto viene abolito dalla glibenclamide. La selettività in vitro per la vescica rispetto ai canali  $K_{ATP}$  vascolari è stata valutata nell'aorta toracica e nella vena porta, a confronto con il composto WAY-133537, tuttavia la selettività riscontrata è piuttosto modesta.

#### 2.2.3.4 Carbinoli terziari

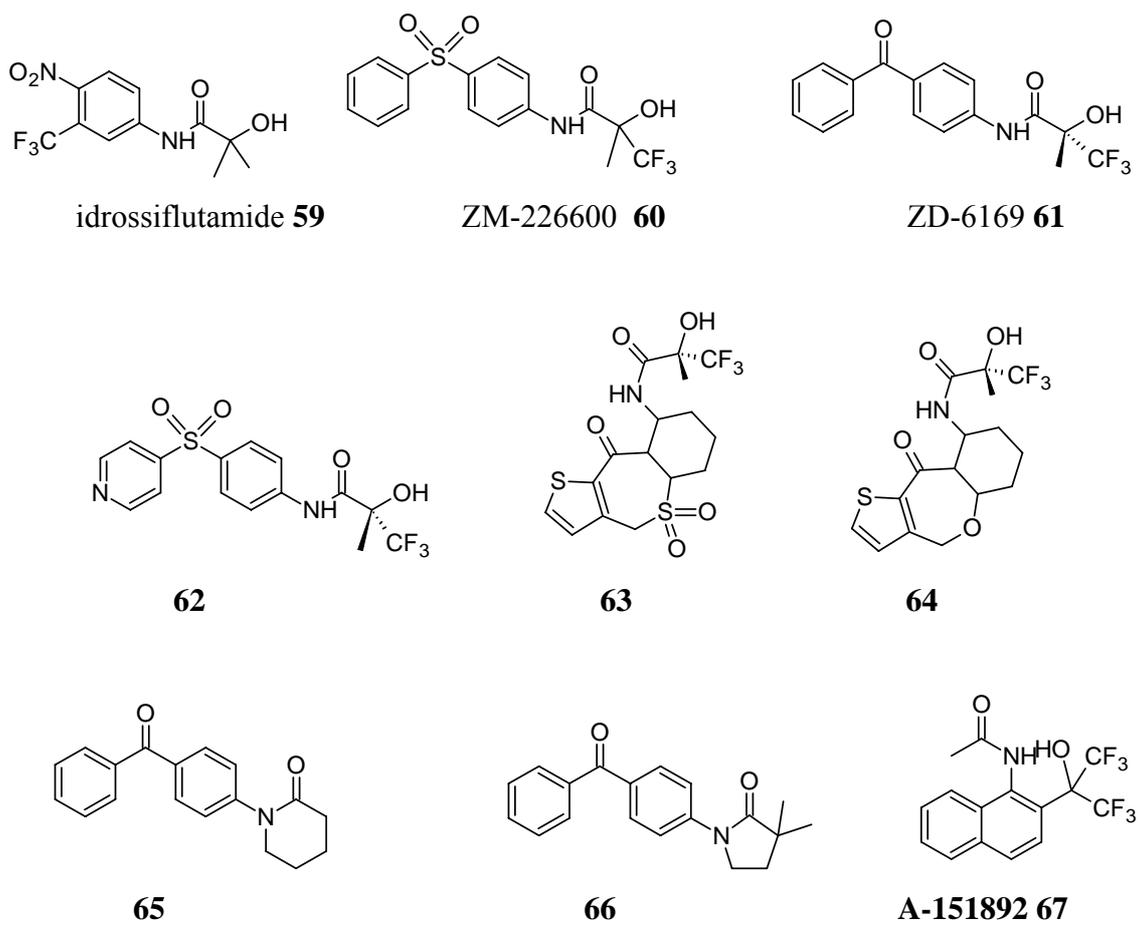
Al contrario dei KCOs descritti finora, i carbinoli terziari rappresentano entità chimiche totalmente diverse. Essi derivano da una serie di composti ad attività anti-androgenica, come l'idrossiflutammide **59** (**schema 2.7**); gli effetti ipotensivi mostrati da alcuni di questi composti sono stati successivamente attribuiti alle proprietà di attivazione dei canali  $K_{ATP}$ .<sup>56</sup>

Il primo step nell'ottimizzazione strutturale è stato quello di minimizzare la potenza anti-androgenica e aumentare quella di KCOs: questo è stato possibile considerando che la porzione molecolare che influenza l'attività anti-androgenica è la catena alchilica, mentre quella che riguarda l'effetto di KCO è la zona N-arilica. Inoltre il grado di attività e selettività aumenta all'aumentare degli atomi di fluoro nella regione alchilica, fino ad un massimo di 4. Quindi, ZM-226600 (**60**) è uno dei primi esempi di composti con proprietà di KCO privo di attività anti-androgenica.

Il secondo step è stato dedicato ad ottenere una buona selettività nei confronti della vescica in vivo. Come modello è stato usato un ratto cosciente con vescica normotensiva, in modo da misurare direttamente anche gli effetti cardiovascolari.<sup>57</sup> I composti con un gruppo elettronattrattore ingombrante in posizione 4, come **61** e **62** hanno mostrato una buona selettività, che risiede nell'enantiomero *S*(-). Da questi studi, il composto **61** è stato scelto come candidato per il trattamento dell'incontinenza urinaria. Le maggiori modificazioni strutturali di questo composto hanno riguardato l'irrigidimento della molecola (**63** e **64**).

I composti **63** e **64** differiscono in diversi aspetti dal loro precursore: il carbinolo terziario è in posizione orto anziché in para rispetto al carbonile, e la porzione benzofenonica flessibile è sostituita da un tricyclo rigido attraverso un eterociclo a sette termini. In vitro entrambi i composti hanno mostrato un'attività vasorilasciante nei confronti delle cellule vescicali paragonabile a quella di ZD-6169; i dati sulla selettività non sono ancora disponibili.

La modificazione di ZD-6169 che più ne differisce è rappresentata dal composto A-151892 (**67**), che mantiene solo la porzione carbinolica: questo ha mostrato di essere un potente KCO in vitro, e di inibire selettivamente le cellule della vescica in vivo.



**Schema 2.7:** KCOs del tipo dei carbinoli terziari selettivi per la vescica.

## Bibliografia

1. Ashwood V.A. et al. *J. Med. Chem.* 1986, 29, 2194-2210
2. Buckle D.R. et al. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 3028-3034
3. Lodge N.J et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 261, 1153-1159
4. Gadwood R.C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5, 2101-2104
5. Gericke R., Harting J., Lues I., Schittenelm C. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 3074-3085
6. Imagawa J., Yoshida S., Koga T., Kamei K., Nabata H. *Gen. Pharmacol.* 1993, 24, 1505-1512
7. Bergmann R., Gericke R. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 1994, 327, 169-173
8. Attwood M.R., Brown B.S., Dunsdon R.M., Hurst D. N., Jones P.S., Kay P.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992, 2, 229-234
9. Buckle D.R., Eggleston D.S., Houge-Frydrych C.S.V., Pinto I.L., Readshaw S.A., Smith D.G., Webster R.A.B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1991, 1, 2763-2771
10. Hirata Y., Aisaka K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1997, 29, 397-405
11. Burrell G., Cassidy F., Evans J.M., Lightowler D., Stemp G. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 3023-3027
12. Salamon E., Mannhold R., Weber H., Lemoine H., Frank W., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1086-1097
13. Smith D.G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1990, 3187-3191
14. Yamada M., Terzic A., Findlay I., Jahangir A., Shen W.K., Kurachi Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993, 267, 1544-1549
15. Petersen H.J., Nielsen C.K., Arrigoni-Martelli E. *J. Med. Chem.* 1987, 21, 773-781
16. Cook N.S., Quast U., Manley P.W. *Br. J. Pharmacol.* 1989, 96, 1819
17. Manley P.W., Quast U. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2327-2340
18. Takemoto T., Eda M., Okada T., Sakashita H., Matzno S., Gohda M., Ebisu H., Nakamura N., Fukaya C., Hihara M., Eiraku M., Yamanuchi K., Yokoama K. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 18-25
19. Yoshiizumi K., Ikeda S., Goto K., Morita T., Nishimura N., Sukamoto T., Yoshino K. *Chem. Pharm. Bull.* 1996, 44, 2042-2050
20. Lange U., Loffler-Wolz C., Englert H., Hambrock A., Russ U., Quast U. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 40196-40205
21. Palfreyman M.N. in: Evans J.M., Hamilton T.C., Longman S.D., Stemp G. editors London: Talyor & Francis 1996, pp. 57-77
22. Brown Th. J., Chapman R.F., Mason J.S., Palfreyman M.N., Vicker N., Walsh R.J.A. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1604-1612
23. Quast U., Cook N. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 250, 261-271
24. Shyng S.L., Ferrigni T., Nichols C.G. *J. Gen. Physiol.* 1997, 110, 643-654
25. Ashcroft F.M., Gribble F.M. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000, 21, 439-450
26. Antoine M.H., Berkenboom G., Fang Z.Y., Fontaine J., Herchuel A., Lebrun P. *Eur. Pharmacol.* 1992, 216, 299-306
27. Pirotte B., Ovedraogo R., deTullio P., Khelili S., Somers F., Boverie S., Dupont L., Fontane J., Damas J., Lebrun P. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1456-1466
28. Nielsen F.E. et al. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4171-4187
29. Khelili S., Leclerc G., Faury G., Verdelti J. *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 495-503
30. Longman S.D., Hamilton T.C. *Med. Res. Rev.* 1992, 12, 73-148
31. Lawson K. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2000, 9, 2269-2280
32. Lamping K., Gross G.J. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1985, 7, 158-166
33. Grover G.J., Sleph P.G., Dzwonczyck S. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990, 16, 853-864
34. Atwal K.S. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994, 24, 512-517

35. Atwal K.S, Grover G.J., Ferrara F.N., Ahmed S.Z., Sleph P.G., Dzwonczyck S., Normandin D.E. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1966-1973
36. Atwal K.S. et al. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 3711-3717
37. Atwal K.S. et al. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 3236-3245
38. Atwal K.S. et al. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 24-34
39. Atwal K.S. et al. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 304-313
40. Allen S.L., Boyle J.P., Cortijo J., Foster R.W., Morgan G.P., Small R.C. *Br. J. Pharmacol.* 1986, 89, 395-405
41. Prasad M.R., Bahekar R.M., Rao A.R. *Pharmazie* 2000, 70, 977-990
42. Ishizawa T., Koga H., Sato H., Makino T., Taka N., Takehashi T., Sato T., Nabata H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 1995-1998
43. Almansa C., Gomez L.A., Cavalcanti T.L., Rodriguez R., Carceller E., Bartroli J., Garcia-Rafanell J., Forn J. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2121-2133
44. Bowring N.E., Arch J.R.S., Bucale D.R., Taylor J.F. *Br. J. Pharmacol.* 1993, 109, 1133-1139
45. Buchheit K.H., Fozrad J.R. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 1999, 12, 103-105
46. Buchheit K.H., Manley P.W., Quast U., Russ U., Mazzoni L., Fozard J.R. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2002, 365, 220-230
47. Hattor T. *Drugs of Today*, 1998, 34, 125-138
48. Zografos P., Li J.H., Kan S.T. *Pharmacology* 1992, 45, 216-230
49. Nurse D.E., Restorick J.M., Mundy A.R. *Brit. J. Urol.* 1991, 68, 27-31
50. Cheng C.Y., Chiu H.I., Chang M.J., Lin Y.C., Tsai M.C., Yu H.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 463-468
51. Butera J.A., Argentieri T.M. *Drugs Fut.* 2000, 25, 239-245
52. Butera J.A. et al. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1187-1202
53. Butera J.A. et al. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1203-1214
54. Klockner U., Trieshmann U., Isenberg G. *Drug Res.* 1989, 39, 120-126
55. Li J.H. *Drug Rev.* 1997, 15, 220-231
56. Grant T.L., Ohnmacht C.J., Howe B.B. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994, 15, 402-404
57. Grant T.L., Frank C.A., Kau S.T., Li J.H., McLarin F.M., Ohnamcht C.J., Russel K., Shapiro H.S., Trivedi S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3, 2723-2724

### 3. PRECONDIZIONAMENTO ISCHEMICO

Le malattie cardio-cerebrovascolari (infarto miocardico, ictus, scompenso cardiaco) rappresentano la principale causa di morte nei Paesi del mondo industrializzato. Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, queste malattie causano 17 milioni di morti ogni anno. Solo in Italia si contano 242mila decessi l'anno per malattie cardiovascolari. Queste malattie, che sono destinate a diffondersi per l'invecchiamento progressivo della popolazione, sono tutte legate alla parziale o totale occlusione delle arterie; l'occlusione è dovuta alla formazione di placche aterosclerotiche che ispessiscono la parete del vaso (aterosclerosi), così da rallentare il flusso sanguigno. Quando il flusso si riduce o si interrompe per un tempo limitato si verifica l'ischemia. Se l'ischemia colpisce le coronarie (le arterie che irrorano il cuore), si verifica l'angina pectoris, caratterizzata da un forte dolore al torace e al braccio sinistro. Le conseguenze possono essere gravi, perché la mancanza di ossigeno causa la necrosi dei tessuti. Nel caso dell'infarto miocardico questa occlusione impedisce al sangue di alimentare parti del cuore, nel caso dell'ictus cerebrale invece l'organo in cui è carente l'apporto di ossigeno è il cervello. In entrambi i casi i tessuti si necrotizzano, con conseguenze invalidanti o decesso. La causa più frequente di arresto cardiaco è la fibrillazione ventricolare, indotta da eventi ischemici acuti; i soggetti che hanno già subito un infarto del miocardio rappresentano la categoria più a rischio.

#### 3.1 Danno da ischemia-riperfusion

Quando l'apporto di sangue al cuore viene interrotto per 30-40 min, la contrattilità dei miociti diminuisce, con conseguente morte cellulare. Nelle fibre miocardiche ischemiche la concentrazione di ATP è ridotta, poiché in assenza di ossigeno solo una piccola percentuale di ADP viene trasformato in ATP dalla glicolisi anaerobica. Inoltre, la quantità di ADP che non è convertita in ATP dà origine a composti, come adenosina, inosina e xantine, responsabili dell'aumento di osmolarità intracellulare e del rigonfiamento delle fibre. A causa della ridotta attività della pompa ionica ATP-dipendente, si ha anche un innalzamento della concentrazione intracellulare di ioni  $Ca^{++}$ ; in seguito a tutti questi processi l'integrità della membrana cellulare è quindi seriamente compromessa dall'ischemia.

La riperfusione che segue un lungo periodo di ischemia può aumentare il danno tissutale, a causa dell'aumento del rigonfiamento cellulare, e della possibile distruzione del sarcolemma. Questi fenomeni portano a morte cellulare e all'ampliamento dell'area necrotica. Nelle fibre cardiache si verifica un ulteriore aumento della concentrazione di ioni calcio, con conseguente attivazione di

enzimi degradativi come le proteasi, le endonucleasi e le fosfolipasi. Tra questi enzimi, le fosfolipasi contribuiscono alla degradazione del sarcolemma idrolizzando i fosfolipidi di membrana. Infine, anche la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) riveste un ruolo fondamentale nell'induzione del danno tissutale.<sup>1</sup>

### 3.2 Il precondizionamento ischemico

Un grosso passo avanti nella comprensione del meccanismo di sopravvivenza cellulare è stato fatto dalla scoperta di Murry et al.<sup>2</sup> nel 1986 di un meccanismo intrinseco di protezione, che essi chiamarono precondizionamento ischemico.

Essi dimostrarono come 4 cicli di 5 minuti di ischemia, intervallati da riperfusione, limitavano del 75% l'entità dell'infarto nelle cellule cardiache. Negli anni a seguire questo tipo di esperimento è stato confermato da molti studiosi, e il precondizionamento ischemico è stato definito la più grande forma di protezione in vivo contro l'insulto ischemico. Il problema che si poneva era quindi capire i meccanismi cellulari alla base di questo fenomeno, allo scopo di mimarlo farmacologicamente ed impiegarlo in terapia.<sup>3</sup>

Il precondizionamento ischemico è stato scoperto inizialmente nel cuore, ma successivamente è stato osservato in varie forme anche in altri organi, e in varie specie animali incluso l'uomo. Questo fenomeno si verifica anche nei muscoli scheletrici, e il suo meccanismo è pressoché identico a quello osservato nel cuore. Inoltre è stato osservato anche nell'intestino, nei reni e nel fegato; anche qui il risultato è una rapida protezione dalla morte cellulare durante l'ischemia. Nel SNC il precondizionamento appare solo in una seconda finestra di protezione, circa un giorno dopo lo stimolo precondizionante. Il precondizionamento sembra quindi rappresentare una sorta di adattamento generale utilizzato da un'ampia varietà di cellule in difesa a stimoli di stress come l'ischemia.<sup>4</sup>

Il meccanismo generale di questo processo prevede inizialmente la liberazione di una serie di sostanze trigger, le quali poi interagiscono con recettori sulla superficie cellulare, iniziando una cascata di eventi che porta alla protezione della cellula.<sup>3</sup>

### 3.3 Pre- e postcondizionamento cardiaco

Sono state descritte almeno sette diverse modalità di cardioprotezione:

1. precondizionamento ischemico classico (IPC), in cui brevi periodi di ischemia proteggono il cuore da un danno indotto da un successivo e prolungato evento ischemico<sup>2</sup>;
2. precondizionamento al calcio (CPC), in cui transitori aumenti di  $Ca^{2+}$  intracellulare proteggono il cuore da un evento ischemico<sup>5</sup>;

3. preconditionamento da KCOs, per cui la somministrazione di un attivatore dei canali del potassio prima dell'ischemia protegge il cuore.<sup>6</sup>

Tutti e tre questi modi inibiscono lo sviluppo di contrazioni ischemiche, aumentano il recupero funzionale dopo la riperfusione e riducono la necrosi e l'apoptosi.

La protezione è breve, circa un'ora, e si perde se l'insulto ischemico supera le 3 ore, indicando che la successiva riperfusione è fondamentale.<sup>2</sup> Esiste una prima "finestra di protezione", che dura 1-2 h dopo lo stimolo, e una seconda finestra di protezione, che è meno efficace ma più prolungata, ed appare tra le 12 e le 72 ore dopo lo stimolo preconditionante.<sup>7</sup>

Ci sono poi altre quattro modalità:

4. preconditionamento ritardato; si verifica come evento secondario dopo uno dei tre precedenti. La protezione si manifesta dopo l'IPC e scompare 1-2 h dopo; 12 ore più tardi la cardioprotezione ricompare raggiungendo il massimo dopo 24h, con una durata di circa 72 ore dopo l'ischemia preconditionante<sup>8</sup>;
5. preconditionamento adattativo; è una protezione a lungo termine derivante da ipossia cronica, tra cui quella dovuta a gestazione o altitudine<sup>9</sup>;
6. cardioprotezione dovuta ad inibizione dello scambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ;<sup>10</sup>
7. postcondizionamento ischemico.<sup>11</sup>

### 3.4 Meccanismi cellulari del preconditionamento

Il preconditionamento ischemico conferisce protezione al miocardio attraverso un percorso di trasduzione del segnale: questo parte inizialmente da alcune sostanze, dette "inneschi" (o triggers), che interagiscono con i propri recettori di membrana. Tale legame va ad attivare i cosiddetti mediatori, che probabilmente costituiscono anche un elemento di "memoria" dello stato preconditionato. Infine i mediatori trasportano il segnale agli effettori finali, gli elementi responsabili della protezione cellulare.

La prima fase del preconditionamento ischemico è quella dei triggers, che avviene prima dell'ischemia breve, seguita dalla fase dei mediatori/effettori, durante l'ischemia prolungata. Questa fase coinvolge il legame di alcuni agonisti, tra cui l'adenosina, la bradichinina e gli oppioidi, ai loro recettori di membrana. Tale legame dà inizio alla fase intracellulare, mediata dall'attivazione della proteina chinasi C (PKC).

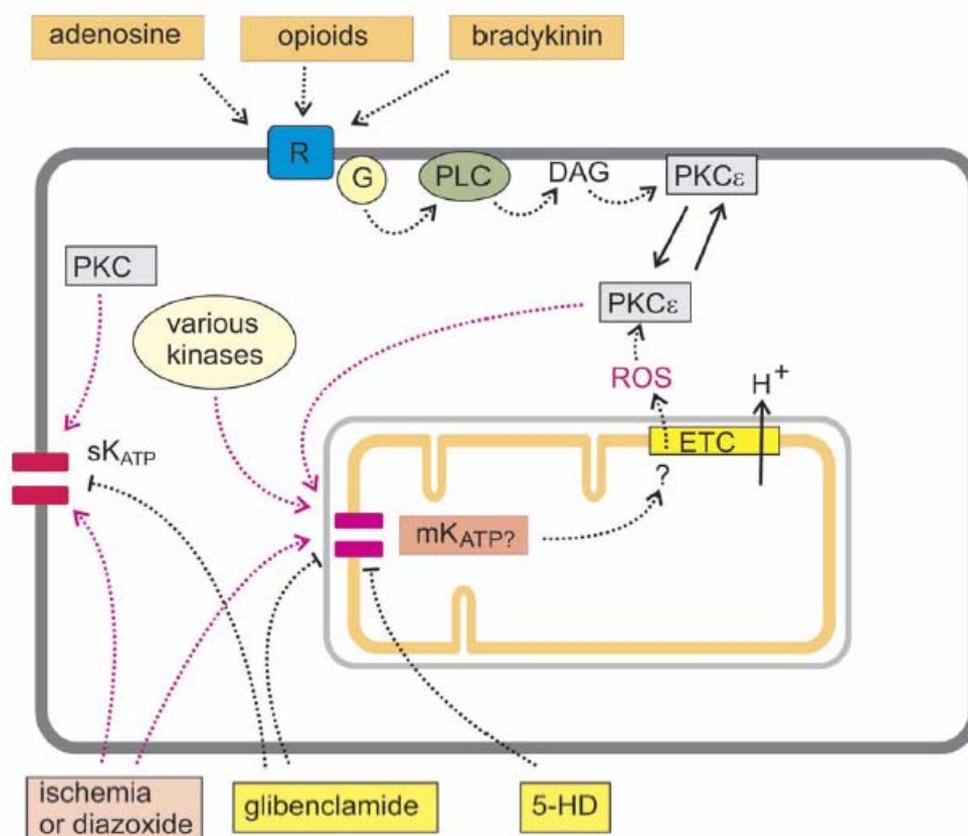
La dimostrazione del fatto che l'adenosina rappresenta un trigger viene dall'osservazione che un bloccante dell'adenosina presente solo durante l'ischemia "breve" e poi rimosso prima di quella prolungata riduce, anche se in modo parziale, la protezione. Ciò indica che il momento critico per

l'occupazione del recettore dell'adenosina è precedente all'ischemia "lunga", e quindi rappresenta un innesco.<sup>12</sup>

La proteina chinasi C invece si comporta da mediatore: infatti, un bloccante della PKC presente prima dell'ischemia prolungata non ha effetti sulla cardioprotezione, però se il bloccante è presente durante l'ischemia lunga la protezione viene annullata. Quindi la PKC esercita un effetto protettivo solo dopo che l'ischemia lunga ha avuto inizio, ed è perciò un mediatore.<sup>13</sup>

Sembra infine che gli effettori finali di questa cascata di segnali siano i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali<sup>14</sup>, ma nessuno studio ha stabilito con chiarezza il momento critico della loro apertura nel processo dell'IPC. Alcuni dei meccanismi coinvolti nel preconditionamento sono rappresentati in **figura 3.1**.

Vediamo ora nel dettaglio quali sono i principali fattori coinvolti in questo processo.



**Figura 3.1:** Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nel preconditionamento ischemico.

### 3.4.1 Triggers

#### 3.4.1.1 Adenosina

Nel 1991 fu scoperto<sup>15</sup> che i recettori dell'adenosina agiscono da trigger del preconditionamento ischemico, rivelando che l'IPC è mediato da recettori; il blocco del recettore A<sub>1</sub> elimina l'effetto protettivo, mentre l'esposizione ad agonisti A<sub>1</sub> conferisce la protezione.

L'adenosina è rilasciata durante l'ischemia e dopo un evento ischemico si ritrova ad alte concentrazioni nel sangue.<sup>16</sup> Esistono 4 sottotipi recettoriali per l'adenosina, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, ma solo A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> sembrano coinvolti nella cardioprotezione.<sup>17</sup>

Il ruolo dei singoli sottotipi recettoriali è stato studiato con topi knockout e con agenti farmacologici. Gli agonisti del recettore dell'adenosina riducono l'entità dell'infarto in modo efficace sia se vengono somministrati prima dell'ischemia che prima della ri-perfusione, indicando che gli effetti cardioprotettivi dell'adenosina si esplicano durante la ri-perfusione.<sup>18</sup>

#### 3.4.1.2 Acetilcolina

Anche l'acetilcolina (ACh) sembra coinvolta nel preconditionamento, e sembra anche che il meccanismo dipenda dall'apertura dei canali K<sub>ATP</sub>.<sup>19</sup> L'ACh non è un trigger fisiologico dell'IPC, in quanto non viene liberata durante il preconditionamento, va però ad occupare i recettori muscarinici, che si accoppiano con le stesse proteine G attivate da adenosina, bradichinina e oppioidi, e quindi può innescare un preconditionamento. È stato dimostrato che l'ACh induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei miociti mediante apertura dei canali mitoK<sub>ATP</sub>. La produzione di ROS dovuta all'ACh infatti può essere inibita sia con l'uso di bloccanti selettivi dei mitoK<sub>ATP</sub>, come il 5-idrossi decanoato (5HD), sia inibendo la catena respiratoria, o con l'uso di bloccanti del recettore muscarinico, ad esempio l'atropina.<sup>20</sup>

#### 3.4.1.3 Bradichinina e oppioidi

La bradichinina partecipa al preconditionamento, viene rilasciata insieme all'adenosina durante l'ischemia breve, ed entrambe agiscono in parallelo per dare cardioprotezione. Le concentrazioni di bradichinina sono elevate sia durante che in seguito ad un evento ischemico.<sup>21</sup>

Nei cardiomiociti esistono due recettori per la bradichinina, uno costitutivo B<sub>2</sub>, e uno che viene indotto in condizioni di stress, B<sub>1</sub>.<sup>22</sup>

Nei ratti l'induzione del recettore B<sub>1</sub> avviene 6 ore dopo la ri-perfusione, e la sua espressione aumenta di quattro volte dopo 24 ore.<sup>23</sup> La cardioprotezione dovuta al preconditionamento viene

abolita nei topi privi del recettore B<sub>2</sub>, mentre la rimozione del recettore B<sub>1</sub> non ha effetti sulla riduzione dell'entità dell'infarto, pertanto il ruolo del recettore B<sub>1</sub> è ancora da chiarire.<sup>24</sup>

La somministrazione di bradichinina 15 minuti dopo l'inizio di un'ischemia di 45 minuti e la successiva riperfusione, induce il rilascio di creatina-chinasi e di elevati livelli di catecolammine e renina; ciò porta ad un recupero della funzionalità cardiaca.<sup>25</sup> Anche la somministrazione di bradichinina 5 minuti prima della riperfusione riduce l'entità dell'infarto. Questi dati suggeriscono che l'effetto protettivo della bradichinina avviene durante la riperfusione. È ancora da chiarire il ruolo della bradichinina nel post-condizionamento, cioè se essa sia o meno protettiva nel caso in cui la somministrazione sia successiva all'inizio della riperfusione.

La morfina è cardioprotettiva se somministrata appena prima della riperfusione, e la stessa efficacia di protezione si osserva quando viene somministrata prima dell'ischemia.<sup>26</sup> L'effetto benefico della morfina non si manifesta invece se la somministrazione avviene 10 secondi dopo l'inizio della riperfusione; in questo caso infatti non si verifica alcuna riduzione dell'entità dell'infarto.<sup>27</sup>

Il preconditionamento indotto dalla bradichinina è dipendente dall'attivazione del recettore B<sub>2</sub><sup>28</sup>, e richiede sia l'apertura dei mitoK<sub>ATP</sub> che la produzione di ROS.<sup>29</sup> L'effetto protettivo dell'attivazione del recettore degli oppioidi è anch'esso legato all'apertura dei canali mitoK<sub>ATP</sub>. Infatti il blocco selettivo di questi canali, così come l'eliminazione di ROS o l'inibizione della catena respiratoria, aboliscono la cardioprotezione dovuta alla morfina. Sembra quindi che gli oppioidi e la bradichinina agiscano allo stesso modo dell'acetilcolina.

Nel processo del preconditionamento la presenza di molteplici recettori (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, Ach, oppioidi) crea ridondanza del sistema, e questo assicura che l'ischemia porti il cuore nello stato preconditionato. Il risultato è che l'antagonista di un solo recettore non è in grado di bloccare la protezione, ma al limite solo di alzare la soglia necessaria per innescare la risposta del preconditionamento.<sup>28</sup>

È noto che ogni recettore accoppiato a proteine G può innescare il preconditionamento: durante un breve periodo di ischemia si osserva un accumulo di vari agonisti quali l'adenosina, la bradichinina, la noradrenalina e gli oppioidi. I miociti cardiaci esprimono anche altri recettori accoppiati a proteine G, come il recettore AT<sub>1</sub> dell'angiotensina, quello ET<sub>1</sub> delle endoteline e quelli muscarinici, che possono innescare uno stato di preconditionamento ma non sembrano partecipare all'IPC perché gli agonisti di questi recettori non vengono rilasciati durante l'ischemia.<sup>3</sup>

Anche i radicali liberi possono agire da triggers nel meccanismo di IPC: il trattamento con scavengers dei radicali può innalzare la soglia del precondizionamento, mentre la liberazione di radicali liberi può portare ad uno stato di precondizionamento.<sup>30</sup> Sembra che i radicali liberi agiscano direttamente attivando le proteine chinasi.<sup>31</sup>

### 3.4.2 Mediatori

#### 3.4.2.1 Proteina chinasi C

Il ruolo della proteina chinasi C (PKC) nel precondizionamento fu scoperto nel 1994 da due diversi team di ricercatori<sup>32,33</sup>, i quali dimostrarono che il blocco della PKC elimina la protezione da un cuore precondizionato, mentre non ha alcun effetto su uno non-precondizionato.

La PKC è una serina-treonina chinasi attivata da cofattori lipidici derivanti dalla rottura dei fosfolipidi di membrana da parte della fosfolipasi C. Nel cuore esistono diverse isoforme della PKC: le principali sono  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , che dipendono sia dal cofattore lipidico diacilglicerolo (DAG) che dal calcio. Le altre isoforme  $\delta$ ,  $\eta$  e  $\epsilon$  sono calcio indipendenti, e necessitano solo del DAG. Sembra che solo alcune isoforme partecipino effettivamente al precondizionamento, cioè  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$ ; tuttavia i targets intracellulari della PKC non sono ancora stati individuati.<sup>34,35</sup>

Uno dei maggiori misteri del precondizionamento è la sua “memoria”. L’attivazione transitoria dei recettori accoppiati a proteine G induce un precondizionamento cardiaco che dura circa 1h. L’occupazione recettoriale costituisce un trigger dello stato precondizionato, e durante l’ischemia precondizionante si ha occupazione dei recettori.<sup>12</sup> Questo è però in contrasto con la somministrazione di un bloccante della PKC. Se la staurosporina, un potente bloccante della PKC, viene somministrata con lo stesso schema, allora la protezione persiste. Sarebbe logico che la PKC fosforilasse il substrato durante il precondizionamento e poi, finché il substrato rimane fosforilato, il cuore rimanesse protetto. Il venir meno della protezione dovrebbe risultare dalla defosforilazione del substrato ad opera delle fosfatasi. In realtà il blocco dell’attività chinastica della PKC ad opera della staurosporina durante il precondizionamento permette comunque al cuore di entrare in uno stato precondizionato. Solo se la staurosporina viene somministrata durante i primi 30 minuti di ischemia significativa, allora la protezione non si manifesta. Tutto ciò porta a concludere che la PKC rappresenta un mediatore piuttosto che un trigger dell’IPC, e che la “memoria” del precondizionamento risieda a monte della attività della PKC.<sup>13</sup>

### 3.4.2.2 Radicali liberi

La scoperta che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) partecipano all'IPC risale al 1997, quando alcuni studi dimostrarono che scavengers dei ROS eliminavano la protezione dovuta al preconditionamento, mentre altre specie capaci di indurre la formazione di radicali liberi la mimavano.<sup>30,36</sup>

I ROS sono prodotti in differenti compartimenti cellulari, in seguito ad un evento di ischemia/riperfusionem nel cuore; queste specie reattive sono responsabili dell'attivazione della PKC o della fosfolipasi C.<sup>37</sup>

È stato quindi ipotizzato che un breve insulto ischemico sia in grado di indurre il rilascio di ROS nella successiva fase di riperfusionem, e che i ROS attivino la PKC, amplificando l'azione dovuta al legame degli agonisti ai loro recettori di membrana.

Questo spiega anche un'altra questione: dal momento che i recettori sono occupati durante l'ischemia in un cuore non preconditionato, ci si potrebbe chiedere come mai non abbiano azione protettiva. Il fatto è che l'intervallo di riperfusionem tra l'ischemia breve e quella prolungata, che si ha nel processo di IPC, è necessario per fornire nuovamente ossigeno per la produzione di ROS.<sup>37</sup>

È comunque importante sottolineare che la quantità di ROS generata a questo livello non è elevata, ma è sufficiente a garantire la corretta attivazione dei secondi messaggeri. La quantità di radicali liberi che si osserva in seguito ad un insulto ischemico vero e proprio è molto superiore, ed è infatti quella che contribuisce al danno tissutale.

### 3.4.3.3 Canali $K_{ATP}$

I canali  $K_{ATP}$  sono degli importanti mediatori della cardioprotezione, e il loro ruolo nel preconditionamento ischemico è stato dimostrato nei miociti e nei cuori isolati di molti animali.<sup>38</sup>

Gross et al.<sup>39</sup> sono stati tra i primi a proporre che l'apertura di questi canali ATP-sensibili fosse coinvolta nel meccanismo di cardioprotezione (preconditionamento ischemico). L'ipotesi iniziale si basava sul fatto che l'apertura dei canali del potassio sarcolemmatici ( $sarck_{ATP}$ ), indotta da ipossia, ischemia o da attivatori farmacologici, fosse responsabile della riduzione della durata del potenziale d'azione cardiaco (APD).<sup>40</sup> La diminuzione di APD inibisce l'ingresso di ioni calcio nella cellula, prevenendone quindi un sovraccarico. Questo processo dovrebbe aumentare la sopravvivenza cellulare durante le fasi di ischemia e di riperfusionem. Questa ipotesi è stata supportata da numerosi studi: il pretrattamento del tessuto cardiaco con pinacidil (un KCO) provoca inizialmente una riduzione dell'APD, seguita da un successivo miglioramento della funzionalità cardiaca.<sup>41</sup>

Tuttavia alcuni ricercatori avevano mostrato che basse dosi di bimakalim, tali da non ridurre la durata dell'APD, avevano effetti cardioprotettivi simili a quelli che si ottenevano con dosi più alte. La stessa mancanza di correlazione tra la durata del potenziale d'azione e la riduzione dell'entità dell'infarto fu osservata anche con il cromakalim e con BMS-180448.<sup>42,43</sup> Questi risultati suggerivano che l'apertura dei canali sarcK<sub>ATP</sub> poteva non rivestire un ruolo chiave nella cardioprotezione, e fecero emergere l'ipotesi di un meccanismo alternativo che coinvolgeva i canali K<sub>ATP</sub> mitocondriali come possibili responsabili del preconditionamento.<sup>14,44</sup>

### 3.5 Canali mitoK<sub>ATP</sub> e cardioprotezione

Le prime evidenze sperimentali relative al ruolo svolto dai canali mitoK<sub>ATP</sub> durante la cardioprotezione furono presentate nel 1997, quando alcuni ricercatori scoprirono che, in mitocondri isolati di bovino, il diazossido apriva i canali mitoK<sub>ATP</sub> ad una concentrazione circa 1000 volte inferiore a quella necessaria per aprire i canali sarcolemmatici.<sup>45</sup> Successivamente fu dimostrato che sempre il diazossido, a concentrazioni più basse rispetto a quelle necessarie per l'apertura dei canali sarcK<sub>ATP</sub>, aumentava il recupero funzionale in cuori isolati di ratto sottoposti ad ischemia/riperfusion: il recupero indotto dal diazossido a tali concentrazioni era praticamente equivalente a quello prodotto dal cromakalim, un KCO non selettivo. Questi effetti farmacologici venivano inoltre bloccati da un antagonista selettivo dei canali mitoK<sub>ATP</sub>, il 5-idrossi decanoato (5-HD).

Questi risultati suggeriscono che la cardioprotezione indotta dal diazossido, e probabilmente altri attivatori dei canali K<sub>ATP</sub>, è legata alla sua interazione con i canali mitoK<sub>ATP</sub>.<sup>45</sup>

Sono state fatte moltissime ipotesi per spiegare i possibili meccanismi con cui i canali mitoK<sub>ATP</sub> inducono la cardioprotezione. Questi includono dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e/o effetti di disaccoppiamento<sup>46</sup>, che probabilmente causano riduzione del sovraccarico di Ca<sup>++</sup> durante ischemia e riperfusion.<sup>47</sup>

È stato anche ipotizzato che l'apertura di questi canali non sia responsabile di una significativa depolarizzazione di membrana, quanto piuttosto della prevenzione dal rigonfiamento della matrice mitocondriale, che ha la funzione di preservare lo spazio intermembrana, e di conseguenza di proteggere le cellule cardiache.<sup>48</sup>

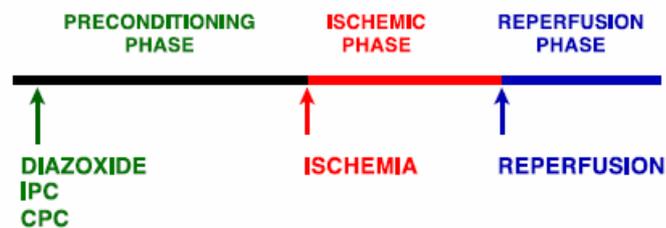
Un'osservazione importante riguarda il fatto che la cardioprotezione indotta dal diazossido viene abolita in presenza di scavengers dei radicali liberi. Altri studi hanno confermato che il diazossido protegge il cuore con un meccanismo ROS-dipendente, dovuto alla produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte dei mitocondri. Sembra che la massiccia produzione di ROS sia

dovuta all'alcalinizzazione della matrice mitocondriale, che a sua volta si verifica in seguito all'influsso di potassio dovuto proprio all'apertura dei canali mitoK<sub>ATP</sub>.

Le specie dell'ossigeno prodotte potrebbero quindi agire da secondi messaggeri, andando ad attivare la cascata chinasi del preconditionamento.

### 3.5.1 Trigger o mediatori?

Gli esperimenti che riproducono ischemia e riperfusione sono in genere divisi in 3 fasi; una prima fase di preconditionamento che inizia 15-30 minuti prima dell'ischemia, una fase ischemica che dura di solito 30 minuti, e infine la riperfusione; la maggior parte dei test farmacologici condotti per valutare la cardioprotezione vengono effettuati durante quest'ultima fase. Il recupero dell'attività contrattile e la riduzione del rilascio di alcuni enzimi sono le prime cose facilmente verificabili, mentre l'entità dell'infarto è comunemente valutata alcune ore dopo la riperfusione.<sup>48</sup>



**Figura 3.2:** rappresentazione schematica delle tre fasi del preconditionamento

Attualmente esistono varie teorie su quale sia la fase cruciale in cui si verifica l'apertura dei canali mitoK<sub>ATP</sub> nel percorso di segnali che porta alla cardioprotezione.

Fino a qualche anno fa si pensava che l'apertura di questi canali avvenisse negli step finali del percorso dell'IPC, o che i canali venissero attivati dalla PKC e quindi fossero dei mediatori; studi successivi hanno invece mostrato che sia il 5-HD che la glibenclamide sono in grado di bloccare la protezione solo se vengono somministrati durante la fase trigger. Inoltre l'apertura transitoria dei canali mitoK<sub>ATP</sub> dovuta ad un KCO, mette il cuore in uno stato preconditionato che dura fino a 30 minuti dopo l'eliminazione del farmaco, suggerendo un ruolo di innesco. Un'ulteriore prova del fatto che l'azione dei canali mitoK<sub>ATP</sub> risiede a monte della cascata chinasi nasce dall'osservazione che l'inibizione della tirosina chinasi durante l'ischemia breve blocca la protezione dovuta al diazossido. Anche la formazione di ROS in seguito all'apertura dei canali mitocondriali conferma che essi sono dei triggers piuttosto che effettori finali.

In conclusione, gli studi più recenti indicano che l'apertura dei canali K<sub>ATP</sub> mitocondriali, in seguito ad un breve episodio ischemico o ad un'attivazione farmacologica, agisce da innesco per lo

stato preconditionato. L'apertura di questi canali dà inizio alla protezione attraverso la generazione di radicali liberi, portando il cuore in uno stato preconditionato: a questo punto le chinasi vengono attivate se il cuore subisce un'ischemia e mediano la protezione attraverso un effettore finale ancora sconosciuto.<sup>49</sup>

Esistono numerose prove farmacologiche che indicano i canali mitoK<sub>ATP</sub> come i principali canali al potassio coinvolti nella cardioprotezione.<sup>39</sup> Tuttavia alcuni recenti esperimenti<sup>50</sup> indicano che anche i canali sarcolemmatici sono necessari per la cardioprotezione indotta dal diazossido. La selettività di diazossido e 5-HD verso i canali mitocondriali, che è stata la base per interpretare il ruolo di questi ultimi nel IPC, è stata riconsiderata, dal momento che entrambi i farmaci hanno anche azioni indipendenti dal canale. Infatti, il diazossido inibisce la succinato-deidrogenasi, bloccando il ciclo dell'acido citrico e portando ad ossidazione della matrice. Il 5-idrossi decanoato può essere trasformato in un derivato del CoA e può quindi fungere da substrato nel processo della  $\beta$ -ossidazione dei grassi.<sup>51</sup> È stato perciò ipotizzato che gli effetti di diazossido e 5-HD nell'indurre e bloccare rispettivamente l'IPC, potrebbero essere il risultato di azioni sul metabolismo mitocondriale che non necessariamente coinvolgono i canali mitoK<sub>ATP</sub>.<sup>52</sup>

Il coinvolgimento dei canali K<sub>ATP</sub> sarcolemmatici e mitocondriali nella cardioprotezione può comunque non essere esclusivo, ed è possibile che essi svolgano ruoli complementari.<sup>53</sup>

Certamente è improbabile che l'approccio farmacologico da solo possa risolvere la questione riguardante il ruolo dei mitoK<sub>ATP</sub> nella cardioprotezione, e sarebbe di grande aiuto avere informazioni precise sulla loro struttura molecolare.

In conclusione mentre i dettagli del coinvolgimento dei mitoK<sub>ATP</sub> nella cardioprotezione rimangono contraddittori, è comunque chiaro che il diazossido e i farmaci equivalenti sono efficaci attivatori di un potente meccanismo cardioprotettivo.<sup>54</sup>

### 3.5.2 Ruolo dei canali mitoK<sub>ATP</sub> nel preconditionamento di altri tessuti

Il preconditionamento protegge un'ampia varietà di tessuti nei confronti del danno ischemico. I canali K<sub>ATP</sub> sono coinvolti nel IPC dei muscoli scheletrici, e i KCOs proteggono il cervello in molti modelli di ischemia/riperfusion, pertanto i mitoK<sub>ATP</sub> potrebbero avere un ruolo anche nella protezione del SNC. In effetti anche i mitocondri delle cellule nervose possiedono i canali mitoK<sub>ATP</sub>, e le loro proprietà sono molto simili a quelle degli analoghi cardiaci. Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che il diazossido protegge contro l'ischemia neuronale, e che il suo effetto protettivo è bloccato dal 5-HD.

## Bibliografia

1. Losano G., Gattullo D., Pagliaro P. *Life Science* 1996, 59 (15), 1185-1192
2. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. *Circulation* 1986, 74, 1124-1136
3. Yellon D.M., Downey J.M. *Physiol. Rev.* 2003, 83, 1113-1151
4. Kirsch G.E., Codina J., Birnbaumer L., Brown A.M. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1990, 259, H820-H826
5. Meldrum D.R., Cleveland J.C.J., Sheridan B.C., Rowland R.T., Banerjee A., Harken A.H. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996, 112, 778-786
6. Grover G.J., McCulloch J.R., Henry D.E., Conder M.L., Sleph P.G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 98-104
7. Baxter G.F., Goma F.M., Yellon D.M. *Basic Res. Cardiol.* 1997, 92, 159-167
8. Bolli R., Dawn B., Tang X.L., Qiu Y., Ping P., Xuan Y.T., Jones W.K., Takano H., Guo Y., Zhang J. *Basic Res. Cardiol.* 1998, 93, 325-338
9. Ostadal B., Ostadalova I., Dhalla N. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 635-659
10. Gumina R.J., Gross G.J. *J. Thromb. Thrombolysis* 1998, 8, 39-44
11. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang W.P., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. *Am. J. Physiol.* 2003, 285, H579-H588
12. Liu G.S., Richards S.C., Olsson R.A., Mullane K., Walsh R.S., Downey J.M. *Cardiovasc. Res.* 1994, 28, 1057-1061
13. Yang X.M., Sato H., Downey J.M., Cohen M.V. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1997, 29, 991-999
14. Liu Y., Sato H., O'Rourke B., Marban E. *Circulation* 1998, 97, 2463-2469
15. Liu G.S., Thornton J., Van Winkle D.M., Stanley A.W.H., Olsson R.A., Downey J.M. *Circulation* 1991, 84, 350-356
16. Headrick J.P. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1996, 28, 1227-1240
17. Black R.G., Guo Y., Ge Z.D., Murphree S.S., Prabhu S.D., Jones W.K. et al. *Circ. Res.* 2002, 91, 165-172
18. Lee Y.M., Shen J.R., Yen M.H. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 279, 251-256
19. Yao Z., Gross G.J. *Am. J. Physiol.* 1993, 264, H2221-H2225
20. Yao Z., Tang J., Tan X., Li C., Shao Z., Kim W.C. et al. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, H2504-H2509
21. Baumgarten C.M., Linz W., Hunkel G., Scholkens B.A., Wiemer G. *Br. J. Pharmacol.* 1993, 108, 293-295
22. Bhoola K.D., Elson C.J., Dieppe P.A. *Br. J. Rheumatol.* 1992, 31, 509-518
23. Tschope C., Heringer-Walther S., Koch M., Spillman F. et al. *J. Hypertension* 2000, 18, 223-228
24. Xu J., Carretero O.A., Sun Y., Shesely E.G., Rhaleb N.E., Liu Y.K. et al. *Hypertension* 2005, 45, 747-753
25. Tio R.A., Tobe T.J., Bel K.J., Langen de C.D., Van Gilst W.H., Wesselung H. *Basic Res. Cardiol.* 1991, 86, 107-116
26. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. *Circ. Res.* 2004, 94, 960-966
27. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 310, 185-191
28. Goto M., Liu Y., Yang X.M., Ardell J.L., Cohen M.V., Downey J.M. *Circ. Res.* 1995, 77, 610-621
29. Cohen M.V., Yang X.M., Liu G.S., Heusch G., Downey J.M. *Circ. Res.* 2001, 89, 273-278
30. Baines C.P., Goto M., Downey J.M. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1997, 29, 207-216
31. Gopala Krishna R., Anderson W.B. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 1989, 86, 6758-6762
32. Mitchell M.B., Meng X., Ao L., Brown J.M., Harken A.H., Banerjee A. *Circ. Res.* 1995, 76, 73-81
33. Ytrehus K., Liu Y., Downey J.M. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1994, 266, H1145-H1152

34. Gray M.O., Karliner J.S., Mochly-Rosen D. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 30945-30951
35. Liu G.S., Cohen M.V., Mochly-Rosen D., Downey J.M. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1999, 31, 1937-1948
36. Tritto I., D'Andrea D., Eramo N., Scognamiglio A., De Simone C., Violante A. *Circ. Res.* 1997, 80, 743-748
37. Oldenburg O., Cohen M.V., Downey J.M. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 2003, 35, 569-575
38. Grover G. *Can. J. Physiol- Pharmacol.* 1997, 75, 309-315
39. Gross G.J., Auchampach J.A. *Circ. Res.* 1992, 70, 223-233
40. Noma A. *Nature* 1983, 305, 147-148
41. Cole W., McPherson C., Sontag D. *Circ. Res.* 1991, 69, 571-581
42. Grover G.J., D'Alonzo A., Parham C.S., Darbenzio R. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995, 26, 145-152
43. Grover G.J., D'alonzo A., Hess T., Sleph P.G., Darbenzio R. *Cardiovasc Res.* 1995, 30, 731-738
44. Grover G.J., Garlid K.D. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 2000, 32, 677-695
45. Garlid K., Pauceck P., Yarov-Yarovoy V., Murray H., Darbenzio R., D'Alonzo A., Lodge N., Smith M., Grover G. *Circ. Res.* 1997, 81, 1072-1082
46. Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marban E. *Circulation* 2000, 102, 800-805
47. Wang L., Cherednichenko G., Hernandez L. et al. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, H2321-H2328
48. Garlid K.D., Dos Santos P., Xie Z-J., Costa A.D.T., Pauceck P. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1606, 1-21
49. Pain T., Yang X.M., Critx S.D., Yue Y., Nakano A., Liu G.S., Heusch G., Cohen M.V., Downey J.M. *Circ. Res.* 2000, 87, 460-466
50. Suzuki M., Sasaki N., Miki T., Sakamoto N et al. *J. Clin. Invest.* 2002, 109, 509-516
51. Lim K.H., Javadov S.A., Das M., Clarke S.J., Suleiman M.S., Halestrap A.P. *J. Physiol.* 2002, 545, 961-974
52. Hanley P.J., Mickel M., Loffler M., Brandt U., Daut J. *J. Physiol.* 2002, 542, 735-741
53. Gross G.J., Peart J.N. *Am. J. Physiol.* 2003, 285, H921-H930
54. Rodrigo G.C., Standen N.B. *Curr. Pharm. Design* 2005, 11, 1915-1940

## 4. TARGET TERAPEUTICI DEL PRECONDIZIONAMENTO

Nel precedente capitolo è stato evidenziato il meccanismo del preconditionamento ischemico, e il fatto che tale fenomeno limita profondamente l'entità dell'infarto miocardico sia nei modelli animali in laboratorio che sul tessuto cardiaco umano; inoltre vari studi clinici hanno confermato che il cuore umano va incontro allo stesso meccanismo.

Tuttavia, per quanto riguarda le applicazioni terapeutiche, l'induzione di brevi periodi di ischemia come profilassi della cardioprotezione non costituisce ad oggi una terapia applicabile nella maggioranza dei casi.

L'uso di agenti farmacologici capaci di indurre gli effetti protettivi del preconditionamento, che mimano "brevi intervalli di ischemia", forniscono invece un migliore approccio per ottenere la cardioprotezione. Inoltre, il preconditionamento farmacologico con attivatori selettivi dei canali mitoK<sub>ATP</sub> si è dimostrato vantaggioso rispetto all'induzione dell'IPC, in quanto i farmaci possono essere metabolizzati rapidamente e il trattamento può essere personalizzato a seconda delle esigenze dei pazienti.

Potenziali candidati attualmente impiegati nell'uso clinico comprendono l'adenosina o suoi analoghi e KCOs come il nicorandil.<sup>1</sup>

La strategia del preconditionamento potrebbe essere anche applicata prima di interventi di bypass coronarici o angioplastica, procedure che possiedono un potenziale rischio di insulto ischemico. Esistono già efficaci metodi di protezione del miocardio durante gli interventi chirurgici, ad esempio l'ipotermia, ma con l'aumento degli interventi, soprattutto su pazienti anziani ad alto rischio, è sempre necessario migliorare le strategie. Per esempio l'adenosina è in grado di migliorare il recupero funzionale postoperatorio del ventricolo sinistro se somministrata per via endovenosa prima del bypass cardiopolmonare.<sup>2</sup>

È possibile che anche altri farmaci, capaci di attivare i triggers del preconditionamento, quali ad esempio gli oppioidi e gli ACE inibitori, siano presto utilizzati nella pratica clinica.

### 4.1 Recettori dell'adenosina

Durante l'ischemia del miocardio la concentrazione di adenosina circolante nel cuore deriva dall'aumentato metabolismo dell'ATP. L'adenosina è coinvolta in numerose funzioni fisiologiche del sistema cardiovascolare: induce vasodilatazione interagendo con i recettori A<sub>2A</sub> nelle cellule muscolari lisce, rallenta il battito cardiaco tramite i recettori A<sub>1</sub> del nodo seno-atriale e causa

inotropismo negativo legandosi ai recettori  $A_1$  dei cardiomiociti ventricolari. Tutte queste azioni sono benefiche nel cuore ischemico, in quanto riequilibrano le riserve di ossigeno.<sup>3</sup>

Nel 1991 è stato dimostrato che un'altra azione dell'adenosina è quella di indurre un meccanismo adattativo che aumenta la resistenza intrinseca del cuore ad un insulto ischemico. La cardioprotezione dovuta al preconditionamento ischemico viene infatti abolita dalla somministrazione di un antagonista non selettivo dell'adenosina, dimostrando che l'adenosina prodotta durante l'IPC agisce su recettori sulla superficie cellulare per indurre una risposta adattativa. Queste scoperte hanno rinnovato l'interesse nel potenziale terapeutico dell'adenosina come agente cardioprotettivo.<sup>4</sup>

Precedentemente a questa scoperta, l'adenosina veniva somministrata durante l'angioplastica coronarica<sup>5</sup> e durante la terapia trombolitica<sup>6</sup>, in quanto è capace di ridurre il danno ischemico dovuto alla riperfusione. Alcune ricerche hanno mostrato che la somministrazione di adenosina nel trattamento dell'infarto miocardico acuto attenua il danno dovuto alla riperfusione.<sup>6</sup> La scoperta che l'adenosina è anche un trigger dell'IPC ha permesso la progettazione e sintesi di agenti adenosinergici che potrebbero potenzialmente essere somministrati in modo continuativo per portare il cuore in uno stato preconditionato, e quindi proteggerlo in caso si verifichi un evento ischemico. Dal momento che il trattamento con farmaci prima dell'ischemia in genere dà un miglior effetto cardioprotettivo rispetto alla somministrazione di farmaci durante la riperfusione, ci si dovrebbe aspettare che gli agonisti dell'adenosina, agendo da mimetici del preconditionamento, migliorino significativamente le terapie al momento disponibili. Tuttavia uno dei problemi associati a questo approccio è che l'uso continuo di agonisti del recettore dell'adenosina potrebbe portare a perdita di efficacia a causa della desensibilizzazione dei recettori stessi (fenomeno del down regulation).<sup>7</sup> Per evitare questo problema è possibile somministrare l'agonista del recettore dell'adenosina a giorni alterni, in modo che la ridotta frequenza di somministrazione non provochi inattivazione recettoriale.<sup>8</sup>

Un altro ostacolo all'uso clinico degli agonisti del recettore dell'adenosina è costituito dagli effetti collaterali sistemici, come bradicardia e ipotensione. Tuttavia, dal momento che la potenza degli agonisti nel mediare una risposta dipende dal numero di recettori espressi in un dato tessuto<sup>9</sup>, è possibile che la cardioprotezione venga ottenuta con agonisti del recettore  $A_1$  a dosi basse, tali da non influenzare il sistema emodinamico.

Più recentemente sono stati testati, su modelli animali di ischemia-riperfusione, agonisti del recettore  $A_3$  dell'adenosina.<sup>10,11</sup> Sebbene il recettore maggiormente implicato nel meccanismo di cardioprotezione sembri essere  $A_1$ , è stato proposto che anche  $A_3$  sia espresso nel miocardio e che la sua attivazione possa portare ad una risposta preconditionante.<sup>12</sup> In effetti il trattamento con

agonisti del recettore  $A_3$  fornisce una marcata cardioprotezione contro l'infarto, anche a dosi che non producono significative variazioni del battito cardiaco o della pressione arteriosa.<sup>11</sup>

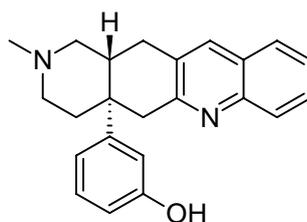
In conclusione, questi studi supportano l'ipotesi che agonisti del recettore dell'adenosina possano essere efficaci agenti cardioprotettivi anche a dosi emodinamicamente inerti.<sup>7</sup>

#### 4.2 Recettori degli oppioidi

Tradizionalmente l'importanza di agonisti ed antagonisti del recettore degli oppioidi è focalizzata sul trattamento del dolore. Tuttavia è stato recentemente scoperto che la funzionalità del cuore potrebbe essere modulata dagli oppioidi sia in stati fisiologici che patologici.<sup>13</sup>

La prima evidenza sperimentale sull'importanza dei recettori degli oppioidi nella cardioprotezione indotta dal preconditionamento nasce dall'osservazione che il naloxone, un antagonista non specifico del recettore degli oppioidi, è in grado di ridurre gli effetti cardioprotettivi dell'IPC.<sup>14</sup> Successivamente è stato dimostrato che l'infusione di morfina in assenza di IPC induce cardioprotezione in cuori di ratto in vivo<sup>15</sup>, e tale effetto sembra essere mediato dal recettore  $\delta_1$  (e non da  $\delta_2$ ,  $\mu$  o  $\kappa$ ). Infatti la somministrazione di un antagonista selettivo per i  $\delta_1$  abolisce tale effetto. Le somministrazioni multiple di agonisti  $\mu$ -selettivi non sono invece in grado di indurre la cardioprotezione.<sup>16</sup>

Recentemente il contributo del recettore  $\delta_1$  nella cardioprotezione è stato confermato da test farmacologici su un agonista  $\delta_1$ -selettivo, **TAN-67**, in modelli di ratto sia in vitro che in vivo.<sup>17</sup>



**TAN-67**

TAN-67 protegge le cellule da ipossia e riossigenazione, come si osserva dalla marcata riduzione della percentuale di cellule morte e dalla quantità di creatina chinasi rilasciata rispetto alle cellule di controllo. Questo effetto sembra inoltre essere mediato dalla attivazione della PKC e dei canali  $K_{ATP}$ .<sup>17</sup>

Il derivato TAN-67 ha inoltre un'azione anti-aritmica durante l'ischemia del miocardio, ed è in grado di abolire l'incidenza di fibrillazione ventricolare durante l'occlusione coronaria e la riperfusione.<sup>18</sup>

Recentemente alcuni studi hanno suggerito l'importanza del recettore  $\kappa$  nella cardioprotezione indotta da oppioidi. Sebbene questo sia in contrasto con quanto detto finora, non è ancora certo quale sottotipo recettoriale sia responsabile della cardioprotezione nell'uomo. Alcuni ricercatori<sup>19</sup> hanno dimostrato che U50,488H, un agonista selettivo del recettore  $\kappa$ , induce cardioprotezione ed è anti-aritmico durante l'ischemia del miocardio. Essi hanno inoltre suggerito che la stimolazione del recettore  $\delta$  non sia una componente del processo di IPC.<sup>19</sup>

Un recente studio suggerisce invece il coinvolgimento di entrambi i recettori  $\kappa$  e  $\delta$  nell'infarto del miocardio; i recettori  $\kappa$  sembrano essere responsabili dell'aumento dell'entità dell'infarto, mentre i  $\delta$  della sua marcata riduzione.<sup>20</sup> Queste teorie, difficili da conciliare, dimostrano che il meccanismo con il quale gli oppioidi inducono cardioprotezione non è ancora del tutto chiarito.

Gli analgesici oppioidi sono largamente usati per il trattamento del dolore, in particolare la morfina, il levorfanolo, la meperidina, il fentanile ed il metadone. Sebbene questi farmaci siano prevalentemente agonisti del recettore  $\mu$ , è stato dimostrato che avviene un cross-talk con i recettori  $\delta$ . Tuttavia la FDA non ha approvato questi farmaci per l'uso clinico in pazienti con angina o che sono predisposti all'infarto miocardico. Questo è dovuto soprattutto alla limitata ricerca nell'uomo riguardo all'importanza del recettore degli oppioidi nel cuore ed all'alto potenziale di dipendenza, abuso e depressione respiratoria di queste sostanze. Le ricerche future saranno focalizzate all'identificazione di composti attivi per via orale con alta affinità per il recettore  $\delta$ , per il loro impiego come agenti cardioprotettivi.<sup>7</sup>

#### **4.3 Recettori della bradichinina come target terapeutici della cardioprotezione**

La bradichinina, rilasciata nel cuore ischemico durante lo stimolo preconditionante, agisce come trigger della cardioprotezione.

Utilizzando il noto antiipertensivo losartan, alcuni ricercatori<sup>21</sup> hanno dimostrato che il blocco del recettore  $A_1$  dell'angiotensina II è cardioprotettivo e può ridurre l'estensione dell'infarto e l'apoptosi dei miociti, migliorando la funzionalità del miocardio. Inoltre, è stato dimostrato che anche gli ACE inibitori come il captopril sono cardioprotettivi durante l'ischemia.<sup>22</sup> In effetti è stato riportato che gli ACE inibitori inducono la liberazione di bradichinina e dunque potenziano gli effetti cardioprotettivi mediante l'attivazione dei recettori  $B_2$ . Più recentemente è stato osservato che il ramiprilat provoca una protezione duratura contro l'infarto miocardico in cuori di ratto dopo 3-7 giorni di riperfusione.<sup>23</sup> Questi risultati suggeriscono che la somministrazione di inibitori degli enzimi che disattivano la bradichinina possono produrre un marcato effetto protettivo.

Tuttavia, nonostante questi incoraggianti risultati, questi test sono stati effettuati solo in modelli animali. Comunque un recente studio clinico ha mostrato che l'infusione intracoronarica di bradichinina preconditiona il cuore umano nei confronti dell'ischemia in pazienti che subiscono angioplastica coronaria.<sup>24</sup> Questi effetti benefici si osservano in assenza di variazioni emodinamiche e suggeriscono che la bradichinina possa essere usata in modo profilattico per mimare il preconditionamento ischemico.

Gli agonisti dei recettori dell'adenosina, della bradichinina e degli oppioidi sembrano essere tra gli agenti più vicini all'uso clinico come mimetici del IPC, dal momento che i farmaci che promuovono l'attivazione di questi recettori sono già clinicamente disponibili e comprendono adenosina, ACE inibitori e morfina.

Dato che molti recettori agiscono in modo concertato per produrre il preconditionamento, potrebbe essere interessante un approccio che include l'uso di combinazioni di due o più di questi farmaci in modo da aumentarne l'efficacia massima. In questo modo dosi non tossiche di ogni farmaco potrebbero dare effetti sinergici per produrre cardioprotezione e ridurre il rischio di tossicità o interazioni tra farmaci.<sup>7</sup>

#### 4.4 Eritropoietina

L'eritropoietina (Epo) è una glicoproteina, sintetizzata per il 90% dalle cellule peritubulari renali, che ha la funzione di regolare la produzione di globuli rossi in risposta ad un ridotto apporto di ossigeno. Essa viene già impiegata nella terapia clinica per stimolare la produzione di globuli rossi nei casi di anemia. È stato inoltre osservato che è in grado di migliorare il recupero fisico in pazienti con infarto del miocardio<sup>25</sup> e che, somministrata in associazione con il ferro, ha la capacità di migliorare la funzionalità cardiaca negli adulti.<sup>26</sup> Studi recenti dimostrano anche che l'eritropoietina protegge le cellule del SNC nei confronti del danno ischemico.<sup>27</sup>

I cardiomiociti isolati esposti all'eritropoietina sono protetti nei confronti dell'ipossia, ma non nei confronti della necrosi cellulare.<sup>28</sup> Cuori isolati pre-trattati con Epo e sottoposti ad ischemia, mostrano un notevole recupero funzionale post-ischemico in entrambi i ventricoli.<sup>29</sup> La cardioprotezione dovuta all'eritropoietina è stata registrata anche in vivo, tramite l'osservazione che l'entità dell'infarto è ridotta.<sup>30</sup>

Questi dati dimostrano la capacità di questa proteina di indurre cardioprotezione.

Il meccanismo mediante il quale l'Epo induce cardioprotezione coinvolge l'attivazione del suo recettore, alla quale seguono l'attivazione di alcune proteine chinasi e dei canali  $K_{ATP}$ .<sup>31</sup> Il

livello di cardioprotezione che si raggiunge con l'eritropoietina è paragonabile a quello che si ha fisiologicamente con l'IPC<sup>32</sup>, pertanto il preconditionamento farmacologico con l'Epo rappresenta un promettente ed efficace metodo per proteggere il cuore dai danni provocati dall'ischemia; inoltre, essendo già impiegata nell'uomo, i suoi profili di stabilità e tossicità sono già noti.

#### 4.5 Cannabinoidi

In genere l'attenzione rivolta ai cannabinoidi è riferita alla loro azione sul SNC, mentre molto poco si conosce riguardo al ruolo dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> nel cuore e nel sistema cardiovascolare. Entrambi i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> sono membri della famiglia dei recettori associati a proteine G, ed entrambi hanno azione inibitoria sull'adenilato ciclasi.<sup>33</sup> Questi recettori svolgono un'intensa attività basale, che può essere inibita dai loro agonisti inversi.<sup>34</sup> Il recettore CB<sub>1</sub> può inibire i canali del calcio di tipo N e Q, e attivare i canali K<sub>ATP</sub>; inoltre può attivare la pompa scambiatrice Na/K, aumentando il pH intracellulare in risposta ad un'acidificazione del citoplasma, che può avvenire in seguito ad un episodio ischemico durante la respirazione anaerobica.<sup>35</sup> Questo meccanismo suggerisce che i cannabinoidi abbiano proprietà cardioprotettive durante l'ischemia.

La prima osservazione che ha fatto supporre che i cannabinoidi svolgono un ruolo benefico nell'insulto ischemico si basa sulla scoperta delle proprietà antiaritmiche di alcuni agonisti non selettivi del recettore CB in un modello di occlusione coronarica nei ratti.<sup>36</sup> Studi successivi hanno evidenziato che un agonista inverso del recettore CB<sub>2</sub> è in grado di bloccare la cardioprotezione.

Il meccanismo cellulare con cui i cannabinoidi inducono cardioprotezione deve comunque essere ancora chiarito, pertanto il loro impiego in terapia rimane al momento solo teorico.<sup>37</sup>

#### 4.6 Ossido nitrico

Il fatto che l'ossido nitrico (NO) sia un agente protettivo o una causa di danno tissutale nel cuore ischemico è stato per molto tempo oggetto di dibattito: tuttavia, la maggior parte degli studiosi sostiene che l'NO abbia un importante ruolo nei meccanismi di cardioprotezione. Molti esperimenti hanno verificato gli effetti deleteri dei bloccanti della NO-sintetasi (NOS) in modelli di ischemia-riperfusion<sup>38</sup>, ma le prove più evidenti del fatto che NO e NOS abbiano un ruolo cruciale nella cardioprotezione sono state ottenute con esperimenti su topi geneticamente modificati.<sup>39</sup> Negli animali in cui era iperespressa la NOS umana a livello dei miociti cardiaci, si registrava un miglior recupero della funzionalità ventricolare dopo l'ischemia e una riduzione del 33% dell'entità dell'infarto rispetto agli animali non modificati. Questi ed altri esperimenti hanno confermato

l'ipotesi che la NO-sintetasi e l'ossido nitrico siano componenti fondamentali del processo di cardioprotezione.<sup>40</sup>

Alla luce di questi risultati, sono stati fatti molti tentativi per stimolare la produzione di NO con agenti farmacologici. Ancora prima che il ruolo dell'ossido nitrico nella cardioprotezione fosse confermato, esperimenti condotti su cani e gatti, in cui veniva somministrata L-arginina (un precursore della sintesi di NO), mostravano una sensibile riduzione dell'ampiezza dell'infarto e un miglior recupero funzionale del ventricolo sinistro.<sup>41,42</sup>

Un'ampia varietà di composti, noti come "NO-donors", vengono metabolizzati in vivo per rilasciare NO: uno di questi è la *S*-nitroso-*N*-acetilpenicillamina (SNAP) che, somministrata prima dell'ischemia, è in grado di mimare il processo di preconditionamento ischemico e proteggere il cuore.<sup>43</sup>

Esistono poi altre strategie usate per aumentare i livelli di NO circolanti. Il nitrito è tipicamente considerato il maggior prodotto di ossidazione dell'ossido di azoto, ed è una molecola con scarse proprietà biologiche. Tuttavia, in condizioni di basso pH e ridotto apporto di ossigeno, il nitrito può essere ridotto ad NO per disproporzione (riduzione acida). Somministrando una soluzione di nitrito di sodio nella cavità del ventricolo sinistro 5 minuti prima della riperfusione (dopo aver provocato 30 min di ischemia), si registra una riduzione dell'area necrotica e dell'infarto pari al 67%, rispetto a cuori non trattati: tale effetto protettivo è inoltre abolito in animali pre-trattati con scavengers dell'NO, dimostrando che il meccanismo passa proprio per la riduzione del nitrito a NO.<sup>44</sup>

L'ossido nitrico, somministrato in diverse forme, è quindi in grado di proteggere il cuore ischemico e di ridurre l'infarto. Somministrato nel periodo antecedente l'ischemia, agisce come segnale che innesca una cascata di reazioni che portano allo stato preconditionato, mentre rimane ancora poco chiaro il suo ruolo durante la riperfusione.<sup>40</sup>

#### **4.7 Cardioprotezione dovuta ai KCOs**

Grover et al.<sup>45</sup> sono stati i primi a stabilire la capacità dei KCO di proteggere il cuore da un insulto dovuto a ischemia/riperfusione. In esperimenti condotti su cuori isolati di ratto, essi scoprirono che pinacidil e cromakalim proteggevano il cuore, e successivamente videro che altri KCOs, come aprikalim e bimakalim, avevano le stesse proprietà.<sup>46</sup>

La possibilità di modulare farmacologicamente il processo del preconditionamento ischemico rappresenta una base di partenza per lo sviluppo di farmaci da utilizzare nel trattamento delle patologie del cuore ischemico.

L'utilità clinica dei KCOs che agiscono sui canali  $K_{ATP}$  sarcolemmatici è limitata dalla possibilità che essi promuovano lo sviluppo di aritmie ventricolari, e da effetti collaterali su altri tessuti. Gli attivatori dei canali  $K_{ATP}$  mitocondriali si sono dimostrati più selettivi nel proteggere i miociti cardiaci dai danni dovuti a ischemia/riperfusion.

Attualmente l'attivatore dei canali  $K_{ATP}$  maggiormente impiegato in terapia è il nicorandil, un KCO che presenta una funzione NO-donor. A basse dosi (100  $\mu$ M) il nicorandil è in grado di aprire i canali mito $K_{ATP}$  ma non quelli sarcolemmatici, i quali richiedono una concentrazione di farmaco dieci volte maggiore. Se somministrato per via orale il nicorandil si distribuisce nei mitocondri cardiaci ed in parte si trasforma nel corrispondente composto de-nitrato, portando ad una continua produzione di NO. Quindi è possibile che l'apertura dei canali mito $K_{ATP}$  dovuta al nicorandil sia favorita dal rilascio di NO da parte dei mitocondri. Tuttavia, l'ossido nitrico favorisce solo in parte l'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  mitocondriali, perciò sembra improbabile che gli effetti cardioprotettivi del nicorandil siano dovuti soprattutto dalla sua porzione nitrato.<sup>47</sup>

In un'altra serie di esperimenti, il bloccante selettivo dei canali mito $K_{ATP}$  5-idrossi decanoato, abolisce gli effetti del nicorandil nel cuore di ratto, quindi un altro possibile meccanismo per spiegare la protezione da parte di questo KCO potrebbe essere quello di influenzare i meccanismi di controllo del calcio intracellulare attraverso l'apertura dei canali  $K_{ATP}$ .<sup>48</sup>

Il nicorandil si è dimostrato utile nel trattamento dell'angina pectoris, presentando anche effetti collaterali minimi.<sup>49</sup> In pazienti con angina instabile, il nicorandil riduce il rischio di ischemia miocardica transitoria e di aritmie.<sup>50</sup> Nei pazienti che si sottopongono ad angioplastica, questo farmaco preconditiona il cuore e migliora le funzioni emodinamiche delle arterie coronariche.<sup>51</sup> Somministrato per via endovenosa, il nicorandil preserva l'integrità del sistema microcircolatorio nei pazienti con infarto miocardico acuto.<sup>51</sup>

Il nicorandil migliora anche l'espressione della ossido nitrico sintetasi endoteliale cardiaca ed ha proprietà antiaggreganti, fibrinolitiche e antiossidanti.<sup>52</sup> Al contrario della nitroglicerina, non è stato registrato lo sviluppo di tolleranza agli effetti anti-anginosi del nicorandil. Gli effetti collaterali principali comprendono emicrania e disturbi gastrointestinali.<sup>49</sup>

Oltre al nicorandil, altri KCOs tra cui pinacidil e aprikalim, si sono dimostrati efficaci agenti cardioprotettivi in modelli animali di bypass cardiopolmonare o di ischemia dovuta ad intervento chirurgico.<sup>53</sup>

## **Conclusioni**

Molti agenti farmacologici potrebbero essere in grado di mimare la protezione conferita dal preconditionamento, e questo crea le basi per lo studio di nuove terapie farmacologiche utili nell'ischemia cardiaca. Studi futuri nei pazienti "a basso rischio" saranno rivolti a stabilire la sicurezza di questi farmaci, mentre studi su larga scala, su pazienti ad alto rischio, saranno volti ad analizzare le potenzialità cardioprotettive a confronto con farmaci già impiegati per la terapia del cuore a rischio.<sup>1</sup>

## Bibliografia

1. Yellon D.M., Downey J.M. *Physiol. Rev.* 2003, 83, 1113-1151
2. Lee H.T., Lafaro R.J., Reed G.E. *J. Cardiac Surg.* 1995, 10, 665-676
3. Drury A.N., Szent-Gyorgi A. *J. Physiol. (Lond)* 1929, 68, 213-237
4. Liu G.S.m Thornton J., Van Winkle D.M. et al. *Circulation* 1991, 84, 350-356
5. Marzilli M., Orsini E., Marraccini P., Testa R. *Circulation* 2000, 101, 2154-2159
6. Mahaffey K.W., Puma J.A., Barbagelata N.A. et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999, 34, 1711-1720
7. Fryer R.M., Auchampach J.A., Gross G.J. *Cardiovasc. Res.* 2002, 55, 520-525
8. Dana A., Baxter G.F., Walzer J.M., Yellow D.M. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998, 31, 1142-1149
9. Baker S.P., Scammells P.J., Belardinelli L. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130, 1156-1164
10. Kodani E., Bolli R., Tang X-L., Auchampach J.A. *Bas. Res. Cardiol.* 2001, 96, 487-496
11. Auchampach J.A., Rizvi A., Qiu Y. et al. *Circ. Res.* 1997, 80, 800-809
12. Strickler J., Jacobson K.A., Liang B.T. *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 1773-1779
13. Barron B. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000, 224, 1-7
14. Schultz J.E., Rose E., Yao Z., Gross G.J. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, H2157-H2161
15. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. *Circ. Res.* 1996, 78, 1100-1104
16. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. *Circulation* 1998, 97, 1282-1289
17. Huh J., Gross G.J., Nagase H., Liang B.T. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 280, H377-H383
18. Fryer R.M., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 294, 451-457
19. Wang G.Y., Wu S., Pei J.M., Yu X.C., Wong M.T. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 280, H384-H391
20. Aitchinson K.A., Baxter G.F., Awan M.M et al. *Basic Res. Cardiol.* 2000, 95, 1-10
21. Sato M., Engelman R.M., Otani H. et al. *Circulation* 2000, 102, III346-III351
22. Miki T., Miur T., Una N. et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996, 28, 1616-1622
23. Schrieffer J.A., Broudy E.P., Hassen A.H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 298, 970-975
24. Leeser M.A., Stoddard M.F., Manchikalapudi S., Bolli R. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999, 34, 639-650
25. Mancini P.M., Katz S.D., Lang C.C., LaManca J., Hudaied A., Androne A.S. *Circulation* 2003, 107 (2), 294-299
26. Silverberg D.S et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, 35 (7), 1734-1744
27. Brines M., Grezzi P., Keenan S., Agnello D., de Lanerolle N., Cerami C., Itri L., Cerami A. *PNAS* 2000, 97 (19), 10526-10531
28. Calvillo L., Latini R., Kajstura J., Leri A., Anversa P., Grezzi P., Salio M., Cerami A., Brines M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100 (8), 4802-4806
29. Shy Y., Rafiee P., Su J., Pritchard Jr K., Tweddell J., Baker J. *Basic Res. Cardiol.* 2004, 99, 173-182
30. Lipsic E., van der Meer P., Henning R.H., Suurmeijer A.J., Boddeus K.M., van Veldhuisen D.J., van Giest W.H., Schoemaker R.G. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004, 44 (4), 473-479
31. Baker J.E. *Vasc. Pharmacol.* 2005, 42, 233-241
32. Baker J.E., Curry B.D., Olinger G.N., Gross G.J. *Circulation* 1997, 95 (5), 1278-1285
33. Howlett A.C., Qualy J.M., Khachatrian L.L. *Mol. Pharmacol.* 1986, 29, 307-313
34. Bouaboula M., Desnoyer N., Carayon P., Combes T., Casellas P. *Mol. Pharmacol.* 1999, 55, 473-480
35. Bouaboula M., Bianchini L., McKenzie F.R., Pouyssegur J., Casellas P. *FEBS Lett.* 1999, 449, 61-65
36. Lagneux C., Lamontagne D. *Br. J. Pharmacol.* 2001, 132, 793-796

37. Lepicier P., Bibeau-Poirier A., Lagneux C., Servant M.J., Lamontagne D. *J. Pharmacol. Sci.* 2006, 102, 155-166
38. Williams M.W., Teft C.S., Ramnauth S., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. *Cardiovasc. Res.* 1995, 30, 79-86
39. Brunner F., Maier R., Andrew P., Wolkart G., Zechner R., Mayer B. *Cardiovasc. Res.* 2003, 57, 55-62
40. Cohen M.J., Yang X-M., Downey J.M. *Cardiovasc. Res.* 2006, 70, 231-239
41. Nakanishi K., Vinten-Johansen J., Lefer D.J., Zhao Z., Fowler W.C., McGee D.S. et al. *Am. J. Physiol.* 1992, 263, H1650-H1658
42. Weyrich A.S., Ma X.I., Lefer A.M. *Circulation* 1992, 86, 279-288
43. Kanno S., Lee P.C., Zhang Y., Ho C., Griffith B.P., Shears L.L. et al. *Circulation* 2000, 101, 2742-2748
44. Duranski M.R., Greer J.J.M., Dejam A., Jaganmohan S., Hogg N., Langston W. et al. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1232-1240
45. Grover G.J., McCulloch JR., Henry D.E., Condor M.L., Sleph P.G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 251, 98-104
46. Grover G.J., Dzwonczyk S., Sleph P.G. *Eur. J. Pharmacol.* 1990, 191, 11-18
47. Sasaki N., Sato T., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. *Circulation* 2000, 101, 439-445
48. Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marban E. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, 35, 514-518
49. Simpson D., Wellington K. *Drugs* 2004, 64, 1941-1955
50. Patel D.J., Purcell H.J., Fox K.M. *Eur. Heart J.* 1999, 20, 51-57
51. Ito H. et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999, 33, 654-660
52. Jasaki O., Strass W.E., Francio S., Loscalzo J., Stamler J.S. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994, 23, 24-30
53. Akar F., Uydes-Dogan B.S., Tufan H., Aslamaci S., Koksoy C., Kanzik I. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1997, 44, 49-56

## 5. NUOVI POTENZIALI ATTIVATORI DEI CANALI $K_{ATP}$

I canali del potassio sono proteine di membrana che regolano selettivamente il passaggio di ioni  $K^+$ . Tra i differenti tipi di canali del potassio, quelli denominati ATP-sensibili ( $K_{ATP}$ ) sono regolati prevalentemente dalle variazioni del rapporto tra le concentrazioni relative di ATP e ADP, associando così l'eccitabilità della cellula al suo stato metabolico. Questi canali sono localizzati sia nella membrana sarcolemmatica che in quella mitocondriale interna delle cellule di molti tessuti, tra cui quelle del cuore, dei muscoli lisci e scheletrici, del pancreas e del SNC, pertanto sono coinvolti in importanti processi fisiologici come la secrezione e il rilascio di alcuni ormoni e neurotrasmettitori<sup>1</sup> e l'attività della muscolatura liscia.<sup>2</sup> Nel cuore, i canali  $K_{ATP}$  sarcolemmatici e mitocondriali hanno un ruolo chiave nella modulazione della funzionalità cardiaca, soprattutto in condizioni di stress metabolico come ipossia e ischemia.

Attualmente sono conosciuti vari meccanismi di cardioprotezione, e uno dei più importanti è noto come preconditionamento ischemico (IPC), un fenomeno endogeno per cui brevi intervalli di ischemia rendono il cuore più resistente ad un successivo attacco ischemico prolungato, riducendo così l'entità del danno nella regione infartuata.

Questo fenomeno, non ancora completamente chiarito, è innescato da vari processi, sia recettore-mediati, come quelli che coinvolgono l'adenosina, la bradichinina e gli oppioidi<sup>3</sup>, che recettore indipendenti, come ad esempio quelli attivati dall'ossido nitrico e dalle specie reattive dell'ossigeno.<sup>4</sup>

I canali  $K_{ATP}$  mitocondriali (mito $K_{ATP}$ ) sembrano rivestire un ruolo chiave in questo meccanismo: alcuni attivatori di questi canali, come il diazossido, mimano il fenomeno dell'IPC anche a concentrazioni che non attivano i canali sarcolemmatici.<sup>5</sup> Inoltre queste risposte farmacologiche vengono bloccate o ridotte da bloccanti selettivi dei canali mito $K_{ATP}$  come il 5-idrossidecanoato (5-HD).<sup>5</sup> Tuttavia, la struttura molecolare dei canali mito $K_{ATP}$  è ancora sconosciuta, e le prove del loro coinvolgimento nella cardioprotezione sono quasi interamente di natura farmacologica e si basano sulla relativa selettività del KCO diazossido e del bloccante 5-HD.

Si può quindi ritenere che, per quanto fino ad ora noto, la possibilità di innescare il processo di IPC attraverso molecole esogene capaci di attivare i canali mito $K_{ATP}$  rappresenta una forte base razionale per lo sviluppo di innovativi farmaci antiischemici.<sup>6,7</sup>

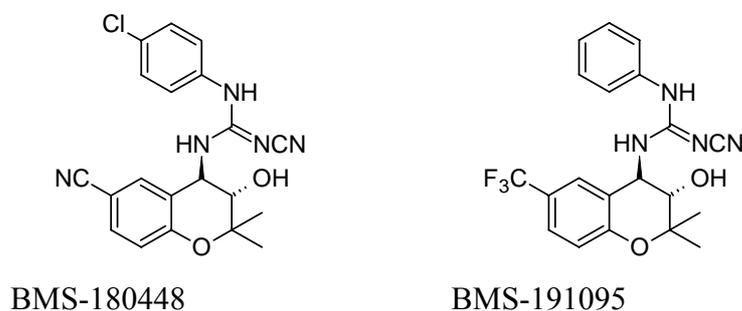
## 5.1 Scopo della tesi

Gli attivatori dei canali del potassio (KCOs) comprendono un gruppo eterogeneo di composti appartenenti a varie classi strutturali, tra cui benzopirani, cianoguanidine e tioformammidi.

Alcuni KCOs di prima generazione hanno mostrato effetti cardioprotettivi, ma la loro utilità terapeutica è risultata limitata dagli effetti collaterali, tra cui un potente effetto ipotensivo dovuto essenzialmente all'azione vasorilasciante legata all'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  vascolari.

È emersa quindi chiaramente la necessità di ottenere KCOs con un miglior profilo di selettività; per le finalità cardioprotettive, è infatti necessario che le nuove molecole risultino attive essenzialmente a livello dei soli canali  $K_{ATP}$  mitocondriali cardiaci, considerati i principali responsabili del preconditionamento ischemico.

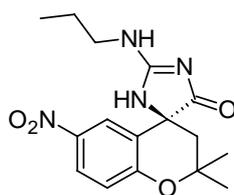
Negli ultimi anni sono state effettuate numerose variazioni strutturali, principalmente sul nucleo dei benzopirani<sup>8</sup>, per cercare composti sempre più selettivi per vari target specifici, come ad esempio le cellule  $\beta$  del pancreas<sup>9</sup> o i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali cardiaci; recenti ricerche hanno portato all'identificazione di alcuni composti che presentano un già discreto grado di selettività per i canali mito $K_{ATP}$ , tra cui le benzopirani-cianoguanidine **BMS180448** e **BMS191095**.<sup>10,11</sup>



**Figura 5.1:** KCOs appartenenti alle benzopirani-cianoguanidine

Fino ad oggi la maggior parte delle modificazioni chimiche sui benzopirani hanno riguardato la posizione 4 e, in generale, gli studi di SAR hanno indicato che, per una buona attività  $K_{ATP}$ , deve essere presente un gruppo accettore di legami a idrogeno ad una distanza di tre legami dal carbonio in posizione 4. Inoltre, il sistema di atomi legati al carbonio 4 dovrebbe essere orientato, per ragioni steriche, su un piano perpendicolare a quello dell'anello benzopiranoico<sup>12</sup>, ma solo in pochissimi casi tale sostituente è stato inserito in una struttura di tipo spiro.

Il composto **U96501**, uno dei pochi esempi in cui il sostituente in C4 è inserito in una struttura di tipo spiro, viene descritto come dotato di una buona attività sui canali  $K_{ATP}$ .<sup>13</sup>

**U96501**

**Figura 5.2:** il composto U96501 è uno dei pochi esempi di KCO benzopirani che presentano un sostituito spirociclico in posizione 4.

Nel composto **U96501** l'anello spirociclico, che in questo caso è di tipo imidazolone, per la sua rigidità conformazionale è costretto su un piano ortogonale rispetto al benzopirano, mantenendo il suo sostituito accettore di legami ad idrogeno alla distanza ottimale dal carbonio in posizione 4, indicata dagli studi di SAR come un importante prerequisito per l'attività.

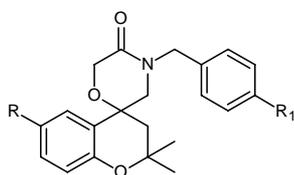
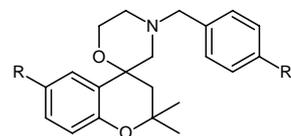
Il gruppo di ricerca in cui è stata svolta questa tesi ha quindi ritenuto di approfondire lo studio di derivati di tipo spiro, partendo dall'osservazione che la maggiore rigidità conformazionale, data appunto da questo tipo di sostituzione in posizione C4, sembrerebbe poter portare a composti dotati di migliore selettività per particolari sottotipi di canali  $K_{ATP}$ , ed in particolare per quelli mitocondriali.

## 5.2 Benzopirani contenenti uno spiro eterociclo a sei termini

Nella prima fase di questo studio l'attenzione è stata indirizzata alla progettazione e sintesi di una serie di composti che presentano un eterociclo a sei termini, morfolonico (**A**) e morfolinico (**B**), legato in forma spiro al carbonio 4 dell'anello benzopirano.

Questo tipo di spiro-struttura infatti, appariva possedere quei requisiti di rigidità conformazionale, di reattività chimica (presenza di un eteroatomo capace di dar luogo a legami a idrogeno) e di orientamento spaziale che le ipotesi di SAR indicano come importanti nel determinare le proprietà bio-farmacologiche. Inoltre l'azoto morfolonico o morfolinico consentiva l'inserimento di gruppi lipofili, anch'essi indicati come capaci di favorire l'interazione recettoriale. Nei composti **A** e **B** sintetizzati, pertanto, il nucleo benzopirano tipico dei più noti KCOs, i.e. quello 2,2-dimetil-sostituito, può essere a sua volta sostituito o meno da un atomo di bromo in posizione 6, in accordo con alcuni dati di letteratura, che attribuiscono a questo sostituito un qualche ruolo sull'attività,

mentre l'azoto dell'anello spiroeterociclico porta un sistema benzilico non sostituito (composti **1a,b** e **9a,b**) o *p*-sostituito con gruppi di differenti caratteristiche steriche ed elettroniche.

**A****B**

Cmpd	R	R <sub>1</sub>
<b>1a</b>	H	H
<b>1b</b>	Br	H
<b>2a</b>	H	NO <sub>2</sub>
<b>2b</b>	Br	NO <sub>2</sub>
<b>3a</b>	H	CF <sub>3</sub>
<b>3b</b>	Br	CF <sub>3</sub>
<b>4a</b>	H	Me
<b>4b</b>	Br	Me
<b>5a</b>	H	OMe
<b>5b</b>	Br	OMe
<b>6a</b>	H	NH <sub>2</sub>
<b>6b</b>	Br	NH <sub>2</sub>
<b>7a</b>	H	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>7b</b>	Br	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>8a</b>	H	NHAc
<b>8b</b>	Br	NHAc

Cmpd	R	R <sub>1</sub>
<b>9a</b>	H	H
<b>9b</b>	Br	H
<b>10a</b>	H	NO <sub>2</sub>
<b>10b</b>	Br	NO <sub>2</sub>
<b>11a</b>	H	NH <sub>2</sub>
<b>11b</b>	Br	NH <sub>2</sub>
<b>12a</b>	H	CF <sub>3</sub>
<b>12b</b>	Br	CF <sub>3</sub>
<b>13a</b>	H	Me
<b>13b</b>	Br	Me
<b>14a</b>	H	OMe
<b>14b</b>	Br	OMe
<b>15a</b>	H	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>15b</b>	Br	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>16a</b>	H	NHAc
<b>16b</b>	Br	NHAc

### 5.2.1 Sintesi

I composti **1a,b-5a,b** sono stati sintetizzati a partire dall'opportuno idrossiacetofenone commerciale: per trattamento con acetone e pirrolidina, secondo la procedura di Kabbe, si sono ottenuti i cromanoni **29a,b** (**schema 1**). L'aggiunta al carbonio carbonilico di trimetilsililcianuro in presenza di ZnI<sub>2</sub> ha portato alle corrispondenti cianidrine protette **30a,b**, che sono state successivamente ridotte ad aminoalcol con LiAlH<sub>4</sub>. Tale reazione necessita di particolari precauzioni nel caso del composto bromo-sostituito, in quanto si può verificare la formazione di

miscela, in cui è presente in notevole percentuale anche il composto non sostituito; questo probabilmente si forma in seguito allo scambio del bromo con il litio, il quale viene poi spiazzato durante il work-up.

Gli aminoalcol **31a,b** sono stati poi sottoposti a reazione di acetilazione per dare i derivati **32a,b**, che sono stati poi ciclizzati a morfoloni in presenza di *t*-BuOK.

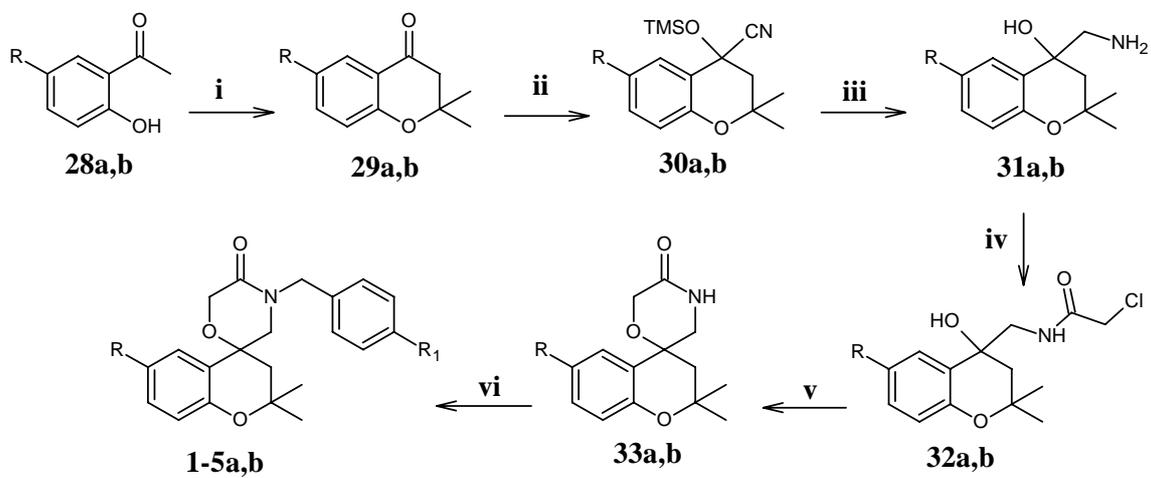
La successiva reazione di *N*-alchilazione di **33a,b** con l'opportuno benzilbromuro para-sostituito ha condotto ai composti **1a,b-6a,b**.

Gli spiromorfoloni *N*-(4'-metansulfonamido)- (**7a,b**) e *N*-(4'-acetamido)benzilsostituiti (**8a,b**) sono stati preparati a partire dai derivati **2a,b**, che sono stati sottoposti a riduzione del gruppo nitro con idrazina in presenza di quantità catalitiche di FeCl<sub>3</sub>, per dare i derivati amminici **6a,b** (**schema 2**); questi sono stati poi fatti reagire con metansolfonilcloruro o con anidride acetica in presenza di basi per fornire i derivati metansolfonamidici **7a,b** o acetamidici **8a,b**, rispettivamente.

I composti **9a,b-14a,b** sono stati ottenuti per riduzione del gruppo ammidico del morfolone, come illustrato nello **schema 3**. La riduzione è stata effettuata con LiAlH<sub>4</sub> per i derivati non sostituiti in posizione 6 del cromano (**1a-6a**), mentre per gli analoghi 6-bromurati **1b-6b** è stata seguita una procedura alternativa con un complesso di borano e dimetilsolfuro, e la reazione è stata condotta al microonde. L'utilizzo del borano si è rivelato essenziale, in quanto nelle condizioni di reazione il LiAlH<sub>4</sub> creava problemi con i composti con il bromo, portando a miscele in cui il composto sostituito e quello non sostituito erano in rapporto 1:1.

Infine, i composti **15a,b** e **16a,b** sono stati ottenuti a partire dai derivati amminici **11a,b** corrispondenti, come descritto nello **schema 4**, per reazione rispettivamente con metansolfonilcloruro o con anidride acetica in presenza di basi.

## Schema 1

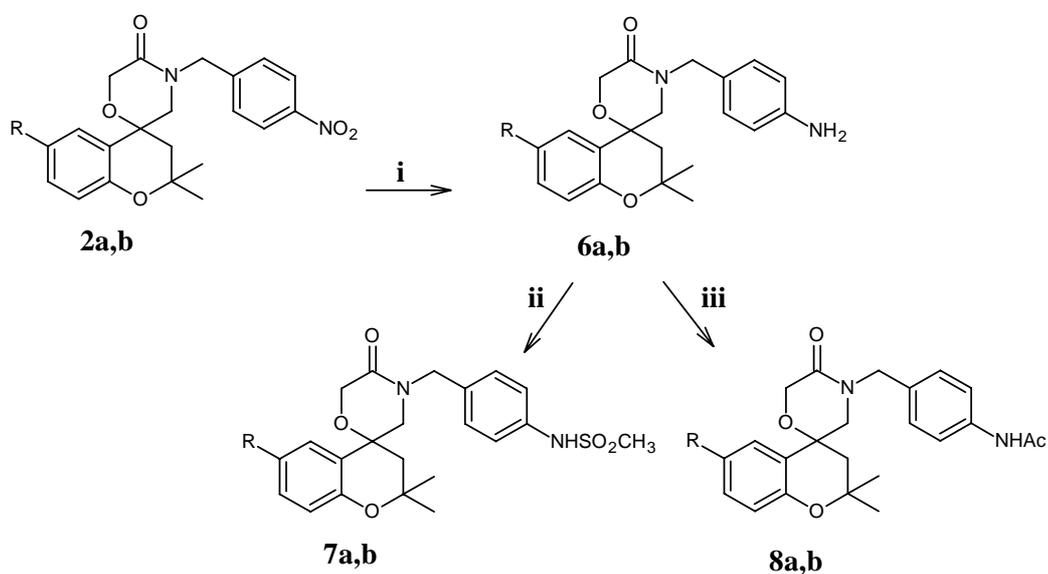


	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>1a</b>	H	H
<b>2a</b>	H	NO <sub>2</sub>
<b>3a</b>	H	CF <sub>3</sub>
<b>4a</b>	H	Me
<b>5a</b>	H	OMe
<b>1b</b>	Br	H
<b>2b</b>	Br	NO <sub>2</sub>
<b>3b</b>	Br	CF <sub>3</sub>
<b>4b</b>	Br	Me
<b>5b</b>	Br	OMe

**Reagenti e condizioni**

**i**: acetone, pirrolidina, toluene, 24h, refluxo; **ii**: TMSCN, ZnI<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4h, t.a.; **iii**: LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1h, t.a.; **iv**: cloroacetilcloruro, NaOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, 1h, t.a.; **v**: *t*-BuOK, toluene, 2h, t.a.; **vi**: benzilbromuro, NaH, DMF, 2h, t.a.

## Schema 2

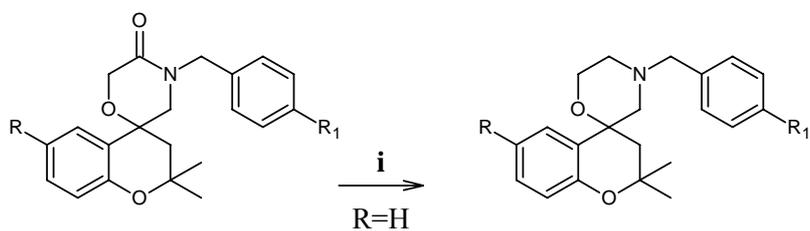


**a:** R=H  
**b:** R=Br

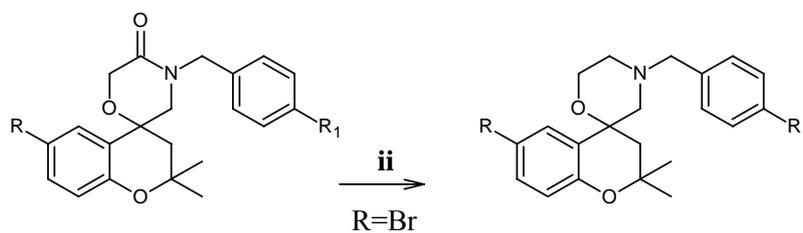
**Reagenti e condizioni**

**i:**  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ , MeOH, 16h, refluxo; **ii:**  $\text{MeSO}_2\text{Cl}$ , Py, diossano, 1h, refluxo; **iii:**  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetone, 1h, t.a.

## Schema 3

**1a-6a****9a-14a**

	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>9a</b>	H
<b>10a</b>	NO <sub>2</sub>
<b>11a</b>	NH <sub>2</sub>
<b>12a</b>	CF <sub>3</sub>
<b>13a</b>	Me
<b>14a</b>	OMe

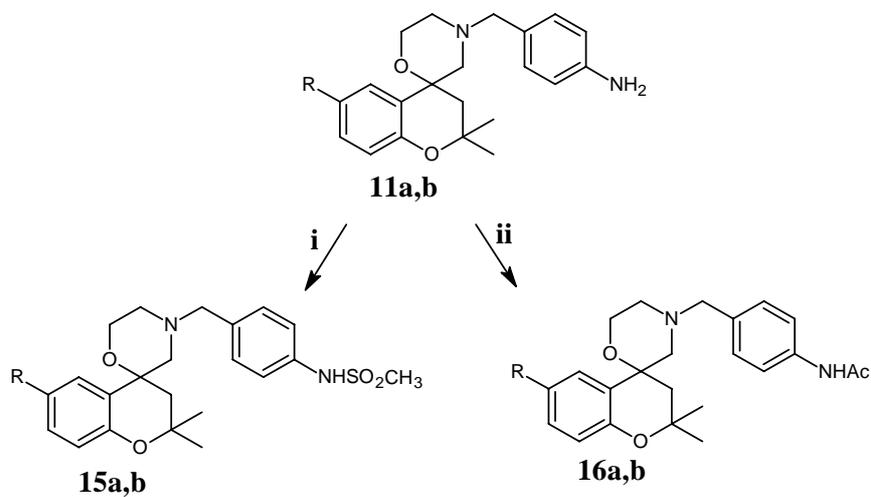
**1b-6b****9b-14b**

	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>9b</b>	H
<b>10b</b>	NO <sub>2</sub>
<b>11b</b>	NH <sub>2</sub>
<b>12b</b>	CF <sub>3</sub>
<b>13b</b>	Me
<b>14b</b>	OMe

**Reagenti e condizioni**

**i:** LiAlH<sub>4</sub>, THF, 1h, riflusso; **ii:** BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, THF, mw, 30 min.

## Schema 4



**a:** R=H

**b:** R=Br

**Reagenti e condizioni**

**i:**  $\text{MeSO}_2\text{Cl}$ , Py, diossano, 1h, rifiusso; **ii:**  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetone, 1h, t.a.

### 5.2.2 Risultati farmacologici

Per valutare le loro proprietà cardioprotettive, tutti i composti sintetizzati (**1a,b-16a,b**) sono stati somministrati, come miscele racemiche alla dose di 40 mg  $Kg^{-1}$  i.p., a ratti maschi Wistar; la loro attività è stata quindi testata sui cuori isolati sottoposti a cicli di ischemia-riperfusion (30 minuti e 120 minuti rispettivamente), secondo il modello di Langendorff.

Due noti attivatori dei canali  $K_{ATP}$ , diazossido e cromakalim, sono stati testati come farmaci di riferimento alle dosi di 40 e 1 mg  $Kg^{-1}$ , rispettivamente. Il diazossido è una benzotiadiazina con un buon grado di selettività per i canali  $K_{ATP}$  cardiaci, al contrario il cromakalim è un potente KCO benzopiranoico (quindi dal punto di vista strutturale più simile ai composti sintetizzati) che presenta sia effetti cardioprotettivi che marcate proprietà ipotensive.

Per ogni composto, il risultante danno ischemico è stato quantificato valutando tre diversi parametri, funzionale, biochimico e morfologico.

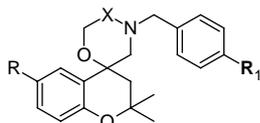
#### 5.2.2.1 Parametro funzionale

Il danno cellulare dovuto all'ischemia si manifesta, a livello macroscopico, soprattutto nella riduzione della forza e della frequenza delle contrazioni delle fibre cardiache. Con il fenomeno del preconditionamento, o somministrando un attivatore dei canali  $K_{ATP}$ , la riduzione della funzionalità cardiaca è però minore, cioè la contrattilità del miocardio dopo un periodo ischemico anche lungo (30 minuti) è solo leggermente inferiore a quella iniziale. Sulla base di questa considerazione, è stato indotto un periodo di ischemia di 30 minuti su cuori di ratto isolati, precedentemente trattati con i composti sintetizzati; al momento della riperfusion è stata poi valutata la ripresa dell'attività contrattile del cuore come misura della capacità protettiva dei composti testati.

Il parametro funzionale, al trentesimo minuto di riperfusion, è stato espresso come percentuale del prodotto della frequenza per la pressione ( $RPP = \text{rate} \times \text{pressure}$ ) registrata durante la riperfusion, rispetto alla percentuale del valore di RPP registrata nell'ultimo minuto del periodo pre-ischemico.

Questo parametro è stato preso come indicatore del recupero funzionale di inotropismo nelle prime fasi della riperfusion.

$X=CO$  (1-8)  
 $X=CH_2$  (9-16)  
 $R=H$  **a**  
 $R=Br$  **b**



Cmpd	R <sub>1</sub>	RPP% (30 min)	Cmpd	R <sub>1</sub>	RPP% (30 min)	Cmpd	R <sub>1</sub>	RPP% (30 min)
veicolo		23 ± 12	<b>5a</b>	OMe	35	<b>11a</b>	NH <sub>2</sub>	100 ± 1
diazossido		69 ± 31	<b>5b</b>	OMe	100	<b>11b</b>	NH <sub>2</sub>	33 ± 10
cromakalim		99 ± 1	<b>6a</b>	NH <sub>2</sub>	100 ± 1	<b>12a</b>	CF <sub>3</sub>	60
<b>1a</b>	H	8 ± 1	<b>6b</b>	NH <sub>2</sub>	n.t.	<b>12b</b>	CF <sub>3</sub>	n.t.
<b>1b</b>	H	66 ± 13	<b>7a</b>	NHMs	78 ± 23	<b>13a</b>	Me	32 ± 19
<b>2a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>7b</b>	NHMs	61 ± 20	<b>13b</b>	Me	n.t.
<b>2b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>8a</b>	NHAc	79 ± 14	<b>14a</b>	OMe	n.t.
<b>3a</b>	CF <sub>3</sub>	1 ± 1	<b>8b</b>	NHAc	2	<b>14b</b>	OMe	n.t.
<b>3b</b>	CF <sub>3</sub>	70 ± 29	<b>9a</b>	H	92 ± 8	<b>15a</b>	NHMs	15
<b>4a</b>	Me	65	<b>9b</b>	H	100	<b>15b</b>	NHMs	89 ± 11
<b>4b</b>	Me	31 ± 31	<b>10a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16a</b>	NHAc	12 ± 3
			<b>10b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16b</b>	NHAc	15 ± 4

**Tabella 5.1** Valori relativi al recupero funzionale post-ischemico espresso come RPP, (HRxLVDP) al 30° minuto di riperfusione, in percentuale rispetto al valore di RPP pre-ischemico.

Come si osserva dai dati riportati nella **tabella 5.1**, alcuni dei composti testati (**1b**, **3b**, **4a**, **7b**, **12a**) mostrano valori di RPP% superiori a quelli del veicolo, compresi tra 60 e 70, paragonabili a quello del composto di riferimento diazossido; in molti casi inoltre il valore è anche superiore a quello del diazossido, e paragonabile a quello del cromakalim, ad esempio nel caso dei derivati morfolonici **5b**, **6a**, **7a**, **8a**, e morfolinici **9a,b**, **11a** e **15b**.

I composti **1a**, **3a**, **4b**, **5a**, **8b**, **15a** e **16a,b** presentano invece valori di RPP paragonabili o addirittura inferiori a quelli del veicolo.

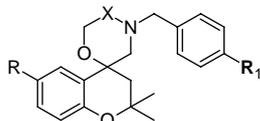
#### 5.2.2.2 Parametro biochimico

Il marker biochimico del danno ischemico è rappresentato dall'enzima lattato deidrogenasi (LDH), rilasciato dal cuore durante la riperfusione. Questo enzima catalizza l'ossidazione reversibile del lattato a piruvato; è praticamente ubiquitario e la sua concentrazione nel cuore è elevata.

Elevati livelli di questo enzima sono indicativi di un'ischemia marcata, come evidenziato dal valore relativo al veicolo (10.6 U $g^{-1}$ ), mentre livelli bassi indicano un ridotto danno ischemico; ad

esempio, il diazossido presenta un valore di LDH pari a  $5.7 \text{ Ug}^{-1}$ , e ciò è indice della sua efficacia cardioprotettiva.

$X=CO$  (1-8)  
 $X=CH_2$  (9-16)  
 $R=H$  **a**  
 $R=Br$  **b**



Cmpd	R <sub>1</sub>	LDH (U/g)120'	Cmpd	R <sub>1</sub>	LDH (U/g)120'	Cmpd	R <sub>1</sub>	LDH (U/g)120'
veicolo		10.6 ± 1	<b>5a</b>	OMe	1.1	<b>11a</b>	NH <sub>2</sub>	3.9
diazossido		5.7 ± 3.6	<b>5b</b>	OMe	5.6	<b>11b</b>	NH <sub>2</sub>	6.4
cromakalim		5.5 ± 0.7	<b>6a</b>	NH <sub>2</sub>	9.8	<b>12a</b>	CF <sub>3</sub>	6.1
<b>1a</b>	H	10.0	<b>6b</b>	NH <sub>2</sub>	n.t.	<b>12b</b>	CF <sub>3</sub>	n.t.
<b>1b</b>	H	1.5	<b>7a</b>	NHMs	10.3	<b>13a</b>	Me	6.9
<b>2a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>7b</b>	NHMs	3.0 ± 1.7	<b>13b</b>	Me	n.t.
<b>2b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>8a</b>	NHAc	5.9	<b>14a</b>	OMe	n.t.
<b>3a</b>	CF <sub>3</sub>	11.2	<b>8b</b>	NHAc	12.3	<b>14b</b>	OMe	n.t.
<b>3b</b>	CF <sub>3</sub>	8.3	<b>9a</b>	H	3.8	<b>15a</b>	NHMs	17.4
<b>4a</b>	Me	8.4	<b>9b</b>	H	6.0	<b>15b</b>	NHMs	6.9±3.8
<b>4b</b>	Me	7.5	<b>10a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16a</b>	NHAc	16.0±1.7
			<b>10b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16b</b>	NHAc	11.3±1.2

**Tabella 5.2:** valori di LDH misurati nel perfusato dopo 120 minuti di riperfusione ed espressi in unità per 1 grammo di peso.

Contemporaneamente alla valutazione del parametro funzionale (vedi paragrafo precedente), è stata effettuata anche la misurazione della quantità di LDH rilasciata dai cuori pretrattati con i composti sintetizzati e con i farmaci di riferimento. Nella **tabella 5.2** sono riportati i valori di LDH rilasciati durante i 120' minuti di riperfusione.

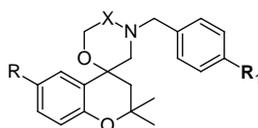
La maggior parte dei composti testati presenta valori di LDH paragonabili (**1a**, **3a**, **4b**, **6a**, **7a** e **16b**) o più bassi di quelli del veicolo (**3b**, **4a**, **5a**, **8a**, **9b**, **11b**, **12a**, **13a** e **15b**): il valore dei composti **1b**, **7b**, **9a** e **11a** (compreso tra 1.5 e 6) è addirittura inferiore a quelli di diazossido e cromakalim.

Alcuni composti invece mostrano valori di LDH più elevati di quelli del veicolo ad esempio **8b**, **15a** e **16a**.

### 5.2.2.3 Parametro morfologico

In seguito ad un evento ischemico il tessuto cardiaco è compromesso, in quanto ampie zone sono costituite da cellule necrotizzate. Tali zone possono essere evidenziate e rese visibili con l'uso di particolari sostanze: queste infatti reagiscono chimicamente con alcuni enzimi presenti nelle cellule vive, dando una precisa colorazione, mentre non reagiscono con le cellule morte. Uno di questi reattivi chimici è il trifeniltetrazolio cloruro (TTC), che colora di rosso le cellule vive, mentre lascia biancastre le aree necrotiche. Al termine della riperfusione, il trattamento del cuore con TTC ha quindi reso possibile un confronto morfologico delle aree sane e di quelle necrotiche del ventricolo sinistro, colorate rispettivamente in rosso e bianco, e quindi di calcolare l'area ischemica come percentuale dell'area totale ( $A_i/A_{tot}\%$ ).

**X=CO** (1-8)  
**X=CH<sub>2</sub>** (9-16)  
**R=H** **a**  
**R=Br** **b**



Cmpd	R <sub>1</sub>	A <sub>i</sub> /A <sub>tot</sub> %	Cmpd	R <sub>1</sub>	A <sub>i</sub> /A <sub>tot</sub> %	Cmpd	R <sub>1</sub>	A <sub>i</sub> /A <sub>tot</sub> %
veicolo		35 ± 7	<b>5a</b>	OMe	47 ± 3	<b>11a</b>	NH <sub>2</sub>	25 ± 2
diazossido		22 ± 6	<b>5b</b>	OMe	11 ± 2	<b>11b</b>	NH <sub>2</sub>	35 ± 6
cromakalim		25 ± 1	<b>6a</b>	NH <sub>2</sub>	n.t.	<b>12a</b>	CF <sub>3</sub>	n.t.
<b>1a</b>	H	33 ± 3	<b>6b</b>	NH <sub>2</sub>	n.t.	<b>12b</b>	CF <sub>3</sub>	n.t.
<b>1b</b>	H	43 ± 4	<b>7a</b>	NHMs	23 ± 3	<b>13a</b>	Me	59 ± 1
<b>2a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>7b</b>	NHMs	13 ± 3	<b>13b</b>	Me	n.t.
<b>2b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>8a</b>	NHAc	20 ± 4	<b>14a</b>	OMe	n.t.
<b>3a</b>	CF <sub>3</sub>	53 ± 10	<b>8b</b>	NHAc	58 ± 4	<b>14b</b>	OMe	n.t.
<b>3b</b>	CF <sub>3</sub>	54 ± 7	<b>9a</b>	H	13 ± 1	<b>15a</b>	NHMs	35 ± 1
<b>4a</b>	Me	20 ± 2	<b>9b</b>	H	n.t.	<b>15b</b>	NHMs	14 ± 2
<b>4b</b>	Me	n.t.	<b>10a</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16a</b>	NHAc	50 ± 2
			<b>10b</b>	NO <sub>2</sub>	n.t.	<b>16b</b>	NHAc	61 ± 2

**Tabella 5.3:** valori di area ischemica espressa come percentuale dell'area totale di una sezione di ventricolo sinistro.

In **tabella 5.3** sono riportati i valori di  $A_i/A_{tot}\%$  relativi ai composti testati: analogamente a quanto osservato per i parametri di RPP ed LDH, anche in questo caso molti composti presentano valori di  $A_i/A_{tot}\%$  inferiori a quelli del veicolo, ad esempio **4a**, **7a,b**, **8a**, **9a**, **11a** e **15b**, mentre altri mostrano elevati valori di area ischemica (**1b**, **3a,b**, **5a**, **8b**, e **16a,b**).

### 5.2.3 Discussione

Come indicato dai dati nelle tabelle precedenti, l'ischemia globale induce un grave danno nei cuori di controllo, mostrando un recupero funzionale post-ischemico decisamente basso (23%), alti livelli di LDH ( $>10 \text{ U/g}^{-1}$ ) e la chiara presenza di aree necrotiche (35%). Come previsto, i due farmaci di riferimento cromakalim e diazossido, somministrati alle dosi di 40 e 1 mg/Kg rispettivamente, hanno portato ad un significativo miglioramento di questi parametri, come si può osservare dall'incremento del recupero inotropico post-ischemico (RPP= 99% e 69%, rispettivamente) e dalla riduzione della quantità di LDH rilasciata (5.7 e  $5.5 \text{ U/g}^{-1}$  rispettivamente) e delle aree necrotizzate (22 e 25% rispettivamente).

Fra i composti sintetizzati, alcuni hanno mostrato un comportamento cardioprotettivo qualitativamente e quantitativamente simile a quello dei farmaci di riferimento: in particolare i composti morfolonici **7b**, **8a** e quelli morfolinici **11a** e **15b** hanno dato valori di RPP% (compresi tra 61 e 100), LDH (compresi tra 3 e  $6.9 \text{ U/g}$ ) e  $A_i/A_{tot}\%$  (compresi tra 13 e 25) omogenei tra loro e paragonabili a quelli del diazossido (RPP = 69%, LDH =  $5.7 \text{ U/g}$  e  $A_i/A_{tot}\% = 22\%$ ), indicando quindi una buona efficacia cardioprotettiva.

I composti **3a**, **8b**, **11b**, **15a** e **16a,b** invece hanno mostrato un comportamento del tutto opposto: i valori relativi al recupero funzionale, al livello di LDH e alla percentuale di area ischemica non solo indicano l'assenza di qualsiasi attività cardioprotettiva, ma possono far pensare ad una attività di tipo cardiotossico.

Infine, alcuni composti come **1b**, **3b**, **6a** e **7a** possiedono caratteristiche discordanti, e i loro valori di RPP%, LDH e  $A_i/A_{tot}\%$  non si presentano omogenei: ad esempio il composto **1b**, pur mostrando un buon recupero funzionale ( $66 \pm 13$ ), presenta un'elevata percentuale di area ischemica ( $43 \pm 4$ ), e i composti **6a** e **7a** mostrano elevati livelli di LDH ( $9.8$  e  $10.3 \text{ U/g}^{-1}$  rispettivamente) a fronte di un elevato recupero funzionale (100 e 78, rispettivamente).

Questi composti dovranno quindi essere sottoposti a valutazioni più approfondite per cercare di spiegare il loro comportamento.

#### 5.2.3.1 Valutazione del coinvolgimento dei canali $K_{ATP}$ mitocondriali

Allo scopo di attribuire con ragionevole certezza ai canali mito $K_{ATP}$  un ruolo determinante nel meccanismo cardioprotettivo osservato, i composti che hanno mostrato una migliore attività sono stati testati anche in presenza di 5-idrossidecanoato (5-HD), un bloccante selettivo di questo tipo di canali. Gli effetti dei composti **8a** e **15b**, e quelli dei farmaci di riferimento, vengono quasi completamente aboliti dal 5-HD, indicando così che le loro proprietà antiischemiche sono probabilmente dovute all'attivazione dei canali mito $K_{ATP}$ . L'attività del composto **7b** invece rimane

invariata, per quanto riguarda il parametro funzionale, anche in presenza dell'inibitore selettivo 5-HD, con ciò suggerendo che le proprietà cardioprotettive di questo composto sono attribuibili a meccanismi diversi da quelli legati ad un'azione diretta sui canali mito $K_{ATP}$ .

Cmpd	RPP%	LDH	$A_i/A_{tot}$ %
<b>Veicolo</b>	23 ± 12	8.7	35 ± 7
<b>Diazossido</b>	80 ± 20	5.6	22 ± 6
<b>Diazossido + 5HD</b>	13 ± 7	20.5	52 ± 5
<b>Cromakalim</b>	100	5.5	27
<b>Cromakalim + 5HD</b>	11 ± 2	8.5	38 ± 3
<b>7b</b>	75 ± 34	2.9	13 ± 3
<b>7b + 5HD</b>	86 ± 43	11.7	47 ± 5
<b>8a</b>	79 ± 14	5.9	20 ± 4
<b>8a + 5HD</b>	16 ± 16	13.4	49 ± 5
<b>15b</b>	89 ± 11	6.8	14 ± 2
<b>15b + 5HD</b>	17 ± 2	13.4	40 ± 1

**Tabella 5.4:** valori di RPP, LDH e  $A_i/A_{tot}$ % di alcuni composti (**7b**, **8a** e **15b**) e dei farmaci di riferimento somministrati da soli o con un bloccante dei canali mito $K_{ATP}$  come il 5-idrossi decanoato (5HD).

### 5.2.3.2 Attività vasorilasciante in vitro

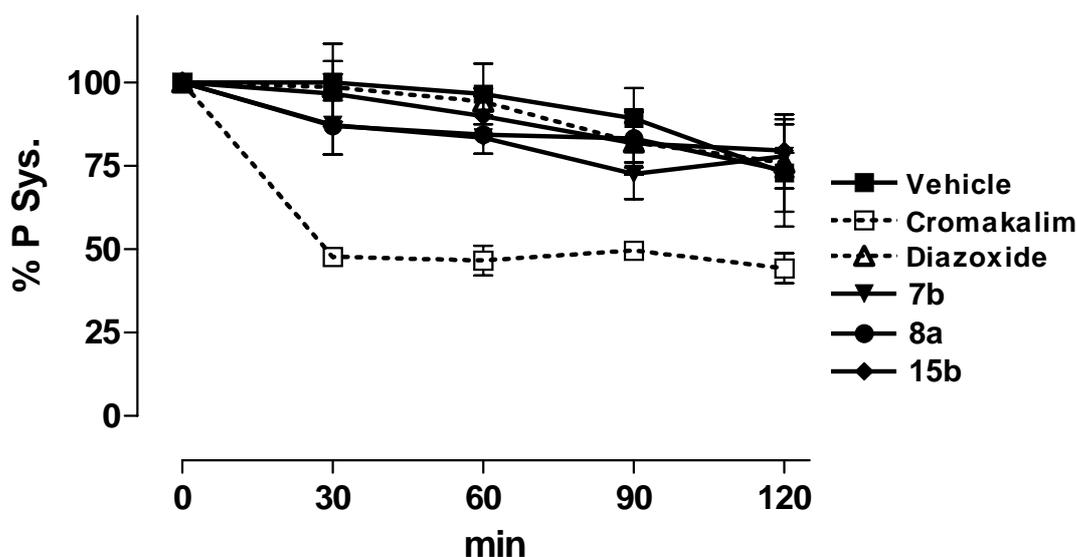
Come riportato precedentemente, uno dei maggiori problemi nell'uso terapeutico dei KCOs per la prevenzione del danno ischemico è legato alla mancanza di selettività verso i canali mitocondriali dei miociti cardiaci rispetto a quelli sarcolemmatici delle cellule vascolari. Di conseguenza, i composti sintetizzati sono stati testati per studiare la loro attività vasorilasciante in preparazioni di aorta di ratto precontratta con KCl 20 mM. Dai risultati in **tabella 5.5** si osserva che tutti i composti sintetizzati presentano una certa attività vasorilasciante: per alcuni si registra un'efficacia pressoché totale ( $E_{max}$ ) ed una potenza ( $pIC_{50}$ ) relativamente elevata rispetto al diazossido, ma comunque inferiore al cromakalim (**3a**, **7a,b** tra i morfologi, **9a**, **10a**, **15b** e **16b** tra le morfoline). Una buona parte invece presenta una efficacia parziale ma livelli di potenza più modesti (come nel caso di **1a,b**, **2a**, e **8a,b** per i derivati morfolonici e **11a**, **12a**, **15a** e **16a** per quelli morfolinici). Questi composti presentano quindi un profilo farmacodinamico simile a quello del diazossido, che tuttavia, a livello vasale, risulta più di due ordini di grandezza meno attivo del cromakalim, dotato di una totale efficacia vasorilasciante con alti livelli di potenza.

<b>Cmpd</b>	<b>pIC50</b>	<b>E<sub>max</sub>%</b>	<b>Cmpd</b>	<b>pIC50</b>	<b>E<sub>max</sub>%</b>
<b>1a</b>	4.55	55.3	<b>9a</b>	5.17 ± 0.12	85.9 ± 6.4
<b>1b</b>	4.48 ± 0.03	65.8 ± 1.3	<b>9b</b>	n.t.	n.t.
<b>2a</b>	4.68 ± 0.04	67.5 ± 7.5	<b>10a</b>	5.17 ± 0.02	91.5 ± 1.5
<b>2b</b>	n.t.	n.t.	<b>10b</b>	n.t.	n.t.
<b>3a</b>	5.15 ± 0.03	101.2 ± 2.5	<b>11a</b>	4.55 ± 0.05	52.3 ± 4.1
<b>3b</b>	n.t.	n.t.	<b>11b</b>	n.t.	n.t.
<b>4a</b>	n.t.	n.t.	<b>12a</b>	4.64	59.9
<b>4b</b>	n.t.	n.t.	<b>12b</b>	n.t.	n.t.
<b>5a</b>	n.t.	n.t.	<b>13a</b>	n.t.	n.t.
<b>5b</b>	n.t.	n.t.	<b>13b</b>	n.t.	n.t.
<b>6a</b>	n.t.	n.t.	<b>14a</b>	n.t.	n.t.
<b>6b</b>	n.t.	n.t.	<b>14b</b>	n.t.	n.t.
<b>7a</b>	5.53 ± 0.04	98.0 ± 6.1	<b>15a</b>	4.81 ± 0.04	80.6 ± 8.2
<b>7b</b>	5.14 ± 0.03	86.8 ± 2.8	<b>15b</b>	5.22 ± 0.02	98.1 ± 2.4
<b>8a</b>	4.60 ± 0.03	56.5 ± 3.3	<b>16a</b>	4.88 ± 0.03	76.6 ± 2.1
<b>8b</b>	4.82 ± 0.07	69.7 ± 10.5	<b>16b</b>	5.62 ± 0.03	99.8 ± 1.8
<b>diazossido</b>	4.72 ± 0.04	97 ± 2	<b>cromakalim</b>	7.01 ± 0.09	98 ± 1

**Tabella 5.5:** valori relativi all'attività vasorilasciante in vitro dei composti testati (il pIC<sub>50</sub> indica la potenza, E<sub>max</sub>% l'efficacia)

### 5.2.3.3 Attività ipotensiva in vivo

Per avere una valutazione più diretta degli effetti di questi nuovi composti sui parametri emodinamici in vivo, i derivati che hanno mostrato una migliore attività cardioprotettiva (**7b**, **8a** e **15b**) sono stati somministrati a ratti maschi Wistar normotesi, registrando la pressione sistolica per 60 minuti. Come mostrato in **figura 5.3**, questi composti e il diazossido (somministrati in dosi che producono l'effetto cardioprotettivo), non mostrano effetti significativi sulla pressione sistolica. Al contrario il cromakalim (a dosi che inducono la cardioprotezione) provoca un rapido, marcato e duraturo abbassamento della pressione.



**Figura 5.3:** variazioni della pressione sistolica (espressi come % del livello basale) successive alla somministrazione intraperitoneale dei composti cardioprotettivi sintetizzati ( $40 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), di diazossido ( $40 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e di cromakalim ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ).

#### 5.2.4 Conclusioni

Alcuni dei composti sintetizzati, in particolare i morfolini **7b**, **8a** e il derivato morfolinico **15b**, hanno mostrato di possedere una buona attività cardioprotettiva in vitro, in quanto mantengono quasi invariata la capacità contrattile del miocardio dopo l'ischemia, riducendo contemporaneamente sia la quantità di LDH prodotta che l'estensione delle aree necrotiche ( $A_i/A_{\text{tot}}\%$ ).

Inoltre questi composti appaiono interagire effettivamente con i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali, poiché la loro azione viene abolita dal bloccante selettivo 5-HD.

Infine, i composti dotati del miglior profilo cardioprotettivo non mostrano di possedere una significativa attività vasorilasciante né in vitro né in vivo, presentando quindi una buona selettività per i canali  $\text{mito}K_{ATP}$  cardiaci rispetto a quelli vascolari.

Tale profilo li rende quindi potenzialmente utili per future applicazioni nella prevenzione del danno ischemico e quindi meritevoli di ulteriori approfondimenti farmacologici.

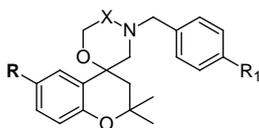
#### 5.2.5 Valutazioni dei rapporti attività-struttura

L'analisi dei dati farmacologici attualmente disponibili per i derivati spirociclici a 6 termini può già permettere di ipotizzare il ruolo che alcuni parametri strutturali, quali l'atomo di bromo in

posizione 6 dell'anello benzopiranic, la natura ammidica o amminica dell'anello spiroeterociclico o il sostituente in posizione para del gruppo *N*-benzilico possono rivestire ai fini dell'attività.

Per quanto riguarda il ruolo giocato dall'atomo di bromo, questo sembrerebbe, nella maggioranza dei composti, non esercitare alcun effetto o un effetto positivo: nel caso dei composti **7a**, **9a** e **16a** l'attività rimane pressoché invariata rispetto agli analoghi non bromurati (**7b**, **9b** e **16b**), mentre nei composti **1**, **3** e **15** quelli non sostituiti (**1a**, **3a**, **5a** e **15a**) non sono attivi mentre gli analoghi bromurati (**1b**, **3b**, **5b** e **15b**) presentano una apprezzabile attività.

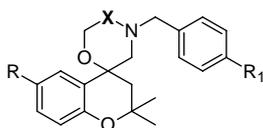
Alcune eccezioni sono costituite dai composti in cui il bromo ha un effetto negativo, in quanto mentre quelli non sostituiti **4a**, **8a** e **11a** risultano essere cardioprotettivi, i loro analoghi bromosostituiti **4b**, **8b** e **11b** non presentano alcuna attività.



Cmpd	R	RPP%	Cmpd	R	RPP%
<b>1a</b>	H	8	<b>1b</b>	Br	66
<b>3a</b>	H	1	<b>3b</b>	Br	70
<b>5a</b>	H	35	<b>5b</b>	Br	100
<b>15a</b>	H	15	<b>15b</b>	Br	89
<b>7a</b>	H	66	<b>7b</b>	Br	75
<b>9a</b>	H	92	<b>9b</b>	Br	100
<b>16a</b>	H	12	<b>16b</b>	Br	15
<b>4a</b>	H	65	<b>4b</b>	Br	31
<b>8a</b>	H	79	<b>8b</b>	Br	2
<b>11a</b>	H	100	<b>11b</b>	Br	33

**Tabella 5.6:** effetti dell'atomo di bromo in posizione C6 sull'attività dei composti testati.

Per quanto riguarda invece la natura ammidica o amminica del sostituente spiroeterociclico, che genera rispettivamente la serie morfolonica o morfolinica, i dati disponibili appaiono a volte contraddittori; mentre infatti per i composti **1b**, **6a**, **7b** e **8b** morfolonici le corrispondenti morfoline **9b**, **11a**, **15b** e **16b** mantengono l'attività cardioprotettiva, per i derivati morfolonici **4a**, **7a** e **8a** il passaggio alle corrispondenti morfoline (**13a**, **15a** e **16a**) dà luogo ad una scomparsa di attività, contrariamente a quanto si verifica per i derivati morfolonici **1a**, **3a** inattivi, le cui corrispondenti morfoline (**9a**, **11a**) risultano attive.

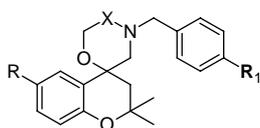


Cmpd	X	RPP%	Cmpd	X	RPP%
<b>1b</b>	CO	66	<b>9b</b>	CH <sub>2</sub>	100
<b>6a</b>	CO	100	<b>11a</b>	CH <sub>2</sub>	100
<b>7b</b>	CO	61	<b>15b</b>	CH <sub>2</sub>	89
<b>8b</b>	CO	2	<b>16b</b>	CH <sub>2</sub>	15
<b>4a</b>	CO	65	<b>13a</b>	CH <sub>2</sub>	32
<b>7a</b>	CO	66	<b>15a</b>	CH <sub>2</sub>	12
<b>8a</b>	CO	79	<b>16a</b>	CH <sub>2</sub>	15
<b>1a</b>	CO	8	<b>9a</b>	CH <sub>2</sub>	92
<b>3a</b>	CO	1	<b>11a</b>	CH <sub>2</sub>	100

**Tabella 5.7:** variazioni dell'attività nel passaggio dall'eterociclo ammidico a quello amminico.

Per quanto riguarda l'influenza del sostituente sull'anello benzilico, anche se i dati a disposizione non sono del tutto sufficienti per avanzare sicure ipotesi di SAR, consentono tuttavia di rilevare che il gruppo metansolfonammidico, mentre appare rivestire un ruolo positivo sull'attività dei derivati morfolonici **7a,b**, che risultano più attivi degli analoghi non sostituiti **1a,b**, esercita un effetto opposto in quelli morfolinici (**15a,b** rispetto a **9a,b**). Il gruppo trifluorometilico e quello acetammidico hanno un comportamento meno definito: il CF<sub>3</sub> sembra non esercitare alcun effetto sull'attività rispetto agli analoghi composti non sostituiti. La presenza del sostituente acetammidico è positiva per il derivato morfolonico **8a**, ma deleteria per l'analogo bromo-sostituito **8b** e per le morfoline **16a,b**.

Infine, in alcuni casi (**5b** e **6a**) la presenza, in para al gruppo *N*-benzilico, di sostituenti come il metossile o il gruppo amminico (definibili come attivanti per i loro effetti elettronici) sembra avere un'influenza positiva sull'attività.



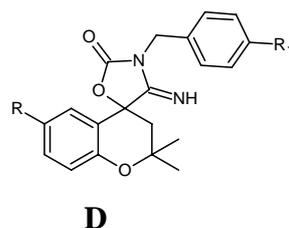
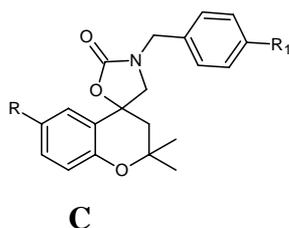
Cmpd	R <sub>1</sub>	RPP%	Cmpd	R <sub>1</sub>	RPP%
<b>1a</b>	H	8	<b>3a</b>	CF <sub>3</sub>	1
<b>1b</b>	H	66	<b>3b</b>	CF <sub>3</sub>	70
<b>9a</b>	H	92	<b>12a</b>	CF <sub>3</sub>	60
<b>9b</b>	H	100	<b>12b</b>	CF <sub>3</sub>	n.t.
<b>1a</b>	H	8	<b>7a</b>	NHMs	78
<b>1b</b>	H	66	<b>7b</b>	NHMs	61
<b>9a</b>	H	92	<b>15a</b>	NHMs	15
<b>9b</b>	H	100	<b>15b</b>	NHMs	89
<b>1a</b>	H	8	<b>8a</b>	NHAc	79
<b>1b</b>	H	66	<b>8b</b>	NHAc	2
<b>9a</b>	H	92	<b>16a</b>	NHAc	12
<b>9b</b>	H	100	<b>16b</b>	NHAc	15
<b>1a</b>	H	8	<b>6a</b>	NH <sub>2</sub>	100
<b>1b</b>	H	66	<b>5b</b>	OMe	100

**Tabella 5.8:** effetto del sostituente in posizione para all'anello benzilico.

### 5.3 Benzopirani che presentano uno spiro-eterociclo a 5 termini

I buoni risultati ottenuti nello studio dei derivati benzopiranic morfolonici e morfolinici hanno sostenuto l'ipotesi iniziale secondo la quale la rigidità dovuta ad una sostituzione spiro sul C4 benzopiranic poteva portare ad una buona selettività; è stato quindi ritenuto interessante ridurre ulteriormente la libertà conformazionale dello spiro-eterociclo, che nella struttura a sei termini possiede la residua flessibilità dell'equilibrio sedia-mezza sedia-barca.

Sono stati quindi progettati e sintetizzati i composti di tipo ossazolidinonico (**C**) e immino-ossazolidinonico (**D**); nel caso di **C** possono essere considerati gli omologhi direttamente inferiori degli spiomorfoloni **A**, mentre nel caso di **D** possono essere visti come varianti strutturali di **C** ulteriormente arricchiti di un sistema ricco di elettroni di tipo imminico. In entrambi i casi sono state mantenute sia la sostituzione in C6 con il bromo, che il raggruppamento benzilico legato all'azoto.



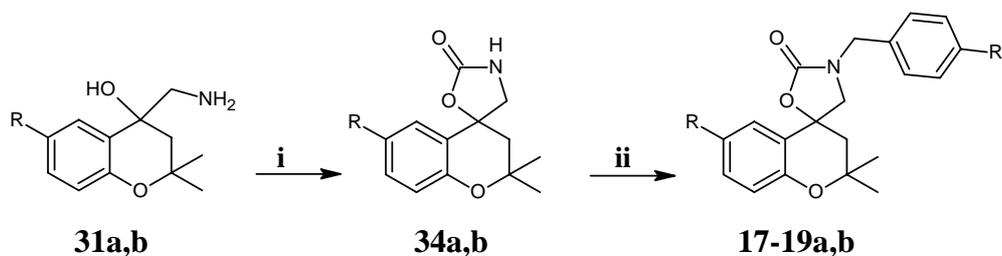
Cmpd	R	R <sub>1</sub>
17a	H	H
17b	Br	H
18a	H	NO <sub>2</sub>
18b	Br	NO <sub>2</sub>
19a	H	CF <sub>3</sub>
19b	Br	CF <sub>3</sub>
20a	H	NH <sub>2</sub>
20b	Br	NH <sub>2</sub>
21a	H	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
21b	Br	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
22a	H	NHAc
22b	Br	NHAc

Cmpd	R	R <sub>1</sub>
23a	H	H
23b	Br	H
24a	H	NH <sub>2</sub>
24b	Br	NH <sub>2</sub>
25a	H	CF <sub>3</sub>
25b	Br	CF <sub>3</sub>
26a	H	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
26b	Br	NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
27a	H	NHAc
27b	Br	NHAc

## 5.3.1 Sintesi

I composti **17a,b-22a,b** sono stati ottenuti come descritto nello **schema 5**. Gli aminoalcol **31a,b** descritti precedentemente sono stati sottoposti a reazione di ciclizzazione con carbonildiimidazolo (CDI), per ottenere i derivati ossazolidinonici **34a,b**, i quali sono stati poi sostituiti sull'azoto mediante la reazione di benzilazione con l'opportuno bromuro di benzile, per fornire i composti **17a,b-19 a,b**. I derivati **20a,b-22a,b** sono stati ottenuti, in modo del tutto analogo alle corrispondenti molecole a sei termini, mediante riduzione del nitro-gruppo nei composti **18a,b**, i quali sono quindi stati fatti reagire con metansolfonilcloruro o con anidride acetica per dare rispettivamente i composti solfonamidici **21 a,b** e quelli acetamidici **22 a,b**. (**Schema 6**).

Schema 5

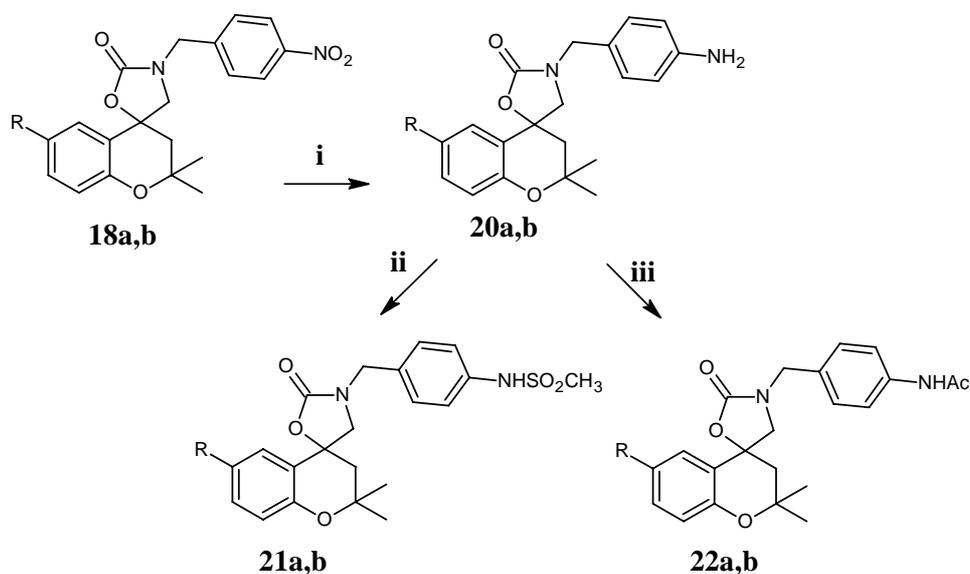


	R	R <sub>1</sub>
<b>17a</b>	H	H
<b>18a</b>	H	NO <sub>2</sub>
<b>19a</b>	H	CF <sub>3</sub>
<b>17b</b>	Br	H
<b>18b</b>	Br	NO <sub>2</sub>
<b>19b</b>	Br	CF <sub>3</sub>

**Reagenti e condizioni**

**i:** CDI, THF, 1h, t.a.; **ii:** NaH, benzilbromuro, DMF, 2h, t.a.

## Schema 6



**a:** R=H

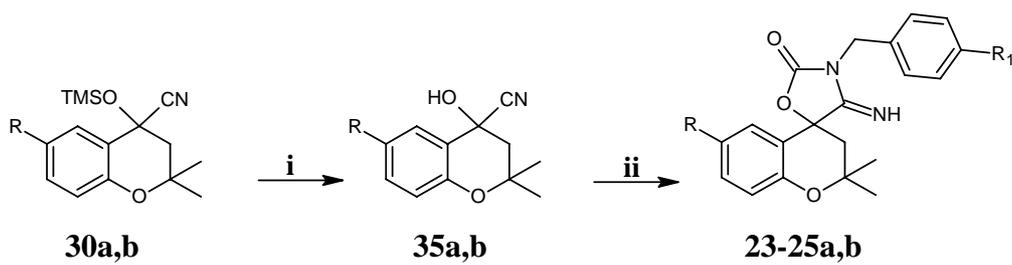
**b:** R=Br

**Reagenti e condizioni**

**i:**  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ , MeOH, 16h, refluxo; **ii:**  $\text{MeSO}_2\text{Cl}$ , Py, diossano, 1h, refluxo; **iii:**  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetone, 1h, t.a.

Per quanto riguarda la sintesi dei derivati **23a,b-25a,b**, questa è stata affrontata come descritto nello **schema 7**. Il trimetilsililderivato **30a,b** è stato deprotezionato in condizioni acide per dare la cianidrina **35a,b**; i prodotti finali **23-25** sono stati ottenuti in un unico step con una reazione one-pot a partire dall'opportuna benzilammina sostituita e carbonildiimidazolo. Infine, i derivati **26a,b-27a,b** sono stati ottenuti a partire dal composto **24a,b** per reazione con metansolfonilcloruro o anidride acetica (**schema 8**).

## Schema 7

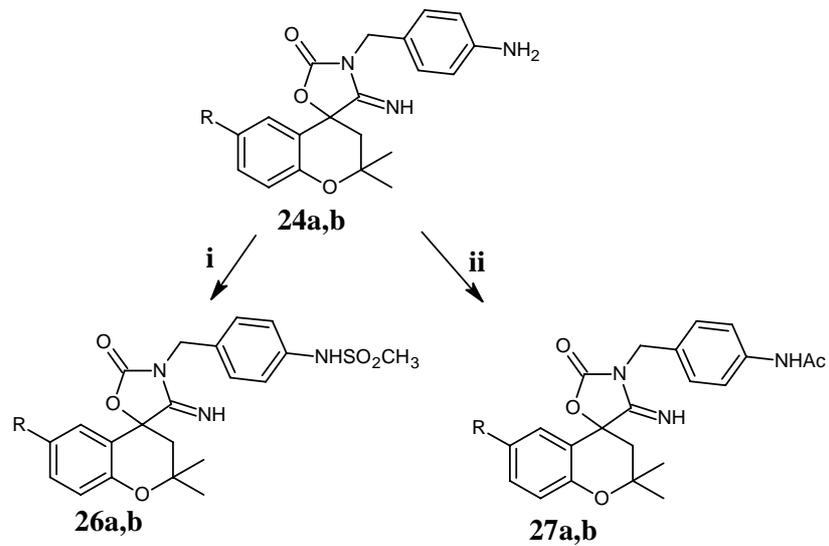


	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
<b>23a</b>	H	H
<b>24a</b>	H	NH <sub>2</sub>
<b>25a</b>	H	CF <sub>3</sub>
<b>23b</b>	Br	H
<b>24b</b>	Br	NH <sub>2</sub>
<b>25b</b>	Br	CF <sub>3</sub>

**Reagenti e condizioni**

**i:** HCl 1N, THF, 1h, refluxo; **ii:** benzilammina, CDI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> an., 2h, t.a.

## Schema 8



**a:** R=H  
**b:** R=Br

**Reagenti e condizioni**

**i:** MeSO<sub>2</sub>Cl, piridina, diossano, 1h, refluxo; **ii:** Ac<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetone, 1h, t.a.

### 5.3.2 Risultati farmacologici

La nuova serie di composti spiroeterociclici a 5 termini è stata sottoposta agli stessi test utilizzati per la precedente serie di composti, valutandone l'efficacia cardioprotettiva attraverso gli stessi parametri di tipo funzionale, biochimico e morfologico (vedi paragrafo 5.2.2).

#### 5.3.2.1 Parametro funzionale

Analogamente a quanto osservato per i derivati di tipo **A** e **B** a sei termini, anche in questa serie si possono evidenziare alcuni composti, ad esempio **26a** e **26b**, che provocano un recupero funzionale inotropico paragonabile a quello del diazossido, mentre molti altri (**21a**, **22a**, **23b**, **27a,b**) presentano valori di RPP% anche maggiori del farmaco di riferimento.

Cmpd	RPP% (30 min)	Cmpd	RPP% (30min)
<b>17a</b>	n.t.	<b>23a</b>	n.t.
<b>17b</b>	n.t.	<b>23b</b>	80 ± 47
<b>18a</b>	n.t.	<b>24a</b>	n.t.
<b>18b</b>	n.t.	<b>24b</b>	n.t.
<b>19a</b>	n.t.	<b>25a</b>	n.t.
<b>19b</b>	n.t.	<b>25b</b>	n.t.
<b>20a</b>	n.t.	<b>26a</b>	68
<b>20b</b>	n.t.	<b>26b</b>	65 ± 20
<b>21a</b>	94	<b>27a</b>	81
<b>21b</b>	n.t.	<b>27b</b>	99 ± 74
<b>22a</b>	143 ± 89	<b>diazossido</b>	69 ± 31
<b>22b</b>	n.t.	<b>veicolo</b>	23 ± 12

**Tabella 5.9:** valori di RPP% al 30° minuto di riperfusione

#### 5.3.2.2 Parametro biochimico

I dati riportati in **tabella 5.7** mostrano che solo pochi composti di questa nuova serie presentano elevate quantità di enzima lattato deidrogenasi al 120° minuto di riperfusione; in particolare il derivato ossazolidinonico **21a** e quelli immino-ossazolidinonici **26b** e **27a**. Gli altri composti presentano invece valori di LDH oltre che inferiori al veicolo, spesso inferiori a quelli

dello stesso farmaco di riferimento diazossido, come ad esempio nei casi di **21b**, **22a**, **23b**, **26a** e **27b**.

<b>Cmpd</b>	<b>LDH (U/g) (120 min)</b>	<b>Cmpd</b>	<b>LDH(U/g) (120 min)</b>
<b>17a</b>	n.t.	<b>23a</b>	n.t.
<b>17b</b>	n.t.	<b>23b</b>	1.74
<b>18a</b>	n.t.	<b>24a</b>	n.t.
<b>18b</b>	n.t.	<b>24b</b>	n.t.
<b>19a</b>	n.t.	<b>25a</b>	n.t.
<b>19b</b>	n.t.	<b>25b</b>	n.t.
<b>20a</b>	n.t.	<b>26a</b>	3.6
<b>20b</b>	n.t.	<b>26b</b>	10.5
<b>21a</b>	10.3	<b>27a</b>	10.9
<b>21b</b>	5.9	<b>27b</b>	2.8
<b>22a</b>	4.1	<b>diazossido</b>	5.6
<b>22b</b>	n.t.	<b>veicolo</b>	8.7

**Tabella 5.10:** valori di LDH (marker biochimico di ischemia) misurati al termine della riperfusione.

### 5.3.2.3 Parametro morfologico

Per quanto riguarda i dati relativi alla percentuale di area ischemica riportati nella **tabella 5.8**, si può osservare che i composti **23b** e **27a** presentano valori di  $A_i/A_{tot}\%$  compresi tra 22 e 28, quindi molto vicini a quelli del diazossido; gli altri composti testati presentano invece valori simili o superiori a quelli del veicolo.

Cmpd	$A_i/A_{tot}$ %	Cmpd	$A_i/A_{tot}$ %
<b>17a</b>	n.t.	<b>23a</b>	n.t.
<b>17b</b>	n.t.	<b>23b</b>	28 ± 3
<b>18a</b>	n.t.	<b>24a</b>	n.t.
<b>18b</b>	n.t.	<b>24b</b>	n.t.
<b>19a</b>	n.t.	<b>25a</b>	n.t.
<b>19b</b>	n.t.	<b>25b</b>	n.t.
<b>20a</b>	n.t.	<b>26a</b>	49 ± 3
<b>20b</b>	n.t.	<b>26b</b>	36 ± 5
<b>21a</b>	55 ± 6	<b>27a</b>	22 ± 3
<b>21b</b>	n.t.	<b>27b</b>	n.t.
<b>22a</b>	34 ± 5	<b>diazossido</b>	22 ± 6
<b>22b</b>	n.t.	<b>veicolo</b>	35 ± 7

**Tabella 5.11:** valori di  $A_i/A_{tot}$  % al 30° minuto di riperfusione.

### Discussione e conclusioni

I dati farmacologici preliminari (e basati su un numero ridotto di esperimenti) relativi al limitato numero di derivati spirociclici a 5 termini saggiati indicano che i composti **23b** e **27a** sembrano possedere buone caratteristiche cardioprotettive, in quanto inducono un notevole recupero inotropico post-ischemico (RPP= 80 e 81, rispettivamente) e riducono sia la quantità di LDH prodotta (1.7 e 2.4, rispettivamente) che la percentuale di area necrotica ( $A_i/A_{tot}$  % = 23 e 22%, rispettivamente). Tuttavia, i test condotti parzialmente su questa nuova serie di composti hanno evidenziato una possibile attività cardiotossica, in quanto i derivati fino ad ora saggiati hanno dato luogo ad episodi di fibrillazione cardiaca. Tale fenomeno potrebbe avere diverse motivazioni, quali ad esempio una cardiotossicità legata ad una dose eccessiva di farmaco o una intrinseca attività tossica legata all'attivazione di altri processi biochimici a livello del miocardio.

I futuri studi farmacologici saranno quindi rivolti ad approfondire le cause di tale comportamento, oltre che ad analizzare, come per la serie dei composti a 6 termini, sia l'effettivo coinvolgimento dei canali mito $K_{ATP}$  nell'attività cardioprotettiva osservata, utilizzando un bloccante specifico di questi canali quale il 5-idrossi decanoato, sia la selettività per i canali  $K_{ATP}$  cardiaci rispetto a quelli vascolari, valutando l'eventuale attività vasorilasciante.

## Bibliografia

1. Amoroso S., Schmidt-Antomarchi H., Fosset M., Lazdunski M. *Science* 1990, 247, 852-854
2. Quale J.M., Standen N.B. *Cardiovasc. Res.* 1994, 28 (6) 797-804
3. Gross E.R., Gross G.J. *Cardiovasc. Res.* 2006, 70, 212-221
4. Garlid K.D., Puddu P.E., Pasdois P., Costa A.D., Beauvoit B., Criniti A., Tariosse L., Diolez P., Dos Santos P. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006, 291, 2067-2074
5. Garlid K.D., Pauceck P., Yarov-Yarovoy B., Murray H.N.M., Darbenzio R.B., D'Alonzo A.J., Lodge N.J., Smith M.A., Grover G.J. *Circ. Res.* 1997, 81, 1072-1082
6. Liu Y., Sato T., Seharaseyon J., Szewczyk A., O'Rourke B., Marban E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999, 874, 27-37
7. Testai L., Rapposelli S., Calderone V. *Cardiovasc. Haematol. Agents Med. Chem.* In press
8. Mannhold R. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006, 6 (10), 1031-1047
9. Nielsen F.E., Ebdrup S., Jensen A.F., Ynddal L., Bodvarsdottir T.B., Stidsen C., Worsaal A., Boonen H.C., Arkhammar P.O., Fremming T., Wahl P., Korno H.T., Hansen J.B. *J. Med. Chem.* 2006, 49 (14), 4127-4139
10. Atwal K.S., Ferrara F.N., Ding C.Z., Grover G.J., Sleph P.G., Dwonczyk S., Baird A., Normandin D.E. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 304-313
11. Grover G.J., D'Alonzo A.J., Garlid K.D., Bajgar R., Lodge N.J., Sleph P.G., Darbenzio R., Hess T.A., Smith M.A., Pauceck P., Atwal K.S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297, 1184-1192
12. Thomas W.A., Whitcombe I.W.A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1990, 528-529
13. Gadwood R.C., Kamdar B.V., Cipkus Dubray L.A., Wolfe M.L., Smith M.P., Watt W., Mizesak S.A., Groppit V.E. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1480-1487

## 6. Parte sperimentale

### 6.1 Chimica

#### 6.1.1 Materiali e metodi

La struttura di tutti i composti è stata controllata per mezzo della spettrometria IR e NMR. Gli spettri infrarossi sono stati eseguiti sulla sostanza pura in caso di liquidi ed in sospensione di olio di vaselina in caso di solidi, usando uno spettrofotometro Unicam Mattson 1000 FTIR. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Varian Gemini 200 operante a 200 MHz. Le soluzioni erano ca. 10% in  $\text{CDCl}_3$ , usando come standard interno il TMS, ed in DMSO; i chemical shifts sono stati espressi in ppm scala  $\delta$ .

Degli spettri IR e NMR vengono riportati solo i particolari più significativi.

I punti di fusione sono stati determinati al microscopio di Kofler e non sono stati corretti.

Le analisi elementari sono state eseguite dal nostro laboratorio di Chimica Analitica; la differenza tra i valori teorici e quelli ottenuti è risultata compresa in un intervallo di  $\pm 0.4\%$ .

Le evaporazioni sono state eseguite in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Per le cromatografie su colonna è stato usato gel di silice 70-230 Mesh. Per le TLC preparative sono state utilizzate lastre Merk di gel di silice G60 con indicatore fluorescenza 20 x 20.2 mm.

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrofotometro Hewlett Packard 5988° per introduzione diretta di un'energia nominale di 70 eV ad una temperatura di 350°C.

Il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  è stato fatto rifluire su  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

### Preparazione generale dei derivati 2,2-dimetil-cromanici-4-spiromorfolonici-*N*-benzilsostituiti (1-5a,b)

Ad una sospensione di NaH (0.27 g, 13 mmol, dispersione in olio minerale al 60%) in DMF anidra (10 ml) posta sotto atmosfera di azoto si aggiunge il derivato morfolonico **33a,b** (4 mmol) e la miscela viene lasciata a t.a. per 30 min. Trascorso tale periodo la sospensione viene posta a 0°C e viene aggiunta goccia a goccia una soluzione dell'opportuno benzilbromuro (5 mmol) in DMF (2 ml). La miscela viene lasciata a t.a. per 1.5 h, quindi diluita con H<sub>2</sub>O e AcOEt. La fase organica viene lavata più volte con ghiaccio e soluzione satura di NaCl, essiccata ed evaporata per fornire i composti desiderati.

✓ **4'-benzil-2,2-dimetil-2,3-diidro-5'*H*-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 1a:**

purificato mediante triturazione con etere etilico (87%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.09 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.23 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 1.71 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.07 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 3.8 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 4.21 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 4.29 (d, 1H, *J*=17.2 Hz); 4.40 (d, 1H, *J*=17.2 Hz); 5.05 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 6.77-6.81 (m, 1H); 6.86-6.93 (m, 1H); 7.15-7.38 (m, 7H) ppm. Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **4'-benzil-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-5'*H*-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 1b:**

purificato mediante triturazione con etere etilico (67%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.06 (s, 3H); 1.29 (s, 3H); 1.70 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.2 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.06 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.75 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 4.24 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 4.27 (d, 1H, *J*=17.4 Hz); 4.41 (d, 1H, *J*=17.4 Hz); 5.03 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 6.68 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.27-7.35 (m, 6H); 7.49 (d, 1H, *J*=2.5 Hz) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: [166.27, C=O], [152.90, 135.99, 133.18, 130.20, 128.96, 128.21, 120.13, 112.86, Ar] [74.81, 69.11, 63.74, 55.12, 49.83, 39.54, 28.47, 26.34, alifatici] ppm. MS (*m/z*): 417 (M<sup>+</sup>, 22%); 91 (100%) Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidro-5'*H*-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one 2a:**

purificato mediante cromatografia usando una miscela di n-esano/AcOEt (1:1) (44%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.24 (s, 3H); 1.33 (s, 3H); 1.74 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.31 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.06 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 3.83 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 4.31 (d, 1H, *J*=11.0 Hz); 4.40 (d, 1H, *J*=11.0 Hz); 4.53 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 4.90 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 6.78-6.98 (m, 1H); 7.16-7.24 (m, 2H); 7.31-7.36

(m, 1H); 7.47 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz); 8.20 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz) ppm. MS ( $m/z$ ): 382 ( $M^+$ , 60%); 177 (100%) Anal. Calc.  $C_{21}H_{22}N_2O_5$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 2b**: purificato mediante cromatografia usando una miscela di n-esano/AcOEt (1:1) (54%)  
 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.22 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.71 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.28 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.06 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 3.77 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 4.26 (d, 1H,  $J=17.7$  Hz); 4.40 (d, 1H,  $J=17.7$  Hz); 4.60 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 4.81 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 6.69 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz); 7.28 (dd, 1H,  $J=8.8$ ; 2.4 Hz); 7.42 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz); 7.48 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz); 8.2 (d, 2H,  $J=8.8$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $C_{21}H_{21}BrN_2O_5$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-trifluorometilbenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one 3a**: purificato tramite triturazione con  $Et_2O$  (87%)  
 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.18 (s, 3H); 1.33 (s, 3H); 1.71 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.27 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.05 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 3.82 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 4.26-4.47 (m, 3H); 4.96 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 6.79-6.94 (m, 2H); 7.20 (dd, 1H,  $J=8.2$ ; 1.6 Hz); 7.35 (dd, 1H,  $J=7.7$ ; 1.6 Hz); 7.43 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz); 7.61 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz) ppm.  
 $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : [167.47, C=O] [154.41, 140.87, 131.03, 129.78, 127.85, 122.28, 121.49, 119.03, Ar][74.84, 69.89, 64.34, 56.63, 50.37, 40.76, 29.74, 26.63, alifatici] ppm. MS ( $m/z$ ): 405 ( $M^+$ , 2%); 159 (47%) Anal. Calc.  $C_{22}H_{22}F_3NO_3$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-trifluorometilbenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 3b**: purificato mediante triturazione con  $Et_2O$  (60%)  
 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.15 (s, 3H); 1.30 (s, 3H); 1.69 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.24 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.05 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 3.77 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 4.28 (d, 1H,  $J=17.6$  Hz); 4.41 (d, 1H,  $J=17.6$  Hz); 4.44 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 4.91 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 6.69 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz); 7.27-7.32 (m, 1H); 7.41-7.49 (m, 3H); 7.62 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) ppm.  
 MS ( $m/z$ ): 484 ( $M^+$ , 22%); 159 (100%) Anal. Calc.  $C_{22}H_{21}BrF_3NO_3$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metilbenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one 4a**: purificato tramite triturazione con  $Et_2O$  (19%)  
 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.13 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.70 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.23 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.33 (s, 3H); 3.05 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.76 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 4.22 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 4.30 (d,

1H,  $J=17.1$  Hz); 4.40 (d, 1H,  $J=17.3$  Hz); 4.96 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 6.77-6.93 (m, 2H); 7.16 -7.26 (m, 5H); 7.34-7.38 (m, 1H) ppm.

Anal. Calc.  $C_{22}H_{25}NO_3$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-metilbenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 4b**: purificato mediante precipitazione in  $Et_2O$ /esano (18%)

pf: 80-85 °C

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.10 (s, 3H); 1.29 (s, 3H); 1.68 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.20 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.33 (s, 3H); 3.01 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.72 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 4.22-4.44 (m, 3H); 4.93 (d, 1H,  $J=14.2$  Hz); 6.68 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.12-7.23 (m, 4H); 7.28-7.31 (m, 1H); 7.47 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $C_{22}H_{24}BrNO_3$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metossibenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one 5a**: purificato mediante triturazione in  $Et_2O$  (20%)

pf: 105-108°C

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1.14 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.70 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.23 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.06 (d, 1H,  $J=12.4$  Hz); 3.73-3.79 (m, 4H); 4.2 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 4.27 (d, 1H,  $J=17.4$  Hz); 4.38 (d, 1H,  $J=17.4$  Hz); 4.93 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 6.76-6.93 (m, 3H); 7.16-7.26 (m, 4 H); 7.31-7.37 (m, 1H) ppm. Anal. Calc.  $C_{22}H_{25}NO_4$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-metossibenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 5b** purificato mediante cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (17%)

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.11 (s, 3H); 1.30 (s, 3H); 1.67 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 2.20 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 3.05 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.70 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.79 (s, 3H); 4.23 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 4.25 (d, 1H,  $J=17.5$  Hz); 4.38 (d, 1H,  $J=17.5$  Hz); 4.90 (d, 1H,  $J=14.1$  Hz); 6.68 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 6.84-6.91 (m, 2H); 7.19-7.31 (m, 3H); 7.47 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $C_{22}H_{24}BrNO_4$  (C, H, N)

### Procedura generale per la preparazione dei derivati morfolonici *N*-benzilamminici (6a,b)

Ad una soluzione del derivato 4-nitrobenzil-sostituito **2a,b** (4 mmol) in MeOH (50 ml) è stato aggiunto carbone (0.216 g) e una quantità catalitica di  $FeCl_3$ . La miscela di reazione è stata portata a 66°C, quindi è stata aggiunta lentamente idrazina idrata (3.22 ml, 66 mmol). La miscela è stata

lasciata sotto agitazione a riflusso per una notte, quindi filtrata su setto di celite lavando molte volte con MeOH.

Il solvente è stato concentrato, il residuo ripreso con cloroformio, seccato ed evaporato per dare un solido giallo.

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-amminobenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one**  
**6a**: purificato tramite cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (85%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.14 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.71 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.22 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.06 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.74 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 4.11 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 4.25 (d, 1H, *J*=17.5 Hz); 4.35 (d, 1H, *J*=17.5 Hz); 4.90 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 6.63 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 6.77-6.95 (m, 2H); 7.07 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 7.16-7.21 (m, 1H); 7.34-7.38 (m, 1H) ppm. MS (*m/z*): 352 (M<sup>+</sup>, 29%); 106 (100%) Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-amminobenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinan]-5'-one** **6b**: purificato tramite cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (87%)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) δ: 1.10 (s, 3H); 1.23 (s, 3H); 1.64 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.30 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.03 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.78 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 4.08 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 4.22 (s, 2H); 4.63 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 6.52 (d, 2H, *J*=8.2 Hz); 6.80-6.87 (m, 1H); 6.95 (d, 2H, *J*=8.0 Hz); 7.36 (dd, 1H, *J*=8.4; 2.4 Hz); 7.57 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm.

Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

**Metodo generale per la sintesi dei derivati morfolonici N-benzilsolfonammidici (7a,b)**

Ad una soluzione del derivato anilिनico **6a,b** (1 mmol) in diossano anidro (10.8 ml) posta sotto atmosfera di azoto viene aggiunta piridina (1.08 ml, 10.6 mmol), quindi la soluzione viene posta a 0°C e viene aggiunto lentamente metansolfonilcloruro (0.1 ml, 1.3 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a riflusso per 1 h, quindi acidificata ed estratta con AcOEt. La fase organica è stata essiccata ed evaporata.

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metansolfonamidobenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'**

**[1,4]ossazinan]-5'-one 7a:** purificato tramite triturazione con esano (64%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.19 (s, 3H); 1.33 (s, 3H); 1.73 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.28 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.01 (s, 3H); 3.07 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 3.79 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 4.29 (d, 1H, *J*=17.0 Hz); 4.34 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 4.42 (d, 1H, *J*=17.0 Hz); 4.85 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 6.78-6.94 (m, 2H); 7.17-7.27 (m, 5H); 7.31-7.37 (m, 1H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: [166.50, C=O] [154.86, 136.47, 130.42, 129.73, 127.42, 120.92, 120.21, 118.39, Ar] [74.36, 65.64, 63.78, 55.62, 45.10, 40.60, 39.60, 29.22, 28.10, alifatici] ppm. MS (*m/z*): 430 (M<sup>+</sup>, 17%); 184 (100%) Anal. Calc. C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-metansolfonamidobenzil)-2,3-diidro-5'H**

**spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 7b:** purificato tramite cromatografia usando una miscela di CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9.5:0.5) (47%)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) δ: 1.13 (s, 3H); 1.24 (s, 3H); 1.68 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.35 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.96 (s, 3H); 3.09 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 3.90 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 4.25 (s, 2H); 4.32 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 4.67 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 6.74 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.17 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 7.29 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 7.36 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.4 Hz); 7.59 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: [166.39, C=O] [152.90; 138.08; 133.24, 130.12, 129.58, 123.86, 120.18, 112.84, Ar] [74.81, 69.11, 63.65, 55.27, 49.46, 40.49, 39.68, 28.35, 26.12, alifatici] ppm. MS (*m/z*): 510 (M<sup>+</sup>, 5%); 184 (100%) Anal. Calc. C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

**Metodo generale per la sintesi dei derivati morfolonici N-benzilacetamidici (8a,b)**

Ad una soluzione dell'opportuno composto **6a,b** (0.514 mmol) in acetone (3 ml) vengono aggiunti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (106.5 mg, 1.16 mmol) e anidride acetica (0.1 ml, 0.514 mmol). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a t.a. per 1h, dopodiché il solvente è stato evaporato. Il residuo è stato ripreso con AcOEt, lavato con acqua, e la fase organica essiccata ed evaporata.

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-acetamidobenzil)-2,3-diidro-5'H-spiro[cromene-4,2'**

**[1,4]ossazinan]-5'-one 8a:** purificato tramite triturazione con Et<sub>2</sub>O (97%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.18 (s, 3H); 1.32 (s, 3H); 1.73 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.17 (s, 3H); 2.26 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.06 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.78 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 4.23-4.44 (m, 3H); 4.88 (d, 1H, *J*=14.2 Hz); 6.78-6.94 (m, 2H); 7.16-7.26 (m, 3H); 7.33-7.37 (m, 1H), 7.47-7.51 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : [166.94, C=O] [153.76, 136.97, 132.97, 130.36, 130.18, 127.27, 120.93, 120.82, 118.34, Ar] [74.26, 69.22, 67.23, 63.66, 55.73, 49.53, 29.14, 26.05, alifatici] ppm. MS ( $m/z$ ): 394 ( $\text{M}^+$ , 12%); 146 (100%). Anal. Calc.  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-acetamidobenzil)-2,3-diidro-5'H spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 8b**: purificato tramite triturazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  (70%)

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.16 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.71 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 2.08-2.27 (m, 4H); 3.06 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.73 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 4.23-4.44 (m, 3H); 4.84 (d, 1H,  $J=14.2$  Hz); 6.69 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.21-7.32 (m, 3H); 7.46-7.53 (m, 2H); 7.69 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : [165.94, C=O] [152.30, 136.28, 132.67, 132.33, 129.63, 129.45, 123.20, 120.35, 119.62, 112.22, Ar] [74.19, 68.45, 63.03, 54.92, 48.82, 39.92, 28.41, 25.44, alifatici] ppm. Anal. Calc.  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$  (C, H, N)

#### Procedura generale per la riduzione dei derivati morfolonici con $\text{LiAlH}_4$ (9a-14a)

Ad una soluzione di  $\text{LiAlH}_4$  1M in THF (8.3 mmol) è stato aggiunto il composto **1a** (2.07 mmol) sciolto nella minima quantità di THF.

La miscela è stata lasciata sotto agitazione a riflusso per 1 ora, quindi diluita con  $\text{H}_2\text{O}$  (0.15 ml),  $\text{NaOH}$  (0.15 ml) e  $\text{H}_2\text{O}$  (0.45 ml). I sali di litio sono stati filtrati e lavati più volte con THF. La fase organica è stata evaporata a pressione ridotta per dare un olio trasparente.

✓ **4'-benzil-2,2-dimetil-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 9a**: purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da  $\text{IprOH}$  (60%)

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.25 (s, 3H); 1.36 (s, 3H); 2.15 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.41-2.60 (m, 4H); 2.71-2.77 (m, 1H); 3.37 (d, 1H,  $J=13.0$  Hz); 3.60 (d, 1H,  $J=13.0$  Hz); 3.71-3.80 (m, 1H); 3.90-4.02 (m, 1H); 6.77 (d, 1H,  $J=8.05$  Hz); 6.88-6.96 (m, 1H); 7.12-7.20 (m, 1H); 7.22-7.32 (m, 5H); 7.61 (d, 1H,  $J=7.7$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_2 \text{HCl}$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 10a**: purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da  $\text{IprOH}$  (20%)

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.30 (s, 3H); 1.36 (s, 3H); 2.07 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.39-2.60 (m, 4H); 2.69-2.75 (m, 1H); 3.48 (d, 1H,  $J=13.9$  Hz); 3.65 (d, 1H,  $J=13.7$  Hz); 3.73-3.81 (m, 1H); 3.91-4.0 (m, 1H); 6.79 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz); 6.88-6.96 (m, 1H); 7.13-7.22 (m, 1H); 7.52 (d, 2H,  $J=8.6$  Hz); 7.60 (d, 1H,  $J=7.8$  Hz); 8.17 (d, 2H,  $J=8.7$  Hz) ppm.

MS ( $m/z$ ): 368 ( $\text{M}^+$ , 4%); 277 (100%) Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-aminobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 11a:**

purificato mediante cromatografia flash usando come eluente una miscela di esano/AcOEt (3:2)(30%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.26 (s, 3H); 1.35 (s, 3H); 2.12 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.43-2.59 (m, 2H); 2.70 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.24 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.49 (d, 1H, *J*=12.6 Hz); 3.60 (s broad, 2H); 3.71-3.78 (m, 2H); 3.87-4.0 (m, 2H); 6.62 (d, 2H, *J*=8.2 Hz); 6.75-6.79 (m, 1H); 6.87-6.95 (m, 1H); 7.08 (d, 2H, *J*=8.2 Hz); 7.15-7.20 (m, 1H); 7.59-7.62 (m, 1H) ppm. MS (*m/z*): 338 (M<sup>+</sup>, 28%) Anal.Calc. C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-trifluorometilbenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 12a:**

purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (25%)

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.29 (s, 3H); 1.38 (s, 3H); 2.04 (d, 1H, *J*=15.3 Hz); 2.73 (d, 1H, *J*=15.3 Hz); 3.22-3.65 (m, 4H); 3.95-4.18 (m, 2H); 4.46-4.64 (m, 2H); 6.77-6.82 (m, 1H); 6.95-7.03 (m, 1H); 7.21-7.30 (m, 2H); 7.76-7.92 (m, 4H) ppm. MS (*m/z*): 391 (M<sup>+</sup>, 15%); 159 (45%); 214 (100%). Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> HCl (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metilbenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 13a:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (43%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.27 (s, 3H); 1.35 (s, 3H); 2.08-2.25 (m, 3H); 2.32 (s, 3H); 2.39-2.75 (m, 3H); 3.33 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 3.54 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 3.65-3.77 (m, 1H); 3.88-4.01 (m, 1H); 6.75-6.79 (m, 1H); 6.87-6.95 (m, 2H); 7.08-7.22 (m, 4H); 7.59-7.63 (m, 1H) ppm. Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub> (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metossibenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 14a:**

purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (37%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.27 (s, 3H); 1.36 (s, 3H); 2.13 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.33-2.59 (m, 4H); 2.30 (d, 1H, *J*=12.7 Hz); 2.70-2.75 (m, 1H); 3.53 (d, 1H, *J*=12.7 Hz); 3.72-4.01 (m, 2H); 3.79 (s, 3H); 6.76-6.95 (m, 4H); 7.12-7.26 (m, 3H); 7.62 (d, 1H, *J*=7.7 Hz) ppm. Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub> (C, H, N)

**Riduzione dei derivati morfolonici con complesso di borano (9b-14b)**

Ad una soluzione di composto **1b** (0.43 mmol) in THF (2 ml) è stata aggiunta una soluzione di  $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$  2M in THF (0.15 ml, 1.72 mmol).

La miscela è stata sottoposta ad irraggiamento con microonde a 50W e 70°C per 30 min. Dopo raffreddamento, la soluzione è stata diluita con  $\text{H}_2\text{O}$  e il THF rimosso a pressione ridotta. La fase acquosa è stata acidificata, neutralizzata e infine estratta con AcOEt. Le fasi organiche riunite sono state seccate ed evaporate.

✓ **4'-benzil-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 9b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (46%)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$ : 1.22 (s, 3H); 1.25 (s, 3H); 2.40 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.63 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 3.05-3.27 (m, 2H); 3.56-3.66 (m, 2H); 3.88-4.08 (m, 2H); 4.22-4.46 (m, 2H); 6.74 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.33-7.51 (m, 4H); 7.67-7.75 (m, 3H) ppm.

Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{BrNO}_2 \cdot \text{HCl}$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinano] 10b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (29%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.29 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 2.04 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.72 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 3.41-3.60 (m, 4H); 3.97-4.18 (m, 2H); 4.45-4.57 (m, 2H); 6.74 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.37 (dd, 1H,  $J=8.6$ ; 2.1 Hz); 7.76 (d, 1H,  $J=2.1$  Hz); 7.85 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz); 8.34 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz) ppm. MS ( $m/z$ ): 446  $\text{M}^+$ , 15%; 191 (100%) Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-aminobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinano] 11b:** purificato mediante cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (70%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.25 (s, 3H); 1.35 (s, 3H); 2.06 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.36 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.48-2.54 (m, 1H); 2.66-2.71 (m, 1H); 3.26 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.47 (d, 1H,  $J=12.6$  Hz); 3.62 (s broad, 2H); 3.70-3.79 (m, 2H); 3.88-3.95 (m, 2H); 6.61-6.86 (m, 3H); 7.09 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz); 7.24 (dd, 1H,  $J=8.6$ ; 2.4 Hz); 7.83 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$  (C, H, N) MS ( $m/z$ ): 416 ( $\text{M}^+$ , 9%); 106 (100%)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-trifluorometilbenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinano] 12b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (50%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.27 (s, 3H); 1.32 (s, 3H); 2.55 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 2.82 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 2.96-3.03 (m, 3H); 3.68-3.74 (m, 1H); 3.89-4.0 (m, 2H); 4.53-4.76 (m, 2H); 6.70 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.31 (dd, 1H,  $J=8.7$ ; 2.3 Hz); 7.46 (d, 1H,  $J=2.2$  Hz); 7.70 (d, 2H,  $J=7.8$  Hz); 7.97 (d, 2H,  $J=7.8$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BrF}_3\text{NO}_2\cdot\text{HCl}$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-metilbenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'**

**[1,4]ossazinano] 13b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato (33%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.28 (s, 3H); 1.35 (s, 3H); 2.02 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.37 (s, 3H); 2.68 (d, 1H,  $J=14.8$  Hz); 3.16-3.58 (m, 4H); 3.96-4.16 (m, 2H); 4.29-4.47 (m, 2H); 6.74 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.21-7.40 (m, 3H); 7.46 (d, 2H,  $J=7.7$  Hz); 7.35 (s, 1H) ppm.

**Metodo generale per la sintesi dei derivati morfolinici *N*-benzilsolfonamidici (15a,b)**

Ad una soluzione dell'opportuno composto **11a,b** (0.74 mmol) in diossano anidro (7.4 ml) posta sotto atmosfera di azoto viene aggiunta piridina (0.74 ml, 7.34 mmol), quindi la soluzione viene posta a  $0^\circ\text{C}$  e viene aggiunto lentamente metansolfonilcloruro (0.07 ml, 0.88 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a riflusso per 1 h, quindi acidificata ed estratta con AcOEt. La fase organica, essiccata ed evaporata, ha fornito i derivati metansolfonamidici desiderati.

✓ **2,2-dimetil-4'-(4-metansolfonamidobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano]**

**15a:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (22%)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$ : 1.25 (s, 6H); 2.32 (d, 1H,  $J=15.5$  Hz); 2.64 (d, 1H,  $J=15$  Hz); 3.01 (s, 3H); 3.26 (s broad, 2H); 3.53 (s broad, 2H); 3.85-4.1 (m, 2H); 4.15-4.45 (m, 2H); 6.77 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz); 6.92-7.0 (m, 1H); 7.21-7.25 (m, 3H); 7.53-7.61 (m, 3H) ppm.

MS ( $m/z$ ): 416 ( $\text{M}^+$ , 5%); 184 (100%) Anal. Calc.  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}\cdot\text{HCl}$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-metansolfonamidobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'**

**[1,4]ossazinano] 15b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (53%)

p.f.:  $178-180^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)  $\delta$  (ppm): 1.25 (s, 6H); 2.41 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.63 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 3.01 (s, 3H); 3.2-3.35 (m, 2H); 3.56-3.94 (m, 4H); 4.17-4.43 (m, 2H); 6.75 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.23 (d, 2H,

$J=8.2$  Hz); 7.4 (dd, 1H,  $J=8.7$ ; 2.3 Hz); 7.62 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz); 7.75 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $C_{22}H_{27}BrN_2O_4S \cdot HCl$  (C, H, N)

### Metodo generale per la sintesi dei derivati morfolinici *N*-benzilacetamidici (16a,b)

Ad una soluzione dell'opportuno composto **11a,b** (0.77 mmol) in acetone (4.5 ml) vengono aggiunti  $K_2CO_3$  (243 mg, 1.74 mmol) e anidride acetica (0.15 ml, 0.77 mmol). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a t.a. per 1 h, dopodiché il solvente è stato evaporato. Il residuo è stato ripreso con AcOEt, lavato con acqua, e la fase organica essiccata ed evaporata per fornire i derivati acetamidici 16a,b.

- ✓ **2,2-dimetil-4'-(4-acetamidobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinano] 16a:**  
purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (68%)

$^1H$ -NMR (DMSO)  $\delta$ : 1.25 (s, 6H); 2.04 (s, 3H); 2.32 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.65 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 3.02-3.08 (m, 1H); 3.26 (s broad, 2H); 3.46-3.59 (m, 1H); 3.86-4.13 (m, 2H); 4.19-4.34 (m, 2H); 6.75-6.79 (m, 1H); 6.92-7.0 (m, 1H); 7.20-7.28 (m, 1H), 7.52-7.66 (m, 5H) ppm.

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : [161.61, 130.37, 129.82, 129.37, 128.07, 120.46, 119.92, 117.90, 115.13, Ar] [74.78, 70.43, 63.56, 62.98, 61.16, 54.0, 40.60, 29.98, 29.28, alifatici] ppm.

Anal. Calc.  $C_{22}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$  (C, H, N)

- ✓ **6-bromo-2,2-dimetil-4'-(4-acetamidobenzil)-2,3-diidrospiro[cromene-4,2' [1,4]ossazinano] 16b:** purificato mediante trasformazione nel corrispondente cloridrato e cristallizzazione da IprOH (54%)

$^1H$ -NMR (DMSO)  $\delta$  (ppm): 1.25 (s, 6H); 2.04 (s, 3H); 2.33 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 2.63 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 3.08-3.4 (m, 4H); 3.9-4.06 (m, 2H); 4.15-4.45 (m, 2H); 6.76 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 7.18-7.22 (m, 2H); 7.4 (dd, 1H,  $J=8.7$ ; 2.2 Hz); 7.51-7.63 (m, 2H); 7.76 (d, 1H,  $J=2.2$  Hz) ppm.

$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : [161.61, 154.88, 132.26, 131.17, 129.84, 119.95, 119.75, Ar] [65.64, 63.49, 62.91, 61.21, 53.88, 40.86, 40.62, 29.33, 26.85, alifatici] ppm.

Anal. Calc.  $C_{22}H_{27}BrN_2O_3 \cdot HCl$  (C, H, N)

**Metodo generale per la sintesi dei derivati *N*-benzil-ossazolidinonici (17-19 a,b)**

Ad una sospensione di NaH (dispersione in olio minerale al 60%; 13.52 mmoli) in DMF (30 ml), posta sotto N<sub>2</sub>, viene aggiunto l'opportuno ossazolidinone **34a,b** (4.51 mmoli) e la miscela è mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa 30 minuti. Si porta poi a 0°C e si aggiunge goccia a goccia l'opportuno benzilbromuro (5.41 ml), solubilizzato nella minima quantità di DMF. La miscela è riportata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 1.5 h. Trascorso tale periodo si porta a 0°C e si aggiunge acqua. La miscela viene diluita con AcOEt e lavata con ghiaccio e soluzione satura di NaCl. La fase organica è quindi essiccata ed evaporata.

✓ **3'-benzil-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 17a:**

purificato mediante triturazione con esano (50%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.38 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 2.07 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.39 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.40 (d, 1H, *J*=9.1 Hz); 3.67 (d, 1H, *J*=9.1 Hz); 4.50 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 4.58 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 6.78-6.82 (m, 1H); 6.86-6.94 (m, 1H); 7.18-7.26 (m, 2H); 7.31-7.40 (m, 4H) ppm. Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **3'-benzil-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one**

**17b:** purificato mediante triturazione con Et<sub>2</sub>O (63%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.36 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 2.02 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.34 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.39 (d, 1H, *J*=9.1 Hz); 3.60 (d, 1H, *J*=9.1 Hz); 4.44 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 4.63 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 6.67 (d, 1H, *J*=8.6 Hz); 7.21-7.42 (m, 6H) ppm.

Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-3'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one**

**18a:** purificato mediante cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (49%).

pf: 78-81°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.39 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 2.08 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.40 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.42 (d, 1H, *J*=8.9 Hz); 3.71 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 4.64 (s, 2H); 6.79-6.84 (m, 1H); 6.88-6.95 (m, 1H); 7.20-7.30 (m, 1H); 7.53 (d, 2H, *J*=8.6 Hz); 7.69 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 8.27 (d, 2H, *J*=8.6 Hz) ppm.

Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-3'-(4-nitrobenzil)-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-**

**2'-one 18b:** purificato mediante cromatografia per filtrazione usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (40%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.38 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 2.04 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.38 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.44 (d, 1H,  $J=9.2$  Hz); 3.68 (d, 1H,  $J=9.0$  Hz); 4.56 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 4.71 (d, 1H,  $J=15.4$  Hz); 6.70 (d, 1H,  $J=7.7$  Hz); 7.26-7.33 (m, 2H); 7.55 (d, 2H,  $J=8.6$  Hz); 8.29 (d, 2H,  $J=8.6$  Hz) ppm.  
Anal. Calc.  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_5$  (C, H, N)

✓ **2,2-dimetil-3'-[4-(trifluorometil)benzil]-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 19a**: purificato mediante triturazione con etere etilico (64%)

p.f.: 129-131°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.39 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 2.08 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.39 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.40 (d, 1H,  $J=8.9$  Hz); 3.69 (d, 1H,  $J=8.9$  Hz); 4.59 (s, 2H); 6.78-6.83 (m, 1H); 6.87-6.95 (m, 1H); 7.18-7.26 (m, 2H); 7.47 (d, 2H,  $J=7.8$  Hz); 7.66 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) ppm. Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{NO}_3$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-3'-[4-(trifluorometil)benzil]-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 19b**: purificato mediante triturazione con etere etilico (61%)

p.f.: 138-141°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.38 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 2.04 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.36 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.40 (d, 1H,  $J=9.2$  Hz); 3.63 (d, 1H,  $J=9.2$  Hz); 4.53 (d, 1H,  $J=15.2$  Hz); 4.65 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 6.69 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz); 7.26-7.31 (m, 2H); 7.48 (d, 2H,  $J=7.9$  Hz); 7.68 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) ppm.  
Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrF}_3\text{NO}_3$  (C, H, N)

### Procedura generale per la riduzione del gruppo nitro

Ad una soluzione dell'opportuno composto **18** (1 mmol) in MeOH (14 ml) è stato aggiunto carbone (0.55 g) e una quantità catalitica di  $\text{FeCl}_3$ . La miscela di reazione è stata portata a 66°C, quindi è stata aggiunta lentamente idrazina idrata (0.82 ml, 17 mmol). La miscela è stata lasciata sotto agitazione a riflusso per una notte, quindi filtrata su setto di celite lavando molte volte con MeOH. Il solvente è stato concentrato, il residuo ripreso con cloroformio, seccato ed evaporato, per dare un solido giallo.

✓ **3'-(4-aminobenzil)-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one**

**20a:** purificato mediante triturazione con Et<sub>2</sub>O (99%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.37 (s, 3H); 1.39 (s, 3H); 2.03 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.34 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.36 (d, 1H, *J*=9.2 Hz); 3.62 (d, 1H, *J*=9.2 Hz); 4.96 (d, 1H, *J*=14.4 Hz); 4.45 (d, 1H, *J*=14.4 Hz); 6.67 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 6.78 (d, 1H, *J*=8.2 Hz); 6.84-6.92 (m, 1H); 7.12 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 7.20-7.26 (m, 2H) ppm. Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **3'-(4-aminobenzil)-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-**

**[1,3]ossazolidin]-2'-one 20b:** purificato mediante triturazione con Et<sub>2</sub>O (70%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.36 (s, 3H); 1.38 (s, 3H); 2.00 (d, 1H, *J*=15.4 Hz); 2.32 (d, 1H, *J*=15.4 Hz); 3.36 (d, 1H, *J*=9.2 Hz); 3.57 (d, 1H, *J*=9.3 Hz); 4.31 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 4.51 (d, 1H, *J*=14.5 Hz); 6.64-6.71 (m, 3H); 7.13 (d, 2H, *J*=8.2 Hz); 7.26-7.31 (m, 2H) ppm. Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

**Metodo generale per la sintesi dei derivati ossazolidinonici N-benzilsolfonamidici (21a,b)**

Ad una soluzione del derivato anilिनico **20a,b** (1.7 mmol) in diossano anidro (18 ml) posta sotto atmosfera di azoto viene aggiunta piridina (1.8 ml, 17.8 mmol), quindi la soluzione viene posta a 0°C e viene aggiunto lentamente metansolfonilcloruro (0.17 ml, 2.21 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a riflusso per 1 h, quindi acidificata ed estratta con AcOEt. La fase organica è stata essiccata ed evaporata.

✓ **3'-(4-metansolfonamidobenzil)-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-**

**[1,3]ossazolidin)-2'-one 21a:** purificato tramite triturazione con etere etilico (95%).

p.f.: 120-123°C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) δ: 1.32 (s, 6H); 2.22 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 2.35 (d, 1H, *J*=14.7 Hz); 2.99 (s, 3H); 3.52 (d, 1H, *J*=9.5 Hz); 3.66 (d, 1H, *J*=9.3 Hz); 4.42 (s, 2H); 6.78 (d, 1H, *J*=8.2 Hz); 6.88-6.96 (m, 1H); 7.12 -7.33 (m, 6H) ppm.

Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (C, H, N)

✓ **3'-(4-metansolfonamidobenzil)-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-**

**[1,3]ossazolidin)-2'-one 21b:** purificato tramite cristallizzazione da etanolo (66%).

p.f.: 165-168°C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO)  $\delta$ : 1.31 (s, 3H); 1.32 (s, 3H); 2.22 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.36 (d, 1H,  $J=14.8$  Hz); 2.99 (s, 3H); 3.52 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz); 3.68 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz); 4.41 (s, 2H); 6.77 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz); 7.23 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz); 7.31 (d, 2H,  $J=8.7$  Hz); 7.33-7.41 (m, 2H) ppm. Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (C, H, N)

#### Metodo generale per la sintesi dei derivati ossazolidinonici *N*-benzilacetammidici (22a,b)

Ad una soluzione del composto **20a,b** (0.514 mmol) in acetone (3 ml) vengono aggiunti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (106.5 mg, 1.16 mmol) e anidride acetica (0.1 ml, 0.514 mmol). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a t.a. per 1 h, dopodiché il solvente è stato evaporato. Il residuo è stato ripreso con AcOEt, lavato con acqua, e la fase organica seccata ed evaporata.

✓ **3'-(4-acetamidobenzil)-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 22a**: purificato mediante cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (36%).

p.f.: 85-88°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.37 (s, 3H); 1.40 (s, 3H); 2.05 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.19 (s, 3H); 2.37 (d, 1H,  $J=14.5$  Hz); 3.38 (d, 1H,  $J=9.1$  Hz); 3.65 (d, 1H,  $J=8.9$  Hz); 4.49 (s, 2H); 6.77-6.93 (m, 1H); 7.16-7.32 (m, 6H); 7.52 (d, 1H,  $J=8.2$  Hz) ppm.

Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

✓ **3'-(4-acetamidobenzil)-6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 22b**: purificato mediante cromatografia usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (50%).

p.f.: 77-80°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.36 (s, 3H); 1.37 (s, 3H); 2.02 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 2.17 (s, 3H); 2.31 (d, 1H,  $J=14.6$  Hz); 3.39 (d, 1H,  $J=9.3$  Hz); 3.60 (d, 1H,  $J=9.1$  Hz); 4.41 (d, 1H,  $J=14.8$  Hz); 4.54 (d, 1H,  $J=14.8$  Hz); 6.67 (d, 2H,  $J=8.7$  Hz); 7.20-7.29 (m, 3H); 7.51-7.61 (m, 2H) ppm. Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

#### Metodo generale per la sintesi dei 4-spiro-immينو-ossazolidinoni (23-25a,b)

Ad una soluzione di carbonildiimidazolo (3.2 mmoli; 515.8 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (6.0 ml) posta a 0°C e sotto atmosfera di N<sub>2</sub>, si aggiunge goccia a goccia l'opportuna cianidrina **35a,b** (2.9 mmoli) sciolta in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (8.7 ml). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Trascorso tale periodo, viene addizionata alla soluzione l'opportuna

benzilammina sostituita (2.9 mmoli) e la miscela di reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Trascorso tale periodo, la soluzione è lavata varie volte con HCl 1N e H<sub>2</sub>O, essiccata ed evaporata a p.r. Per quanto riguarda i derivati benzilamminici 24a,b, la fase acquosa acida è stata alcalinizzata ed estratta con Et<sub>2</sub>O: le fasi organiche riunite sono state essiccate ed evaporate per fornire i composti desiderati.

✓ **3'-benzil-4'-imino-2,2-dimethyl-2,3-dihydro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 23a:** purificato mediante cristallizzazione da Et<sub>2</sub>O (10%)

p.f.: 125-130°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.39 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.20 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 2.34 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 4.84 (s, 2H); 6.81-6.86 (m, 2H); 7.06-7.12 (m, 2H, Ar); 7.21-7.49 (m, 5H); 7.65 (s, 1H) ppm. MS (*m/z*): 336 (M<sup>+</sup>, 81%); 292 (-CO<sub>2</sub>, 48%); 91 (CH<sub>2</sub>Ph, 100%).

Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **3'-benzil-6-bromo-4'-imino-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 23b:** purificato mediante cromatografia su colonna usando una miscela di esano/AcOEt (7:3) (20%)

p.f.: 126-130°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.41 (s, 3H); 1.49 (s, 3H); 2.17-2.39 (m, 2H); 4.87 (s, 2H); 6.75 (d, 1H, *J*=8.9 Hz); 6.90 (d, 1H, *J*=2.2 Hz); 7.32-7.45 (m, 6H) ppm. MS (*m/z*): 416 (M<sup>+</sup>, 27%); 372 (M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>, 7%); 91 (100%, CH<sub>2</sub>Ph). Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **4'-imino-2,2-dimetil-3'-(4-aminobenzil)-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 24a:** purificato mediante precipitazione da Et<sub>2</sub>O/esano (15%)

p.f.: 155-160°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.39 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.19 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 2.34 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 4.74 (s, 2H); 6.64-6.68 (m, 2H); 6.79-6.90 (m, 3H); 7.21-7.34 (m, 3H) ppm. MS (*m/z*): 351 (M<sup>+</sup>, 18%); 307 (-CO<sub>2</sub>, 100%); 121 (24%); 106 (91%).

Anal. Calc. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (C, H, N)

✓ **6-bromo-4'-imino-2,2-dimetil-3'-(4-aminobenzil)-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 24b:** purificato mediante cromatografia su colonna usando come eluente esano/AcOEt (6:4) (9%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.38 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.18 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.35 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 4.75 (s, 2H); 6.68 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz); 6.74 (d, 1H,  $J=8.7$  Hz); 6.86 (d, 1H,  $J=2.3$  Hz); 7.26-7.30 (m, 2H); 7.34 (dd, 1H,  $J=2.3$ ; 8.7 Hz) ppm.

Anal. Calc.  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}_3$  (C, H, N)

✓ **4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-(trifluorometil)benzil]-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 25a**: purificato per triturazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  (25%)

p.f.: 133-136°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.41 (s, 3H); 1.50 (s, 3H); 2.22 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.37 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 4.93 (s, 2H); 6.76-6.91 (m, 3H); 7.28-7.34 (m, 1H); 7.39 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz); 7.57 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) ppm. MS ( $m/z$ ): 404 ( $\text{M}^+$ , 88%); 360 ( $-\text{CO}_2$ , 43%); 159 (47%); 174 (35%). Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$  (C, H, N)

✓ **6-bromo-4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-(trifluorometil)benzil]-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 25b**: purificato per triturazione con  $\text{Et}_2\text{O}$  (37%)

p.f.: 135-138°C

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}$ )  $\delta$ : 1.31 (s, 3H); 1.46 (s, 3H); 2.55 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 2.70 (d, 1H,  $J=15.0$  Hz); 5.03 (d, 1H,  $J=15.7$  Hz); 5.21 (d, 1H,  $J=15.9$  Hz); 6.89 (d, 1H,  $J=8.9$  Hz); 7.38 (d, 1H,  $J=2.2$  Hz); 7.52 (dd, 1H,  $J=8.9$ ; 2.4 Hz); 7.68 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz); 7.79 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz); 9.13 (s, 1H) ppm. MS ( $m/z$ ): 484 ( $\text{M}^+$ , 13%).

Anal. Calc.  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{O}_3$  (C, H, N)

### Metodo generale per la sintesi dei derivati immino-ossazolidinonici *N*-benzilsolfonamidici (26a,b)

Ad una soluzione del composto **24a,b** (2 mmol) in diossano anidro (21 ml) posta sotto atmosfera di azoto viene aggiunta piridina (2.16 ml, 21.4 mmol), quindi la soluzione viene posta a 0°C e viene aggiunto lentamente metansolfonilcloruro (0.2 ml, 2.6 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a riflusso per 1 h, quindi acidificata ed estratta con AcOEt. La fase organica è stata quindi essiccata ed evaporata, per ottenere i composti desiderati.

✓ **4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-solfonamidobenzil]-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 26a**: purificato mediante cromatografia su colonna usando una miscela di esano/AcOEt (1:1) (26%)

p.f.: 87-90°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.40 (s, 3H); 1.49 (s, 3H); 2.23 (d, 1H, *J*=14.8 Hz); 2.35 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 3.01 (s, 3H); 4.83 (s, 2H); 6.79-6.90 (m, 3H); 7.20 (d, 2H, *J*=8.4 Hz); 7.24-7.32 (m, 1H); 7.46 (d, 2H, *J*=8.4 Hz) ppm.

MS (*m/z*): 429 (M<sup>+</sup>, 12%); 385 (M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>, 100%); 79 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 53%).

Anal. Calc. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S (C, H, N)

✓ **6-bromo-4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-solfonamidobenzil]-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 26b**: purificato mediante precipitazione da AcOEt/esano (18%)

p.f.: 85-88°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.38 (s, 3H); 1.50 (s, 3H); 2.14 (d, 1H, *J*=15.2 Hz); 2.56 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 3.02 (s, 3H); 4.89 (s, 2H); 6.69-6.81 (m, 3H); 7.21-7.31 (m, 1H); 7.32-7.38 (m, 1H); 7.44-7.53 (m, 2H) ppm.

MS (*m/z*): 508 (M<sup>+</sup>, 25%); 465 (M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>, 16%); 184 (24%), 106 (18%); 79 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 35%). Anal.

Calc. C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S (C, H, N)

### Metodo generale per la sintesi dei derivati immino-ossazolidinonici *N*-benzilacetamidici (27a,b)

Ad una soluzione del composto **24a,b** (0.514 mmol) in acetone (3 ml) vengono aggiunti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (106.5 mg, 1.16 mmol) e anidride acetica (0.1 ml, 0.514 mmol). La miscela di reazione è lasciata in agitazione a t.a. per 1 h, dopodiché il solvente è stato evaporato. Il residuo è stato ripreso con AcOEt, lavato con acqua, e la fase organica essiccata ed evaporata.

✓ **4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-acetamidobenzil]-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-**

**[1,3]ossazolidin]-2'-one 27a**: purificato mediante cromatografia su colonna usando una miscela di esano/AcOEt (1:4) (45%)

p.f.: 190-193°C

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO) δ: 1.30 (s, 3H); 1.44 (s, 3H); 2.06 (s, 3H); 2.35 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 2.61 (d, 1H, *J*=15.0 Hz); 4.68 (s, 2H); 6.84-6.94 (m, 3H); 7.26-7.32 (m, 3H); 7.56 (d, 2H, *J*=8.4 Hz) ppm.

MS (*m/z*): 393 (M<sup>+</sup>, 14%); 349 (M<sup>+</sup>-COCH<sub>3</sub>, 90%); 334 (M<sup>+</sup>-NHCOCH<sub>3</sub>, 25%); 106 (100%). Anal.

Calc. C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

- ✓ **6-bromo-4'-imino-2,2-dimetil-3'-[4-acetamidobenzil]-2,3-diidro-2'H-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 27b**: purificato mediante cromatografia su colonna usando una miscela di esano/AcOEt (3:7) (17%)

p.f.: 110-113°C

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.37 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.15-2.24 (m, 5H); 4.83 (s, 2H); 6.75 (d, 1H, *J*=8.9 Hz); 6.86-6.92 (m, 1H); 7.14-7.18 (m, 1H); 7.32-7.54 (m, 4H) ppm.

MS (*m/z*): 471 (M<sup>+</sup>, 13%); 429 (M<sup>+</sup>-COCH<sub>3</sub>, 66%). Anal. Calc. C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (C, H, N)

### Preparazione generale dei derivati cromanonici (29a,b)

Ad una soluzione dell'opportuno 2-idrossi acetofenone commerciale **28a,b** (73.4 mmol) in toluene (30 ml) si aggiungono acetone (8.11 ml, 0.11 mol) e pirrolidina (1.84 ml, 23 mmol). La soluzione viene lasciata sotto agitazione a t.a. per 1h e poi a riflusso per 24 h.

Il solvente viene rimosso a pressione ridotta e il residuo ripreso con acetato di etile: la fase organica viene lavata con HCl 6N, NaOH 2N e acqua. Le fasi organiche riunite sono state seccate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporate per fornire un grezzo che corrisponde essenzialmente al prodotto desiderato.

- ✓ **2,2-dimetil-2,3-diidro-4H-cromen-4-one 29a**: utilizzato senza ulteriore purificazione (52%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.46 (s, 6H); 2.72 (s, 2H); 6.95 (m, 2H); 7.46 (m, 1H); 7.85 (m, 1H) ppm. MS (*m/z*): 177 (M<sup>+</sup>, 100%)

- ✓ **6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-4H-cromen-4-one 29b**: utilizzato senza ulteriore purificazione (81%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.45 (s, 6H); 2.71 (s, 2H); 6.82 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.53 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.5 Hz); 7.95 (d, 1H, *J*=2.5 Hz) ppm.

### Preparazione generale dei trimetilsiliderivati (30a,b)

Ad una soluzione del cromanone **29a,b** (22 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> viene aggiunto trimetilsililcianuro (4.4 ml, 33 mmol) e ZnI<sub>2</sub> (1.05 g, 3 mmol). La miscela viene lasciata sotto agitazione a t.a. per 4 h. La soluzione viene quindi diluita con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lavata con H<sub>2</sub>O. La fase organica viene seccata ed evaporata a pressione ridotta per fornire un grezzo scuro che corrisponde al prodotto desiderato.

✓ **30a**: utilizzato senza ulteriore purificazione (95%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.27 (s, 9H); 1.44 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.35 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 2.47 (d, 1H, *J*=14.0 Hz); 6.82-6.86 (m, 1H); 6.97-7.05 (m, 1H); 7.24-7.32 (m, 1H); 7.54-7.58 (m, 1H) ppm.

✓ **30b**: utilizzato senza ulteriore purificazione (92%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 0.28 (s, 9H); 1.41 (s, 3H); 1.45 (s, 3H); 3.28 (d, 1H, *J*=14.1 Hz); 2.43 (d, 1H, *J*=14.1 Hz); 6.71 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.35 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.4 Hz); 7.61 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm. MS (*m/z*): 353 (M<sup>+</sup>, 61%); 284 (M<sup>+</sup>- Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 100%)

### Preparazione generale degli aminoalcol (31a,b)

In una soluzione di LiAlH<sub>4</sub> 1M in THF (23 mmol) posta a 0°C viene gocciolata una soluzione del composto **29a,b** (11 mmol) sciolto nella minima quantità di THF. Nel caso del composto **30a** la soluzione viene lasciata sotto agitazione a t.a. per 1 h, mentre per il derivato **30b** la miscela di reazione viene lasciata a 0°C per 1 h.

Trascorso tale periodo, si porta la soluzione a 0°C e si aggiungono lentamente H<sub>2</sub>O e NaOH, quindi si filtra su setto. La soluzione viene evaporata a pressione ridotta; si ottiene un olio giallo che corrisponde al prodotto desiderato.

✓ **4-(aminometil)-2,2-dimetilcroman-4-olo 30a**: utilizzato senza ulteriore purificazione (87%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.36 (s, 3H); 1.42 (s, 3H); 2.01 (s, 2H); 2.77 (d, 1H, *J*=13.0 Hz); 2.98 (d, 1H, *J*=13.0 Hz); 6.80-6.84 (m, 1H); 6.88-6.96 (m, 1H); 7.13-7.21 (m, 1H); 7.36-7.40 (m, 1H) ppm.

✓ **4-(aminometil)-6-bromo-2,2-dimetilcroman-4-olo 30b**: utilizzato senza ulteriore purificazione (75%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.35 (s, 3H); 1.42 (s, 3H); 1.98 (s, 2H); 2.78 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 2.96 (d, 1H, *J*=12.8 Hz); 6.71 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.26 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.4 Hz); 7.53 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm. MS (*m/z*): 286 (M<sup>+</sup>, 16%); 255 (M<sup>+</sup>- 30, 100%)

### Preparazione generale dei cloroacetilderivati (32a,b)

Ad una soluzione dell'aminoalcol **31a,b** (7.9 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 ml) si aggiungono NaOH (0.38 g, 9.50 mmol) e H<sub>2</sub>O (17 ml): la miscela viene portata a 0°C e si aggiunge cloroacetilcloruro (1.06 ml, 13 mmol) goccia a goccia. La miscela viene lasciata sotto agitazione a t.a. per circa 1 h (controllare che il pH sia alcalino).

Le due fasi vengono separate e la fase organica viene lavata più volte con HCl 1N. Le fasi organiche riunite vengono seccate ed evaporate; si ottiene un solido giallo che è stato usato senza ulteriore purificazione.

✓ **2-cloro-N-[(4-idrossi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-cromen-4-il)metil]acetamide 32a:** (89%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.36 (s, 3H); 1.42 (s, 3H); 2.02 (s, 2H); 3.56 (dd, 1H, *J*=13.7; 7.2 Hz); 3.73 (dd, 1H, *J*=13.7; 5.0 Hz); 4.08 (s, 2H); 6.82-6.87 (m, 1H); 6.92-7.0 (m, 1H); 7.18-7.25 (m, 1H); 7.41-7.46 (m, 1H) ppm.

✓ **N-[(6-bromo-4-idrossi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-cromen-4-il)metil]-2-cloroacetamide 32b:** (64%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.34 (s, 3H); 1.42 (s, 3H); 1.95 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.04 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.52 (dd, 1H, *J*=13.9; 7.1 Hz); 3.70 (dd, 1H, *J*=13.9; 5.1 Hz); 4.11 (s, 2H); 6.74 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.30 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.4 Hz); 7.57 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm.

**Preparazione generale dei morfologi (33a,b)**

Ad una soluzione del cloroacetilderivato **32a,b** (7.05 mmol) in toluene (100 ml) si aggiunge *t*BuOK (4.11 g, 36.69 mmol) in porzioni nell'arco di 1 h, e la miscela viene lasciata sotto agitazione a t.a. per due ore.

Il solvente viene rimosso a p.r. e il residuo ripreso con acetato di etile. La fase organica viene lavata con H<sub>2</sub>O, seccata ed evaporata. Si ottiene un solido giallo.

✓ **2,2-dimetil-2,3-diidro-5'*H*-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 33a:** purificato tramite triturazione con etere etilico (70%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.40 (s,3H); 1.42 (s, 3H); 2.04 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.42 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.25 (dd, 1H, *J*=12.4; 4.3 Hz); 3.93 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 4.22 (d, 1H, *J*=17.5 Hz); 4.34 (d, 1H, *J*=17.5 Hz); 6.84-6.92 (m, 1H); 6.95-7.0 (m, 1H); 7.21-7.29 (m, 1H); 7.44-7.48 (m, 1H) ppm. MS (*m/z*): 248 (M<sup>+</sup>, 23%)

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-5'*H*-spiro[cromene-4,2'-[1,4]ossazinan]-5'-one 33b:** purificato tramite triturazione con etere etilico (80%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.38 (s, 3H); 1.41 (s, 3H); 2.03 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.41 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.23 (dd, 1H, *J*=12.4; 4.5 Hz); 3.88 (d, 1H, *J*=12.4 Hz); 4.23 (d, 1H, *J*=17.7 Hz); 4.36 (d, 1H, *J*=17.7 Hz); 6.75 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.33 (dd, 1H, *J*=8.8; 2.4 Hz); 7.57 (d, 1H, *J*=2.4 Hz). MS (*m/z*): 327 (M<sup>+</sup>, 48%)

### Metodo generale per la sintesi dei derivati ossazolidinonici 34a,b

L'opportuno amminoalcol **31a,b** (6.33 mmoli) viene solubilizzato in THF (11 ml), dopodiché tale soluzione viene gocciolata in una sospensione di CDI (1.02 g; 6.33 mmoli) in THF (11 ml) posta a 0°C. La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Trascorso tale periodo il solvente è evaporato; il residuo è stato ripreso con acetato di etile e lavato più volte con HCl diluito e soluzione satura di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Infine la fase organica è stata essiccata ed evaporata.

✓ **2,2-dimetil-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 34a:** purificato tramite triturazione con Et<sub>2</sub>O (78%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.42 (s, 6H); 2.17 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.46 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.63 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 3.89 (d, 1H, *J*=8.9 Hz); 6.83 (d, 1H, *J*=8.2 Hz); 6.93-7.01 (m, 1H); 7.22-7.29 (m, 1H); 7.49 (dd, 1H, *J*=7.8, 1.3 Hz) ppm.

✓ **6-bromo-2,2-dimetil-2,3-diidro-2'*H*-spiro[cromene-4,5'-[1,3]ossazolidin]-2'-one 34b:** purificato tramite triturazione con Et<sub>2</sub>O (84%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.41 (s, 6H); 2.14 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 2.42 (d, 1H, *J*=14.6 Hz); 3.64 (d, 1H, *J*=9.0 Hz); 3.86 (d, 1H, *J*=8.9 Hz); 6.72 (d, 1H, *J*=8.8 Hz); 7.33 (dd, 1H, *J*=8.8, 2.4 Hz); 7.58 (d, 1H, *J*=2.4 Hz) ppm.

### Preparazione generale delle cianidrine 35a,b

Ad una soluzione della cianidrina protetta **30a,b** (3.6 mmol) in THF (6 ml) si aggiunge HCl 1N (6 ml) e la soluzione è lasciata a riflusso per 1 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato a pressione ridotta; il residuo è stato ripreso con AcOEt, lavato più volte con H<sub>2</sub>O, essiccato ed evaporato. Il solido ottenuto è costituito essenzialmente dal prodotto desiderato.

✓ **4-idrossi-2,2-dimetilcroman-4-carbonitrile 35a**: utilizzato senza ulteriore purificazione (89%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.43 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.37 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 2.49 (d, 1H,  $J=14.4$  Hz); 6.87 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz); 6.99-7.07 (m, 1H); 7.2-7.36 (m, 1H); 7.60 (dd, 1H,  $J=7.7$ ; 1.6 Hz) ppm.

✓ **6-bromo-4-idrossi-2,2-dimetilcroman-4-carbonitrile 35b**: utilizzato senza ulteriore purificazione (97%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.42 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 2.36 (d, 1H,  $J=14.5$  Hz); 2.47 (d, 1H,  $J=14.5$  Hz); 6.76 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz); 7.39 (dd, 1H,  $J=8.8$ ; 2.4 Hz); 7.73 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz) ppm.

## Analisi Elementari

composto	formula	Calcolato %			Trovato %		
		C	H	N	C	H	N
1a	$C_{21}H_{23}NO_3$	74.5	6.8	4.1	74.2	6.4	3.8
1b	$C_{21}H_{22}BrNO_3$	60.4	5.2	3.3	60.6	5.2	3.4
2a	$C_{21}H_{22}N_2O_5$	65.8	5.7	7.3	66.0	5.4	6.9
2b	$C_{21}H_{21}BrN_2O_5$	54.5	4.5	6.0	54.9	4.4	6.0
3a	$C_{22}H_{22}F_3NO_3$	63.2	6.0	2.8	63.0	5.5	2.8
3b	$C_{22}H_{21}BrF_3NO_3$	54.5	4.3	2.8	54.9	4.4	2.5
4a	$C_{22}H_{25}NO_3$	75.2	7.1	3.9	74.8	7.0	3.7
4b	$C_{22}H_{24}BrNO_3$	61.3	5.5	3.2	60.9	5.7	3.0
5a	$C_{22}H_{25}NO_4$	71.9	6.8	3.8	72.3	7.4	3.4
5b	$C_{22}H_{24}BrNO_4$	59.1	5.3	3.1	58.8	5.2	2.7
6a	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	71.5	6.8	7.9	71.4	6.6	7.7
6b	$C_{21}H_{23}BrN_2O_3$	58.4	5.3	6.5	58.0	5.1	6.3
7a	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	70.03	6.64	7.10	69.85	6.36	7.02
7b	$C_{23}H_{25}BrN_2O_4$	58.36	5.32	5.92	58.09	5.20	5.67
8a	$C_{22}H_{26}N_2O_5S$	61.4	6.0	6.5	61.0	5.4	6.2
8b	$C_{22}H_{25}BrN_2O_5S$	51.87	4.95	5.50	51.28	4.90	5.47
9a	$C_{21}H_{25}NO_2 \text{ HCl}$	70.1	7.2	3.8	70.3	7.1	4.1
9b	$C_{21}H_{24}BrNO_2 \text{ HCl}$	54.4	5.7	3.2	55.0	5.8	2.9
10a	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	68.4	6.5	7.6	68.4	6.3	7.5
10b	$C_{21}H_{23}BrN_2O_4 \text{ HCl}$	52.1	4.9	5.7	51.7	4.5	5.7
11a	$C_{21}H_{26}N_2O_2 \text{ HCl}$	67.3	7.2	7.4	67.5	7.4	7.3
11b	$C_{21}H_{25}BrN_2O_2 \text{ HCl}$	47.9	5.3	5.2	48.3	5.1	4.8
12a	$C_{22}H_{24}F_3NO_2 \text{ HCl}$	61.6	5.8	3.2	61.3	5.9	2.9
12b	$C_{22}H_{23}BrF_3NO_2 \text{ HCl}$	52.1	4.7	2.7	52.4	4.3	2.4
13a	$C_{22}H_{27}NO_2$	78.3	8.0	4.1	78.5	8.3	4.0
13b	$C_{22}H_{26}BrNO_2$	63.4	6.2	3.3	63.0	6.4	3.5
14a	$C_{22}H_{27}NO_3$	74.7	7.6	3.9	74.3	7.2	3.5

<b>14b</b>	$C_{22}H_{26}BrNO_3$	61.1	6.0	3.2	61.5	6.3	3.3
<b>15a</b>	$C_{22}H_{28}N_2O_4S$ HCl	58.3	6.4	6.1	58.7	6.5	6.2
<b>15b</b>	$C_{22}H_{27}BrN_2O_4S$ HCl	49.68	5.31	5.27	49.63	5.02	4.93
<b>16a</b>	$C_{22}H_{28}N_2O_3$ HCl	66.26	7.01	6.72	65.93	6.89	6.44
<b>16b</b>	$C_{22}H_{27}BrN_2O_3$ HCl	55.71	5.69	5.65	55.40	5.71	5.52
<b>17a</b>	$C_{20}H_{21}NO_3$	74.3	6.5	4.3	74.0	6.1	3.9
<b>17b</b>	$C_{20}H_{20}BrNO_3$	59.7	5.0	3.5	60.0	5.2	3.7
<b>18a</b>	$C_{20}H_{20}N_2O_5$	65.2	5.4	7.6	65.6	5.7	7.2
<b>18b</b>	$C_{20}H_{19}BrN_2O_5$	55.4	4.3	3.2	55.0	4.6	3.5
<b>19a</b>	$C_{21}H_{20}F_3NO_3$	64.4	5.1	3.5	64.0	5.5	3.4
<b>19b</b>	$C_{21}H_{19}BrF_3NO_3$	53.6	4.0	2.9	54.0	3.9	3.2
<b>20a</b>	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	72.0	6.2	8.0	72.3	6.5	8.1
<b>20b</b>	$C_{21}H_{21}BrN_2O_3$	58.7	4.8	6.5	58.3	4.5	6.3
<b>21a</b>	$C_{21}H_{24}N_2O_5S$	60.5	5.7	6.7	60.3	5.7	6.9
<b>21b</b>	$C_{21}H_{23}BrN_2O_5S$	50.9	4.6	5.6	50.6	4.2	5.2
<b>22a</b>	$C_{22}H_{24}N_2O_4$	69.4	6.3	7.3	69.0	5.9	6.9
<b>22b</b>	$C_{22}H_{23}BrN_2O_4$	57.5	5.2	6.1	57.1	5.5	5.9
<b>23a</b>	$C_{20}H_{20}N_2O_3$	71.4	5.9	8.3	71.3	5.6	8.5
<b>23b</b>	$C_{20}H_{19}BrN_2O_3$	57.8	4.6	6.7	58.0	4.2	6.7
<b>24a</b>	$C_{20}H_{21}N_3O_3$	68.4	6.0	12.0	68.4	6.3	12.2
<b>24b</b>	$C_{20}H_{20}BrN_3O_3$	55.8	4.6	9.7	56.1	4.7	9.8
<b>25a</b>	$C_{21}H_{19}F_3N_2O_3$	62.4	4.7	6.9	62.1	4.6	7.2
<b>25b</b>	$C_{21}H_{18}BrF_3N_2O_3$	52.2	3.7	5.8	52.3	4.1	6.1
<b>26a</b>	$C_{21}H_{23}N_3O_5S$	58.7	5.3	9.8	58.5	5.1	9.4
<b>26b</b>	$C_{21}H_{22}BrN_3O_5S$	49.6	4.3	8.2	49.3	4.7	7.9
<b>27a</b>	$C_{22}H_{23}N_3O_4$	67.2	5.8	10.6	67.1	5.9	10.3
<b>27b</b>	$C_{22}H_{22}BrN_3O_4$	55.9	4.6	8.9	56.3	5.0	8.5

<b>29a</b>	$C_{11}H_{12}O_2$	75.4	6.8		75.8	7.2	
<b>30a</b>	$C_{15}H_{21}NO_2Si$	65.4	7.6	5.0	65.1	7.7	4.7
<b>30b</b>	$C_{15}H_{20}BrNO_2Si$	50.9	5.6	3.9	51.3	5.6	3.6
<b>31b</b>	$C_{12}H_{12}BrNO_2$	50.3	5.9	4.9	50.6	6.1	4.5
<b>32a</b>	$C_{14}H_{18}ClNO_3$	59.2	6.3	4.9	59.5	6.1	5.1
<b>32b</b>	$C_{14}H_{17}BrClNO_3$	46.4	4.6	3.8	46.8	4.4	3.9
<b>33a</b>	$C_{14}H_{17}NO_3$	67.7	6.8	5.6	67.8	7.2	5.3
<b>33b</b>	$C_{14}H_{16}BrNO_3$	51.3	4.8	4.2	51.5	4.7	4.3

## 6.2 Metodi farmacologici

Tutte le procedure sperimentali sono state effettuate secondo le linee guida CEE 86-609 riguardanti la sperimentazione animale.

### 6.2.1 Protocolli vascolari *in vitro*

Gli effetti dei composti sono stati testati su anelli di aorta toracica di ratti maschi Wistar normotesi (250-300 g). Dopo una leggera anestesia con etere, i ratti sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e dissanguamento.

Le aorte sono state immediatamente espilate e private da tessuti estranei, e lo strato endoteliale è stato rimosso grattando gentilmente la superficie interna dei vasi con un ago ipodermico. Anelli di aorta larghi cinque millimetri sono stati sospesi, sotto un carico di 2g, in 20 mL di bagno contenente soluzione Tyrode (composizione salina in mM: NaCl 136.8; KCl 2.95; CaCl<sub>2</sub> 1.80; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.05; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.41; NaHCO<sub>3</sub> 11.9; glucosio 5.5) termostata a 37°C e gassata continuamente con una miscela di O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%). Le variazioni della tensione sono state registrate mediante un trasduttore isometrico (Grass FTO3) collegato con un preamplificatore (Buxco Electronics) e con un software di acquisizione dati (BIOPAC Systems Inc., MP 100).

Dopo un periodo di equilibratura di 60 minuti, la rimozione dell'endotelio è stata confermata tramite la somministrazione di acetilcolina (ACh) (10 µM) ad anelli precontratti con KCl (20 mM). Un rilasciamento minore del 10% della contrazione indotta dal KCl è stato considerato indicativo di una sufficiente mancanza di strato endoteliale, mentre gli organi che hanno mostrato un rilasciamento  $\geq 10\%$  (corrispondente ad una significativa presenza di endotelio) sono stati scartati.

Da 30 a 40 minuti dopo la conferma della rimozione dell'endotelio, le preparazioni aortiche sono state contratte con una singola concentrazione di KCl (20mM), e quando la contrazione ha raggiunto una fase stabile di plateau, sono state aggiunte concentrazioni cumulative delle sostanze testate (da 10 nM a 100 µM).

Esperimenti preliminari hanno mostrato che la contrazione indotta dal KCl rimaneva stabile per almeno 40 minuti.

### 6.2.2 Analisi dei dati

L'efficacia vasorilasciante è stata valutata in termini di massima risposta vasorilasciante, espressa come percentuale del tono contrattile indotto da KCl 20 mM. Quando la concentrazione limite di 100 µM (la più alta concentrazione somministrata) dei composti testati non ha raggiunto gli effetti massimi, il parametro di efficacia ha rappresentato la risposta vasorilasciante, espressa come percentuale del tono contrattile indotto dal KCl, provocato da questa concentrazione limite.

Il parametro di potenza è stato espresso come  $pIC_{50}$ , calcolato come il logaritmo negativo della concentrazione molare dei composti testati che provoca una riduzione del 50% del tono contrattile indotto dal KCl 20mM. Il  $pIC_{50}$  non è stato calcolato per quei composti che hanno mostrato parametri di efficacia minori del 50%. I parametri di efficacia e potenza sono stati espressi come valore  $\pm$  errore standard, per 5-10 esperimenti. I dati sperimentali sono stati analizzati mediante procedura computerizzata (software: GraphPad Prism 4.0).

### 6.2.3 Protocolli cardiaci in vitro

Ratti maschi adulti Wistar (260-350 g) sono stati trattati, mediante iniezione intraperitoneale (circa 0.3 ml), con una dose di 40 mg/Kg dei seguenti composti: diazossido, i composti sintetizzati, il veicolo (DMSO), o con una dose di 1 mg/Kg per quanto riguarda il cromakalim.

Dopo 2 ore, tutti gli animali sono stati anestetizzati con sodio pentobarbital (100 mg/Kg i.p.) ed eparinizzati (100 UI i.p.) per prevenire la coagulazione. Per verificare l'effettiva selettività verso i canali  $K_{ATP}$  mitocondriali, in un'altra serie di esperimenti è stato somministrato ai ratti 5-idrossi decanoato, un bloccante selettivo di questi canali, in dosi da 10 mg/Kg, 20 minuti prima della somministrazione dei composti testati.

Dopo apertura del torace, i cuori sono stati rapidamente espianati e posti in una soluzione di Krebs a 4°C (composizione in mM:  $NaHCO_3$  25.0; NaCl 118.1; KCl 4.8;  $MgSO_4$  1.2;  $CaCl_2 \cdot H_2O$  1.6;  $KH_2PO_4$  1.2; glucosio 11.5) equilibrata con 95.5% di  $O_2$  e 5% di  $CO_2$ , per indurre cardioplegia transitoria e ridurre il consumo di ossigeno. Rapidamente, l'aorta ascendente è stata incannulata e i cuori sono stati montati in un apparato Langendorff, quindi perfusi con la soluzione di Krebs (termostata a 37°C e continuamente gorgogliata con 95% di  $O_2$  e 5% di  $CO_2$ ) a pressione costante (70-80 mmHg). Tale procedura è stata completata entro 2 minuti dall'espianamento dell'organo.

Un palloncino di latex riempito di acqua e connesso ad un trasduttore di pressione (Bentley Trantec, mod 800) è stato introdotto nel ventricolo sinistro attraverso la valvola mitralica e il volume è stato aggiustato per ottenere una pressione diastolica del ventricolo sinistro di 5-10 mmHg. La frequenza cardiaca (HR) e la pressione sviluppata dal ventricolo sinistro (LVDP) sono stati monitorati da un sistema Byopac (California, USA) e il parametro di prodotto frequenza x pressione (RPP) è stato calcolato come  $RPP = HR \times LVDP$ . Per evitare che una caduta fisiologica dell'attività contrattile, dovuta ad un lungo periodo di riperfusione, (che potrebbe causare un danno non esclusivamente collegato all'ischemia), potesse influenzare la corretta analisi dei dati funzionali, il valore di RPP registrato al 30° minuto di riperfusione (RPP-30') è stato considerato più significativo di quello registrato all'ultimo minuto di riperfusione (RPP-120').

I parametri di RPP-30' e RPP-120' sono stati espressi come percentuale del valore di RPP misurato all'ultimo minuto del periodo pre-ischemico.

Il flusso coronarico (CF) è stato misurato volumetricamente ed espresso come mL di perfusato raccolto in un minuto.

Dopo un periodo pre-ischemico di equilibratura di 30 minuti, i cuori sono stati sottoposti a 30 minuti di ischemia globale. I cuori che hanno mostrato gravi aritmie o valori di HR e LVDP instabili, sono stati esclusi dall'esperimento. Al termine del periodo ischemico i cuori sono stati riperfusi per un periodo di 120 minuti. Inoltre, l'enzima lattato deidrogenasi (LDH, un marker biochimico di danno ischemico), raccolto negli ultimi 5 minuti di fase pre-ischemica e poi ogni 5 minuti durante il periodo di riperfusione, è stato misurato con un metodo spettrofotometrico. La quantità di LDH rilasciata è stata espressa in mU enzimatiche rilasciate in 120 minuti di riperfusione (applicando una correzione relativa alla quantità registrata nella fase pre-ischemica), risultante dall'analisi AUC (area sotto la curva, nel grafico cartesiano, della quantità di LDH registrata a determinati intervalli in funzione del tempo) e relativa ad 1 g di peso del cuore.

Al termine della riperfusione i cuori sono stati rimossi dall'apparato Langendorff e il ventricolo sinistro è stato tagliato in sezioni larghe 2 mm, le quali sono state prima immerse in una soluzione acquosa al 10% di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) per 20 minuti, e poi fissate in una soluzione acquosa al 20% di formaldeide.

Dopo 24 ore le sezioni di ventricolo sono state fotografate e analizzate, allo scopo di evidenziare le aree necrotiche dovute al fenomeno ischemico (visibili in bianco o rosa chiaro) e le aree sane (visibili in rosso scuro, dovuto alla reazione del TTC), e quindi di calcolare la percentuale di area ischemica rispetto all'area cardiaca totale.

#### 6.2.4 *Protocolli in vivo*

Gli effetti dei composti sulla pressione sanguigna sono stati testati su ratti maschi Wistar normotesi di 10 settimane (250 g).

Allo scopo di stabilire un'omogeneità di trattamento con i protocolli cardiaci in vitro, gli animali sono stati eparinizzati (100 UI i.p.) e poi anestetizzati con sodio pentobarbital (60 mg/Kg). Dopo la somministrazione di anestetico, le code degli animali sono state esposte a 40 minuti di irraggiamento con una lampada IR per determinare una vasodilatazione; durante questo periodo i valori di pressione sistolica sono stati registrati con il metodo sfigmomanometrico del "tail-cuff" con un registratore BP (Ugo Basile 58500). Successivamente, le sostanze esaminate, come diazossido, cromakalim, i composti **7b**, **8a** e **15b** e il veicolo (DMSO) sono stati somministrati

mediante iniezione intraperitoneale a diversi gruppi di ratti, ad una dose di 40 mg/Kg tranne il cromakalim (1 mg/Kg).

In seguito alla somministrazione dei composti, i valori della pressione sistolica sono stati registrati per un'ora (durante questo periodo, se necessario è stata somministrata una dose di mantenimento di sodio pentobarbital di 10 mg/Kg i.p.).

#### 6.2.5 *Materiali*

Le sostanze usate nei protocolli sperimentali farmacologici sono KCl (CarloErba) sciolto (2M) in una soluzione Tyrode; acetilcolina cloridrato (Sigma) sciolta (0.1 M) in etanolo 95% e ulteriormente diluita in acqua bidistillata. L'eparina Vister è stata fornita da Pfizer come preparazione iniettabile.

Tutti i composti sintetizzati sono stati disciolti in DMSO e, se necessario, ulteriormente diluiti nella soluzione Tyrode.

Tutte le soluzioni sono state preparate estemporaneamente subito prima della procedura sperimentale. Per quanto riguarda i test in vivo sul sistema vascolare, esperimenti precedenti hanno dimostrato la completa inefficacia della somministrazione del veicolo.

## INDICE

1. CANALI $K_{ATP}$ .....	1
1.1 Topologia.....	3
1.2 Regolazione.....	4
1.3 Modulazione farmacologica dei canali $K_{ATP}$ .....	5
1.4 I canali $K_{ATP}$ nella muscolatura liscia vascolare.....	9
1.5 Canali $K_{ATP}$ della muscolatura liscia non-vascolare.....	9
1.6 Canali $K_{ATP}$ mitocondriali.....	14
Bibliografia .....	16
2. ATTIVATORI DEI CANALI $K_{ATP}$ (KCOs).....	17
2.1 KCOs di prima generazione.....	17
2.2 KCOs di seconda generazione .....	29
Bibliografia .....	42
3. PRECONDIZIONAMENTO ISCHEMICO.....	44
3.1 Danno da ischemia-riperfusione .....	44
3.2 Il preconditionamento ischemico .....	45
3.3 Pre- e postcondizionamento cardiaco .....	45
3.4 Meccanismi cellulari del preconditionamento .....	46
3.5 Canali mito $K_{ATP}$ e cardioprotezione.....	52
Bibliografia .....	55
4. TARGET TERAPEUTICI DEL PRECONDIZIONAMENTO.....	57
4.1 Recettori dell'adenosina.....	57
4.2 Recettori degli oppioidi.....	59
4.3 Recettori della bradichinina come target terapeutici della cardioprotezione.....	60
4.4 Eritropoietina .....	61
4.5 Cannabinoidi .....	62

---

4.6 Ossido nitrico .....	62
4.7 Cardioprotezione dovuta ai KCOs .....	63
5. NUOVI POTENZIALI ATTIVATORI DEI CANALI $K_{ATP}$ .....	68
5.1 Scopo della tesi .....	69
5.2 Benzopirani contenenti uno spiro eterociclo a sei termini .....	70
5.3 Benzopirani che presentano uno spiro-eterociclo a 5 termini .....	86
Bibliografia .....	95
6. Parte sperimentale .....	96
6.1 Chimica .....	96
6.2 Metodi farmacologici .....	122

## ***Ringraziamenti***

Dedico questa tesi ad Agostino, che ha reso speciali questi tre anni, e che mi ha sempre sostenuta e incoraggiata. Grazie perché mi spingi a dare sempre il meglio e credi in me più di quanto a volte non faccia io stessa.

Vorrei ringraziare il prof. Balsamo, per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo laboratorio e di fare la bellissima esperienza del Dottorato di Ricerca.

Grazie a Simona, che mi ha insegnato moltissimo, trasmettendomi la passione per questo lavoro, e che oltre ad un “capo” è stata e sarà sempre un’amica.

Grazie a Ketty, compagna di lavoro insostituibile e amica sincera, e a Marilisa e Micheal, per aver reso ancora più allegre le giornate in laboratorio.

Ringrazio il dottor Vincenzo Calderone e le dottoresse Lara Testai e Alma Martelli per aver curato tutti gli aspetti farmacologici di questo lavoro, e per la loro simpatia.

Grazie a tutti i dottori e dottorandi: Filippo Minutolo, Simone Bertini, Elisa Ghilardi, Elisa Nuti, Michela Antonello, Irene Banti, Musa Ahmed, Valentina Asso, Isabella Carboni, Paolo Carelli, Giovanni Prota.

Infine, ringrazio la mia famiglia, senza la quale non sarei arrivata fino a qui: grazie per avermi fatto diventare la persona che sono, vi voglio bene.