

UNIVERSITÀ DI PISA



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea specialistica in Farmacia

Potenziali inibitori dell'anidrasi carbonica: sintesi di derivati carbossilati delle benzotiopirano pirimidine e piridotiopirano pirimidine

Candidata:

Maria Letizia Ventrice

Relatori:

Dott.ssa Silvia Salerno

Prof.ssa Anna Maria Marini

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

	Pag.
<i>PARTE GENERALE</i>	1
1.Introduzione _____	1
2. Meccanismo catalitico e di inibizione delle Anidrasi Carboniche _____	4
2.1. α -CAs _____	5
3. Utilizzo clinico generale degli inibitori della Anidrasi Carbonica _____	9
3.1. Diuretici inibitori dell' Anidrasi Carbonica _____	15
3.2. Inibitori dell' Anidrasi Carbonica quali farmaci per disturbi oculari _____	16
3.3. Inibitori dell' Anidrasi Carbonica quali potenziali farmaci anti-obesità _____	21
3.4. Inibitori dell' Anidrasi Carbonica quali farmaci per osteoporosi _____	24
3.5. Inibitori dell' Anidrasi Carbonica quali potenziali farmaci anticancro _____	25
3.6. Inibitori dell' Anidrasi Carbonica nella diagnosi del Cancro _____	33
<i>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE</i>	35
<i>PARTE SPERIMENTALE</i>	48
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	54

Parte Generale

1. INTRODUZIONE [1]

Le ANIDRASI CARBONICHE (CAs) sono zinco-enzimi ubiquitari, presenti nei procarioti e negli eucarioti e sono codificati da quattro distinte famiglie genetiche di diversa evoluzione:

- α -CAs, presenti nei vertebrati, nelle alghe e nel citoplasma delle piante verdi;
- β -CAs, principalmente presenti nei batteri, nelle alghe e nei cloroplasti, sia delle monocotiledoni che delle dicotiledoni;
- γ -CAs, presenti soprattutto negli archeobatteri ed in altri batteri;
- δ -CAs, presenti in alcune diatomee marine [2,3].

Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici isoenzimi delle α -CAs i quali sono stati numerati da I a XIV. Recentemente, un ulteriore enzima CA (CA XV) è stato evidenziato in diverse specie animali eccetto che negli esseri umani e negli scimpanzé.

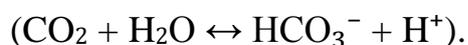
Gli isoenzimi della CA si distinguono in base alla diversa distribuzione subcellulare e tissutale o alla modulazione dell'attività catalitica (idratazione della CO₂), dovuta alle differenze strutturali presenti nel loro sito attivo. Le CAs sono citosoliche (isoenzimi I, II, III, VII e XIII), mitocondriali (isoenzimi VA e VB), legati alla membrana (isoenzimi IV, IX, XII, XIV e XV) o secreti nella saliva (isoenzima VI). Altri isoenzimi chiamati CARPs (proteine legate all'anidrasi carbonica) sono acatalitici e sono presenti nel citosol.

In questi la perdita della classica attività catalitica della CA è la conseguenza della mancanza dei residui di istidina richiesti per legare lo ione zinco (Tabella 1).

Isoenzima	Attività catalitica Idratazione CO ₂	Affinità per le solfonammidi	Localizzazione subcellulare
CA I	Moderata	Media	Citosol
CA II	Alta	Molto alta	Citosol
CA III	Molto bassa	Molto bassa	Citosol
CA IV	Alta	Alta	Legato alla membrana
CA VA	Bassa-moderata	Alta	Mitocondrio
CA VB	Alta	Alta	Mitocondrio
CA VI	Moderata	Alta	Secreto nella saliva/latte
CA VII	Alta	Molto alta	Citosol
CARP VIII	Acatalitica	Sconosciuta	Citosol
CA IX	Moderata-alta	Alta	Transmembrana
CARP X	Acatalitica	Sconosciuta	Secreto
CARP XI	Acatalitica	Sconosciuta	Secreto
CA XII	Bassa	Molto alta	Transmembrana
CA XIII	Moderata	Medio-alta	Citosol
CA XIV	Moderata	Alta	Transmembrana
CA XV	Bassa	Sconosciuta	Legato alla membrana

Tabella 1. Isoenzimi α -CA nei vertebrati superiori.

Le CAs catalizzano una reazione molto semplice: l'interconversione tra anidride carbonica e ione bicarbonato:



In tal modo, esse sono coinvolte in un cruciale processo fisiologico connesso alla respirazione e al trasporto di CO₂/bicarbonato attraverso i tessuti metabolizzanti e i polmoni. Regolano il pH e l'omeostasi della CO₂, la secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti /organi, le reazioni di biosintesi (come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'ureogenesi), il

riassorbimento osseo e la calcificazione. Inoltre, alcune recenti evidenze sperimentali suggeriscono che le CAs sono coinvolte nei processi patologici (tumorigenicità, obesità, epilessia) [2,3].

Molti di questi isoenzimi sono bersaglio di inibitori con diverse applicazioni terapeutiche. Alcuni inibitori clinici della CA includono acetazolamide, metazolamide, etossizolamide.

Oltre alle reazioni fisiologiche, come l'idratazione reversibile della CO₂ a bicarbonato (reazione 1.1, Figura 1) le α-CAs catalizzano una varietà di altre reazioni:

- l'idratazione del cianato ad acido carbammico, o della cianammide ad urea (reazioni 1.2 e 1.3);
- l'idratazione dell'aldeide a gem-diolo (reazione 1.4);
- l'idrolisi dell'estere carbossilico, o solfonico (reazioni 1.5, 1.6), così come altri processi idrolitici minori, come quelli descritti dalle equazioni 1.7-1.9 in Figura 1 [4].

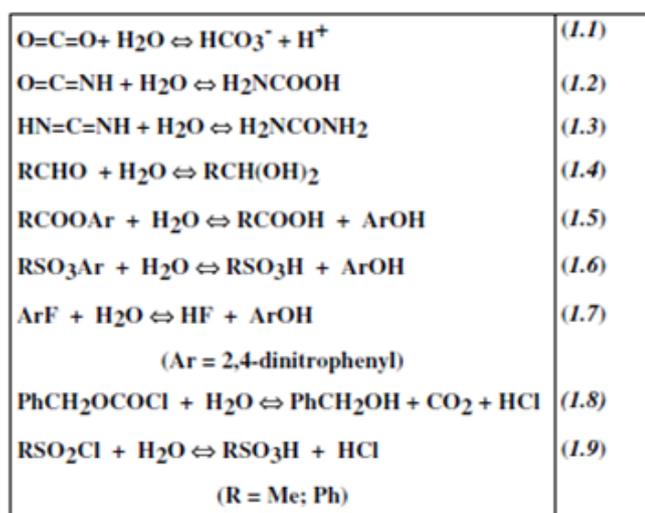


Figura 1. Reazioni catalizzate dalle α-CAs.

Bisognerebbe notare che l'attività fosfatase precedentemente descritta della CA III è stata recentemente provata essere un artefatto [2].

Non è chiaro in questo momento se altre reazioni catalizzate dalla α -CA come l'idratazione della CO_2 hanno un significato fisiologico.

E' stata attualmente determinata la struttura cristallografica a raggi X per sei α -CAs (isozimi CA I-VA, CA XII e CA XIV) [2,5] così come per alcuni isoenzimi rappresentativi delle famiglie di β - e γ -CA.

Recentemente, è stato dimostrato che due isoforme di CA sono associate prevalentemente al cancro, dove esse sono coinvolte nella regolazione del pH e nella progressione del tumore. Recenti approcci nel capire il loro ruolo esatto hanno portato allo sviluppo di nuovi inibitori dell'anidrasi carbonica come agenti terapeutici antitumorali e/o diagnostici.

2. MECCANISMO CATALITICO E DI INIBIZIONE DELLE ANIDRASI CARBONICHE [1]

Il meccanismo catalitico delle CAs è conosciuto in dettaglio [6]: in tutte le classi di enzimi una specie metallica idrossilata ($\text{L}_3\text{-M}^{2+}\text{-OH}^-$) dell'enzima è la specie cataliticamente attiva, agendo come un forte nucleofilo (a pH neutro) sulla molecola di CO_2 all'interno di una tasca idrofobica nelle vicinanze. Questa specie metallica idrossilata si genera dall'acqua coordinata con lo ione metallico, il quale si trova in fondo alla cavità del sito attivo. Il centro attivo normalmente comprende ioni M(II) in una geometria tetraedrica, con tre proteine Ligande (L) in aggiunta alla molecola d'acqua/ione idrossido, ma lo Zn(II) e il Co(II) sono stati anche osservati nelle geometrie di coordinazione trigonale bipyramidale o ottaedrica, per lo meno nelle γ -CAs.

In molti enzimi, la formazione della specie metallica idrossilata dal metallo-coordinato con l'acqua rappresenta lo stadio determinante del turnover catalitico. Per qualche α - e ζ -CAs la $K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ raggiunge valori $>10^8 \text{ M}^{-1}$

s⁻¹; questo rende le CAs fra i più efficienti catalizzatori conosciuti in natura. I ligandi ionici metallici sono tre residui di His negli α -, γ -, e δ -CAs o una His e due residui di Cys nei β - e ζ -CAs. Qualche enzima della classe β ha quattro ligandi zinco proteina, che sono, una His, due Cys, e un Asp coordinato allo Zn(II). Per questi enzimi l'acqua non è coordinata allo ione metallico a valori di pH <8, come mostrato in un eccellente lavoro di cristallografia del gruppo di Jones sugli enzimi micobatterici Rv3558 e Rv1284. Tuttavia, a valori di pH >8, un residuo di Arg conservato in tutte le β -CAs studiate finora (appartenenti al così chiamato elemento bivalente catalitico) forma un ponte salino con l'Asp coordinato allo Zn(II), liberando la quarta posizione di coordinazione dello Zn(II), la quale viene poi occupata dall'ingresso di una molecola d'acqua/ ione idrossido.

L'inibizione e l'attivazione delle CAs sono processi ben conosciuti, con la maggior parte degli inibitori che si legano al centro del metallo, e gli attivatori che si legano all'ingresso della cavità del sito attivo e che partecipano allo spostamento dei protoni tra lo ione metallico legato ad una molecola d'acqua e l'ambiente. Questo porta all'aumento della formazione del metallo idrossilato, la specie cataliticamente attiva dell'enzima [7,8].

2.1. α -CAs

Lo ione metallico (come lo Zn(II) presente in tutte le α -CAs studiate finora) è essenziale per la catalisi [2,3]. I dati cristallografici a raggi X della struttura cristallina hanno dimostrato che lo ione metallico è situato nella tasca del sito attivo profonda 15 Å (Figura 2) ed è coordinato con tre residui di istidina (His94, His96 e His119) e una molecola d'acqua/ione idrossido [2,3].

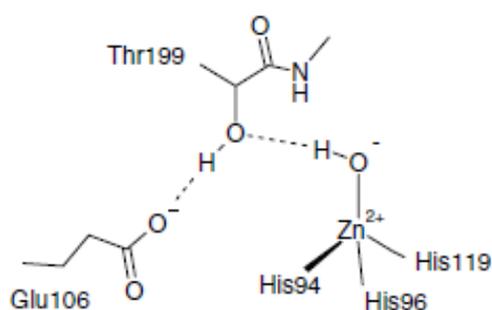


Figura 2. Struttura della α -CAs. Lo ione metallico (Zn^{2+}) è coordinato con tre residui di istidina e una molecola d'acqua.

L'acqua legata allo zinco è anche impegnata nella formazione di un legame a idrogeno con l'idrossile della Thr199, che a sua volta è collegata con il carbossilato del Glu106; queste interazioni aumentano la nucleofilicità della molecola d'acqua legata allo zinco, e orientano il substrato (CO_2) in una posizione favorevole per l'attacco nucleofilo (Figura 3) [2,3].

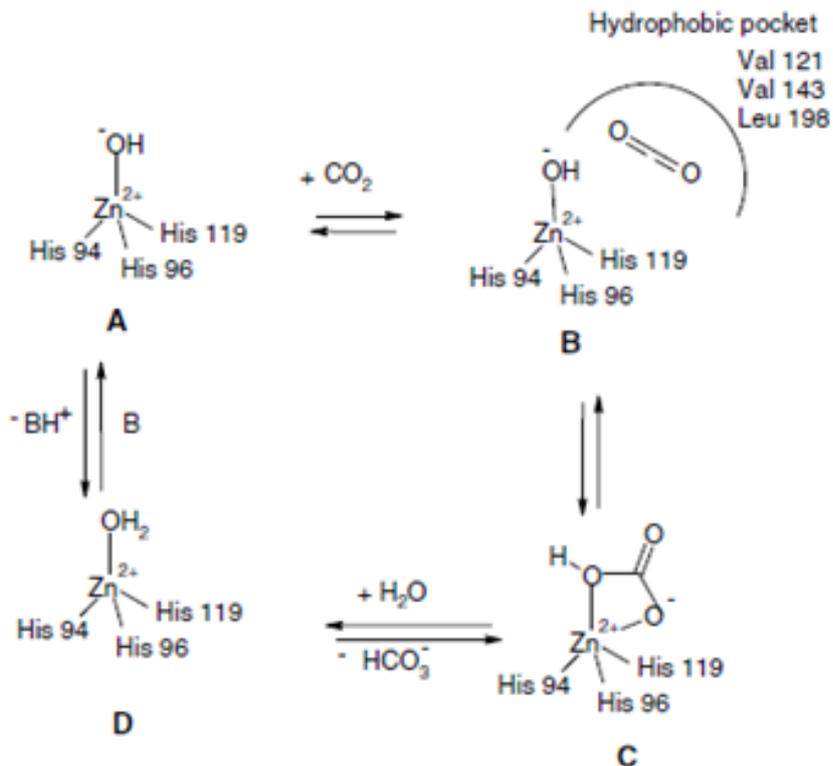
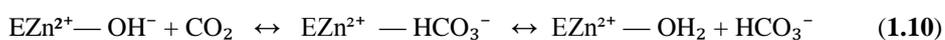


Figura 3. Ruolo della molecola d'acqua legata allo zinco.

La forma attiva dell'enzima è la base, con l'idrossido legato allo Zn(II) (Fig. 3A). Questo forte nucleofilo attacca la molecola di CO₂ legata in una tasca idrofobica nelle sue vicinanze (il sito di legame del substrato comprende residui di Val121, di Val143 e di Leu198 nel caso dell'isoenzima umano CAII) (Fig. 3B), portando alla formazione di bicarbonato coordinato allo Zn(II) (Fig. 3C). Lo ione bicarbonato viene poi spiazzato da una molecola d'acqua e liberato in soluzione, portando alla forma acida dell'enzima, con l'acqua coordinata allo Zn(II) (Fig. 3D), che è la forma cataliticamente inattiva [2,3]. Al fine di rigenerare la base A, ha luogo una reazione di trasferimento di un protone dal sito attivo all'ambiente circostante, che può essere sostenuta sia da residui del sito attivo (come l'His64- il protone navetta negli isoenzimi I, II, IV, VII, IX e XII-XIV tra gli altri) che da tamponi presenti nel mezzo.

Il processo può essere schematicamente rappresentato dalle equazioni (1.10) e (1.11):



Il passaggio chiave nella catalisi è la seconda reazione, ovvero il trasferimento del protone che rigenera la specie Zn-idrossido dell'enzima [2,3,9]. Negli isoenzimi cataliticamente molto attivi, come CA II, CA IV, CA VII e CA IX, il processo è sostenuto da un residuo di istidina posto all'ingresso del sito attivo (His64), e da un gruppo di istidine, che sporgono dal bordo del sito attivo sulla superficie dell'enzima, assicurando così un processo di trasferimento di protoni molto efficace per l'isoenzima CA II [9]. Questo spiega anche perché CA II è uno degli enzimi più attivi conosciuti (con una $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e fornisce anche

importanti basi per la progettazione di suoi inibitori con applicazioni cliniche [2,3,9].

Le solfonammidi, che sono i più importanti CAIs, come i derivati usati in clinica acetazolamide, metazolamide, etossizolamide, diclorofenamide, dorzolamide e brinzolamide [11], legano lo ione Zn(II) con una geometria tetraedrica (Figura 4A), allo stato deprotonato, con l'atomo di azoto della solfonammide coordinato allo Zn(II) e formano un'estesa rete di legami a idrogeno, coinvolgendo residui di Thr199 e di Glu106, che partecipano anche all'ancoraggio della molecola di inibitore allo ione metallico. La parte aromatica/eterociclica dell'inibitore (R) interagisce con residui idrofilici e idrofobici della cavità. Gli anioni si possono legare sia con un geometria tetraedrica allo ione metallico (1.12), sia come addotti trigonali-bipiramidali (1.13), come ad esempio l'addotto tiocianato mostrato in Fig. 4B [10,11].



Tetrahedral adduct



Trigonal-bipyramidal adduct

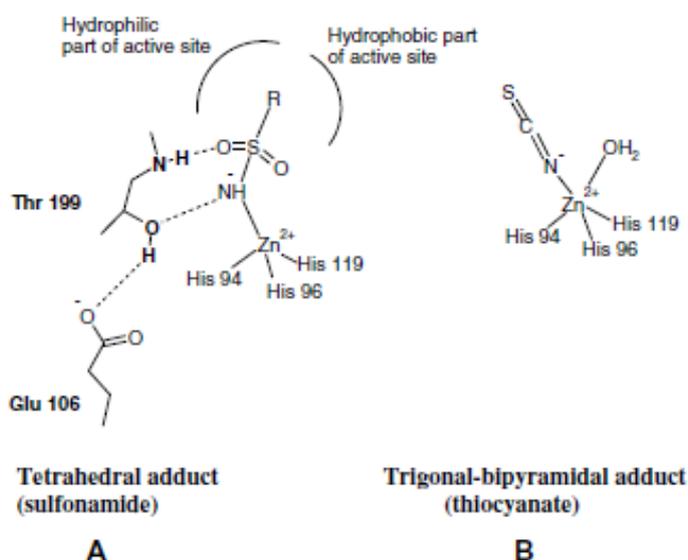


Figura 4. Interazione dei CAIs con lo ione Zn^{2+} .

3. UTILIZZO CLINICO GENERALE DEGLI INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA

Sono stati sviluppati ed impiegati clinicamente quattro tipi di solfonammidi CAI come farmaci antiglaucoma: acetazolamide, metazolamide, etossizolamide e diclorofenamide [11]. Come visto dai dati della Tabella 2, i composti riportati inibiscono fortemente la maggior parte degli isoenzimi CA (CA I, CA II, CA IV, CA V, CA VII, CA IX e CA XII-XIV), con affinità, per molti di essi, nel range del basso nanomolare.

Recentemente, sono stati introdotti nella pratica clinica due nuovi farmaci, CAI a struttura solfonammidica per uso topico, la dorzolamide e la brinzolamide, risultati potenti inibitori della maggior parte degli isoenzimi α -CA (Tabella 2).

Nella tabella 2 sono riportati i dati di inibizione verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi di composti utilizzati in clinica (come le solfonammidi, il topiramato ed il suo derivato sulfamidico)(figura 5).

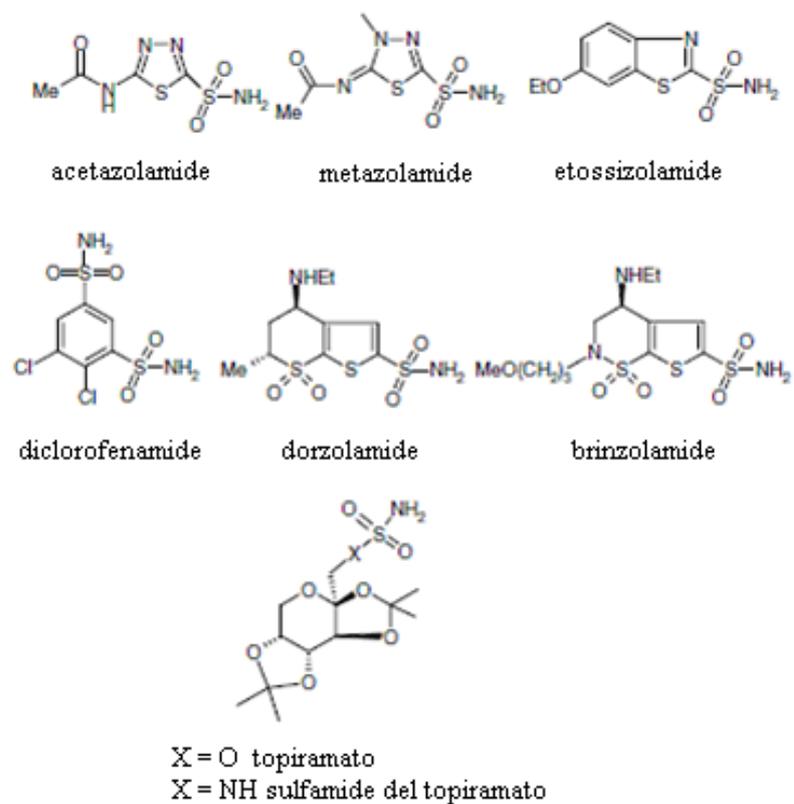


Figura5. Composti utilizzati in clinica.

Composto	Isoenzima K _i (nM)											
	CA I	CA II	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	CA XIII	CA XIV
Acetazolamide	250	12	3.10	74	63	54	11	2.5	25	5.7	17	41
Metazolamide	50	14	1.10	6200	65	62	10	2.1	27	3.4	19	43
Etossizolamide	25	8	5000	93	25	19	43	0.8	34	22	nt	25
Diclorofenamamide	1200	38	nt	15000	630	21	79	26	50	50	23	345
dorzolamide	50000	9	8000	8500	42	33	10	3.5	52	3.5	18	27
Brinzolamide	45000	3	nt	nt	50	30	0.9	2.8	37	3.0	nt	24
Topiramato	250	10	nt	4900	63	30	45	0.9	58	3.8	47	1460
topiramato sulfamide	3450	2135	nt	941	32	21	nt	35	4580	1875	30	25

Tabella 2. Dati di inibizione di composti utilizzati in clinica verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi.

Alcuni di questi inibitori potrebbero essere usati per il trattamento sistemico del glaucoma, ed ancora più recentemente, sono stati scoperti derivati più nuovi che sono potenziali agenti antiglaucoma per uso topico, come anche antitumorali, anti-obesità o farmaci anti-infettivi [12-16]

Gli effetti inibitori di alcuni di questi farmaci usati clinicamente verso le isoforme presenti nei mammiferi CA I-XIV, di origine umana o di topo, sono mostrate in Tabella 3.

K _i (nm)	Isozyme (h = human, m = mouse)											
	hCA I ^h	hCA II ^h	hCA III ^h	hCA IV ^h	hCA VA ^h	hCA VB ^h	hCA VI ^h	hCA VII ^h	hCA IX ^h	hCA XII ^h	mCA XIII ^h	hCA XIV ^h
1	250	12	2 × 10 ⁵	74	63	54	11	2.5	25	5.7	17	41
2	50	14	7 × 10 ⁴	6,200	65	62	10	2.1	27	3.4	19	43
3	25	8	1 × 10 ⁶	93	25	19	43	0.8	34	22	50	2.5
4	374	9	6.3 × 10 ⁵	95	81	91	134	6	43	56	1,450	1,540
5	1,200	38	6.8 × 10 ⁵	15,000	630	21	79	26	50	50	23	345
6	50,000	9	7.7 × 10 ⁵	8,500	42	33	10	3.5	52	3.5	18	27
7	45,000	3	1.1 × 10 ⁵	3,950	50	30	0.9	2.8	37	3.0	10	24
8	31	15	10,400	65	79	23	47	122	24	3.4	11	106
9	250	10	7.8 × 10 ⁵	4,900	63	30	45	0.9	58 ^l	3.8	47	1,460
10	56	35	2.2 × 10 ⁶	8,590	20	6,033	89	117	5.1	11,000	430	5,250
11	12,000	40	10,600	6.5 × 10 ⁵	174	18	0.8	3,630	46	3.9	295	110
12	3,450	21	7.0 × 10 ⁵	24	765	720	653	23	34	12	1,050	755
13	37	10	6.5 × 10 ⁵	NT	NT	NT	NT	NT	30	7.5	NT	NT
14	50,000	21	7.4 × 10 ⁴	880	794	93	94	2,170	16	18	98	689
15	54,000	43	7.8 × 10 ⁴	1,340	912	88	572	3,900	27	13	425	107
16	18,540	5,950	1.0 × 10 ⁶	7,920	10,060	7,210	935	10	103	633	12,100	773
17	1,300	45	1.3 × 10 ⁶	650	134	76	145	18	24	5	76	33
18	4,000	21	3.1 × 10 ⁵	60	88	70	65	15	14	7	21	13
19a	328	290	7.9 × 10 ⁵	427	4,225	603	3,655	5,010	367	355	3,885	4,105
20	35,000	1,260	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21	54,000	2,000	6.1 × 10 ⁵	216	750	312	1,714	2.1	320	5.4	15	5,432
22	348	138	1.1 × 10 ⁴	196	917	9	1,347	2.8	23	4.5	15	4,130
23	51,900	2,520	2.3 × 10 ⁵	213	890	274	1,606	0.23	36	10	13	4,950
24	62	65	3.2 × 10 ⁶	564	499	322	245	513	420	261	550	52
25	4,930	6,980	3.4 × 10 ⁶	303	700	NT	NT	NT	25.8	21.2	2,570	250

Tabella 3. Effetti inibitori di alcuni farmaci usati clinicamente verso le isoforme presenti nei mammiferi CA I-XIV, di origine umana o di topo.

Dal momento che specifici isoenzimi sono responsabili di differenti risposte biologiche, il loro diverso profilo di inibizione può spiegare le reali

applicazioni cliniche dei CAI, che vanno da farmaci diuretici e antiglaucoma, a farmaci antitumorali, anti-obesità e anti-epilettici.

Tuttavia, un problema cruciale nella progettazione di nuovi CAI è relativo all'elevato numero di isoforme, la loro diffusa localizzazione in molti tessuti e organi (Tabella 4), e la mancanza di selettività degli inibitori attualmente disponibili nei confronti dell'isoenzima.

Isozyme	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	K_i (nM)	Subcellular localization	Tissue/organ localization
hCAI	2.0×10^5	4.0	5.0×10^7	250	Cytosol	Erythrocytes, GI tract
hCAII	1.4×10^6	9.3	1.5×10^8	12	Cytosol	Erythrocytes, eye, GI tract, bone osteoclasts, kidney, lung, testis, brain
hCAIII	1.0×10^4	33.3	3.0×10^5	2.1×10^5	Cytosol	Skeletal muscle, adipocytes
hCAIV	1.1×10^6	21.5	5.1×10^7	74	Membrane-bound	Kidney, lung, pancreas, brain capillaries, colon, heart muscle
hCAVA	2.9×10^5	10.0	2.9×10^7	63	Mitochondria	Liver
hCAVB	9.5×10^5	9.7	9.8×10^7	54	Mitochondria	Heart and skeletal muscle, pancreas, kidney, spinal cord, GI tract
hCAVI	3.4×10^5	6.9	4.9×10^7	11	Secreted (saliva, milk)	Salivary and mammary glands
hCAVII	9.5×10^5	11.4	8.3×10^7	2.5	Cytosol	CNS
hCAVIII	ND	ND	ND	ND	Cytosol	CNS
hCAIX	3.8×10^5	6.9	5.5×10^7	25	Transmembrane	Tumours, GI mucosa
hCAX	ND	ND	ND	ND	Cytosol	CNS
hCAXI	ND	ND	ND	ND	Cytosol	CNS
hCAXII	4.2×10^5	12.0	3.5×10^7	5.7	Transmembrane	Renal, intestinal, reproductive epithelia, eye, tumours
hCAXIII	1.5×10^5	13.8	1.1×10^7	16	Cytosol	Kidney, brain, lung, gut, reproductive tract
hCAXIV	3.1×10^5	7.9	3.9×10^7	41	Transmembrane	Kidney, brain, liver
mCA XV	4.7×10^5	14.2	3.3×10^7	72	Membrane-bound	Kidney

Tabella 4. Localizzazione delle diverse isoforme di CA in tessuti e organi.

Le condizioni riducenti presenti nei tumori ipossici, in combinazione con la presenza della proteina ridotta tioredoxina-1, mediano la riduzione del legame disolfuro con formazione di tioli [16]. I composti ridotti (tioli) sono meno ingombranti e mostrano un'eccellente attività inibitoria delle CAs

(nel range del basso nanomolare) rispetto ai disolfuri corrispondenti, i quali hanno difficoltà ad entrare nello spazio limitato del sito attivo dell'enzima [16].

I classici inibitori della CA (CAIs) sono le solfonammidi primarie, R-SO₂-NH₂ che vengono utilizzate clinicamente da più di 50 anni come diuretici e farmaci antiglaucoma per uso sistemico. Infatti, ci sono circa 30 farmaci usati clinicamente (o farmaci in via di sviluppo) che appartengono alla classe delle solfonammidi o dei sulfamati, **1-25**, (Figura 6) che hanno mostrato una significativa attività inibitoria della CA. Oltre al ruolo definito per questi CAIs come agenti diuretici e antiglaucoma, è emerso recentemente che hanno un potenziale come farmaci anticonvulsivanti, antiobesità, antitumorali, antipánico, e antinfettivi [17,18]. Tuttavia, i punti critici per la progettazione di CAIs come agenti terapeutici riguardano l'elevato numero di isoforme negli umani (16 CAs, di cui 13 hanno attività catalitica), la loro piuttosto diffusa localizzazione in molti tessuti/organi, e la mancanza di selettività dell'isoenzima nei confronti degli inibitori solfonamidici/sulfamati attualmente disponibili [17,18].

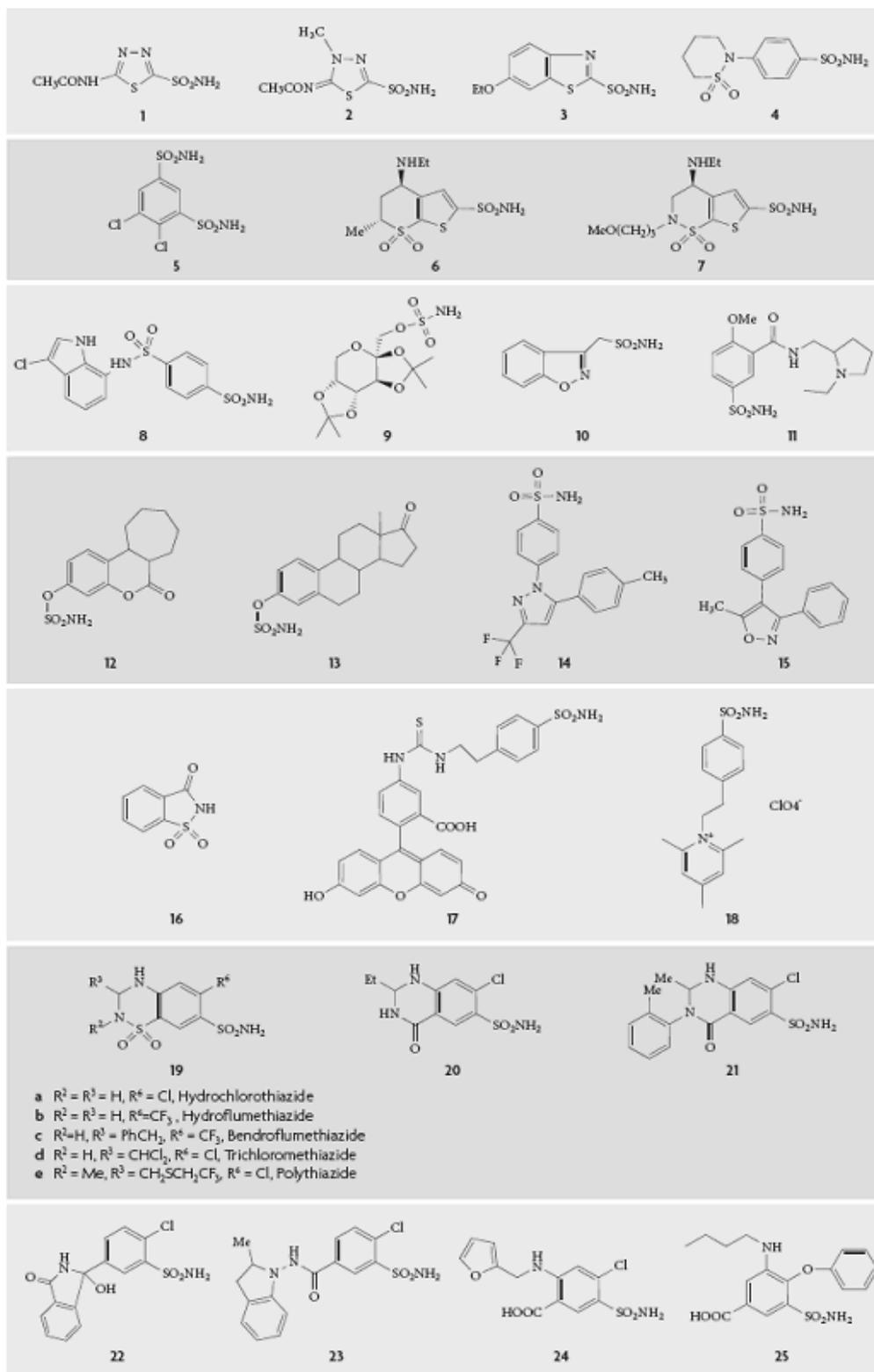


Figura 6. Farmaci usati clinicamente o in via di sviluppo, appartenenti alla classe delle sulfonammidi o dei sulfamati, che hanno mostrato una significativa attività inibitoria della CA.

Infatti, tra i derivati **1-25**, non ci sono composti che inibiscono selettivamente una specifica isoforma di CA con valori terapeutici. Tuttavia il loro profilo di inibizione dei 13 isoenzimi di mammiferi è molto variabile e possono essere usati per la progettazione di *scaffold* di farmaci di nuova generazione, inibitori isoforma-selettivi.

Ultimamente sono stati fatti notevoli progressi in questo campo.

3.1. DIURETICI INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA

Le CAs sono molto abbondanti nei reni e le isoforme presenti in questo organo giocano un ruolo cruciale in almeno tre processi fisiologici:

- il bilancio omeostatico acido-base (con la secrezione e l'escrezione di protoni, dovuta alla reazione di idratazione della CO₂ catalizzata da questi enzimi);
- il processo di riassorbimento del bicarbonato;
- l'escrezione di NH₄⁺.

L'acetazolamide (**1**) è stato il primo diuretico non-mercuriale ad essere usato clinicamente nel 1956 [11]. Tale composto rappresenta il prototipo di una classe di agenti farmacologici con un uso terapeutico relativamente limitato, ma che ha giocato un importante ruolo nello sviluppo delle basi della fisiologia e farmacologia renale, e nella progettazione della maggior parte degli agenti diuretici attualmente usati, come la tiazide e i diuretici *high-ceiling*. Continuando la somministrazione di CAI come l'acetazolamide, il volume delle urine aumenta e diventa alcalino. Il bicarbonato aumentato viene eliminato con le urine, insieme al Na⁺ e al K⁺ mentre la quantità di cloruro escreto diminuisce. Questa sequenza di eventi è dovuta all'inibizione di CA nel tubulo prossimale, la quale porta all'inibizione della secrezione di H⁺ da questo segmento del nefrone.

L'inibizione degli enzimi citosolici (CA II) e di membrana (CA IV, XII e CA XIV) sembra essere coinvolta negli effetti diuretici delle solfonammidi.

Il risultato finale di questi processi è un aumento della diuresi.

Molti altri diuretici, come le benzotiadiazine (**19a-e**; per esempio, la clorotiazide e l'idroclorotiazide); quinetazone (**20**); metolazone (**21**); clortalidone (**22**); indapamide (**23**); furosemide (**24**); e bumetanide (**25**) agiscono come inibitori della CA con differente efficacia (Figura 7). Ci si può aspettare questo dal momento che molti di essi hanno solfonammidi primarie non sostituite come gruppi che legano lo zinco [19].

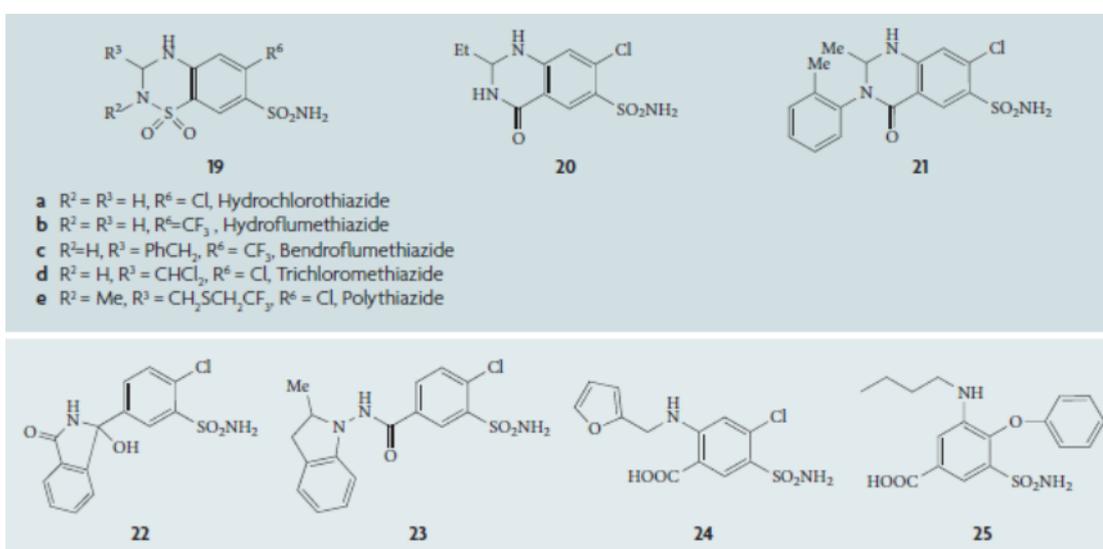


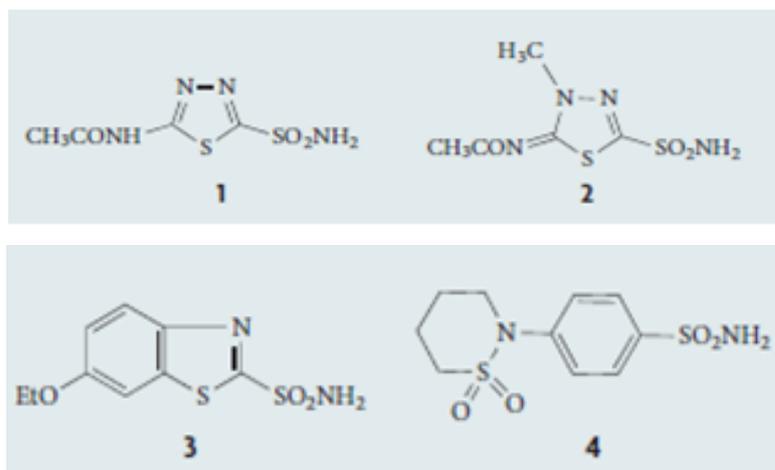
Figura 7. Diuretici inibitori della CA.

3.2. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA QUALI FARMACI PER DISTURBI OCULARI

Il glaucoma è una malattia cronica e degenerativa degli occhi, caratterizzata da un'alta pressione oculare (IOP) che causa danni irreversibili al nervo ottico, provocando una perdita progressiva della vista ed eventualmente cecità [20-22]. Studi sulla chimica e dinamica dell'umore acqueo hanno

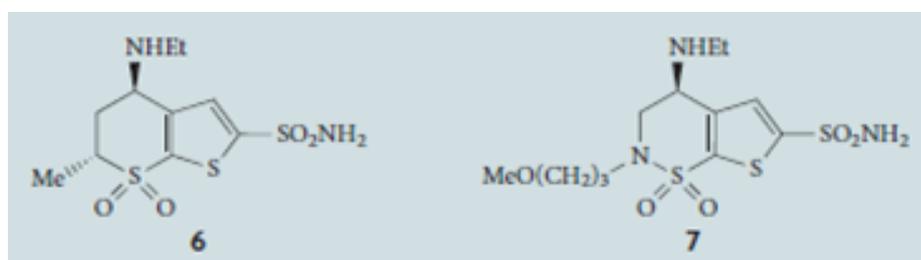
identificato che il principale costituente di questa secrezione è rappresentato dal bicarbonato di sodio.

Le CAs sono state identificate nell'uvea anteriore dell'occhio dove hanno mostrato essere responsabili della secrezione di bicarbonato. I CAIs rappresentano il trattamento fisiologico principale per il glaucoma, inibendo l'enzima del processo ciliare, l'isoenzima CA II solfonammido sensibile (Tabella 3), la secrezione di bicarbonato e di umore acqueo viene ridotta, causando il 25-30% di riduzione della IOP [20]. In realtà, l'acetazolamide (**1**) per via sistemica, la metazolamide (**2**), l'etossizolamide (**3**) o la diclorofenamide (**4**) sono ampiamente usati per trattare questo disturbo.



Il farmaco più studiato è l'acetazolamide (**1**, il cui nome commerciale è Diamox) la quale viene spesso somministrata per lunghi periodi in quanto riduce notevolmente la IOP, possedendo tossicità minima e proprietà farmacocinetiche ideali. Tuttavia, siccome le CAs sono espresse in maniera ubiquitaria nei vertebrati, la somministrazione sistemica delle solfonammidi porta all'inibizione non specifica delle CA presenti nei processi ciliari degli occhi (per esempio la CA II, IV, e XII) ed è associato ad effetti indesiderati, come torpore e formicolio delle estremità, sapore metallico, depressione, fatica, malessere, perdita di peso, diminuzione della libido, irritazione gastrointestinale, acidosi metabolica, calcoli renali e miopia transitoria.

Lo sviluppo di solfonammidi solubili in acqua quali CAIs da usare in gocce oculari iniziò nel 1990, e dal 1995 il primo agente farmacologico, la dorzolamide (**6**), è stato lanciato dalla Merck con il nome commerciale di Trusopt® [6]. Un secondo composto strutturalmente simile, la brinzolamide (**7**), è stata anche approvata (dalla Alcon con il nome commerciale di Azopt®) [6] per il trattamento topico del glaucoma insieme a β -bloccanti come il timololo (Timoptol®), e ad analoghi della PGF 2α [23], al latanoprost (Xalatan®), e al travoprost (Travatan®).



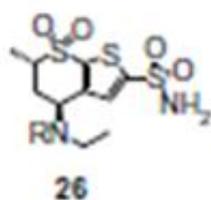
La dorzolamide e la brinzolamide sono potenti CAIs solubili in acqua che sono sufficientemente liposolubili per penetrare la cornea, e possono essere somministrati rispettivamente per via topica come idrocloride salificata (ad un pH di 5.5) o come una base libera. I due farmaci sono efficaci nel ridurre la IOP e mostrano minori effetti collaterali rispetto ai farmaci utilizzati per via sistemica.

Gli effetti collaterali osservati includono dolore, bruciore e arrossamento degli occhi, visione sfuocata e prurito, i quali sono probabilmente dovuti al pH acido della soluzione oculare di dorzolamide. E' stato anche sperimentato un sapore amaro con entrambi i farmaci CAIs sia per uso sistemico che per uso topico, il quale è probabilmente dovuto all'accumulo di farmaco a livello oculare che defluisce nell'orofaringe e che inibisce le CAs presenti nella saliva (CA VI) e nelle papille gustative (CA II e CA VI) con il conseguente accumulo di bicarbonato.

Questi composti vengono ampiamente usati per controllare il flusso di umore acqueo e la pressione intraoculare (IOP) nei pazienti con glaucoma [24].

Nuovi efficaci CAIs topici quali possibili agenti antiglaucoma sono ancora in fase di studio [22]. Un approccio ha coinvolto l'attacco di funzioni che rendono solubili in acqua e di sistemi ad anello da attaccare alle solfonammidi aromatiche o eterocicliche per ottenere composti due o tre volte più efficaci rispetto alla dorzolamide nell'abbassare la IOP nei conigli. Questi composti erano solubili in acqua (come idrocloridi, triflati o trifluoroacetati), potenti inibitori della CA II umana, penetravano la cornea e riducevano significativamente la IOP sia in conigli normotesi che in quelli affetti da glaucoma [22].

Recentemente [24] è stato proposto un altro approccio per ottenere CAIs antiglaucoma che incorporano lo scheletro della dorzolamide **6** sulla quale sono stati inseriti esteri nitrici, portando a composti del tipo **26**.



- a R = CO(CH₂)₂ONO₂ (NCX 274)
- b R = CO-*p*-(C₆H₄)-CH₂ONO₂ (NCX 265)
- c R = COO(CH₂)₂ONO₂ (NCX 278)
- d R = COO(CH₂)₄ONO₂ (NCX 245)
- e R = COOCH₂CH(ONO₂)CH₂ONO₂ (NCX 201)

Alcuni di questi hanno mostrato una elevata potenza ed efficacia NO-mediata come provato dal loro effetto rilasciante vascolare sull'anello aortico dei conigli pre-contratto da metoxamina ed hanno esercitato un forte abbassamento della IOP *in vivo* nei conigli normotesi, anticipando in tal modo il loro potenziale per il trattamento del glaucoma ipertensivo [24].

L'uso delle CAIs nel trattamento dell'edema maculare è basato sull'osservazione che l'acetazolamide (sale sodico) somministrata per via

sistemica è efficace nel trattamento di questa condizione. Un'efficacia simile è stata osservata anche con la somministrazione topica della dorzolamide e della brinzolamide [21].

Viene generalmente assunto che la scomparsa dell'edema ed il miglioramento della vista sono indipendenti dall'attività ipotensiva della solfonammide, dovuta agli effetti diretti sulla circolazione nella retina. L'acetazolamide, la dorzolamide o la brinzolamide probabilmente agiscono come vasodilatatori locali, migliorando il flusso di sangue in questo organo e di conseguenza pulendo dai prodotti di scarto metabolico.

La visione dopo essere stati sottoposti al trattamento (nelle fasi iniziali del disturbo) viene notevolmente migliorata [21].

Gao *et al.* [25] hanno recentemente dimostrato che l'isoenzima citosolico lento CA I media la permeabilità retinale emorragica e quella vascolare cerebrale attraverso l'attivazione della precallicreina e la generazione di una serina proteasi altamente attiva che è il fattore XIIa.

Questi fenomeni contribuiscono alla patogenesi della retinopatia diabetica proliferativa e dell'edema maculare diabetico, che rappresentano le principali cause della perdita della vista, e per i quali non ci sono trattamenti farmacologici attualmente disponibili. Perciò, come sostenuto dagli autori, l'inibizione della CA I può essere un bersaglio terapeutico per il trattamento di queste condizioni. Infatti, attualmente, sono disponibili potenti inibitori della CA I. Qualcuna delle isoforme associate alla membrana, come la CA IV, IX e la XII, sono anche considerate come i possibili bersagli delle solfonammidi antiglaucoma [26-28]. L'isoenzima bovino CA IV ha mostrato di essere sensibile all'inibizione da parte di molte solfonammidi e sulfamati, con una K_i nel range del basso nanomolare [26]. Tuttavia, la corrispondente isoforma umana, CA IV, mostra un diverso funzionamento, con qualche farmaco, come l'acetazolamide, l'etossizolamide e il sultiame, che agiscono come degli

efficaci inibitori, mentre altri agenti antiglaucoma, come la metazolamide, la diclorofenamide, la dorzolamide e la brinzolamide, agiscono come deboli inibitori (Tabella 3), il che suggerisce che è improbabile che la CA IV sia coinvolta nella secrezione dell'umore acqueo, dato che viene inibito debolmente dalla maggior parte delle solfonammidi antiglaucoma.

Tuttavia, la CA XII (ma non la CA IX) ha recentemente mostrato di essere altamente espressa negli occhi di pazienti con glaucoma, e probabilmente gioca un ruolo importante nell'aumento della IOP caratteristica del disturbo [28].

Successivamente è stato mostrato che la CA XII viene altamente inibita da tutte le solfonammidi antiglaucoma usate clinicamente (Tabella 3), e questa è probabilmente l'isoforma di membrana coinvolta nel glaucoma che viene bersagliato da questi agenti.

3.3. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA QUALI POTENZIALI FARMACI ANTI-OBESITÀ

Tra le isoforme α -CA trovate negli animali, due degli isoenzimi CA, VA e VB, sono presenti nei mitocondri (Tabella 4). Questi isoenzimi sono coinvolti in differenti processi biosintetici, come l'ureogenesi, la gluconeogenesi e la lipogenesi, nei vertebrati (per esempio nei roditori) e negli invertebrati (per esempio nelle cavallette) [29].

L'approvvigionamento di sufficiente substrato, il bicarbonato, in diversi processi biosintetici che coinvolgono la piruvato carbossilasi (PC), l'acetil-Co-A carbossilasi (ACC) e la carbamoil-fosfato sintetasi I e II, viene assicurato principalmente dalla reazione catalitica che coinvolge gli isoenzimi mitocondriali CA VA e CA VB, probabilmente aiutati dall'elevata attività dell'isoenzima citosolico CA II (Figura 8) [29].

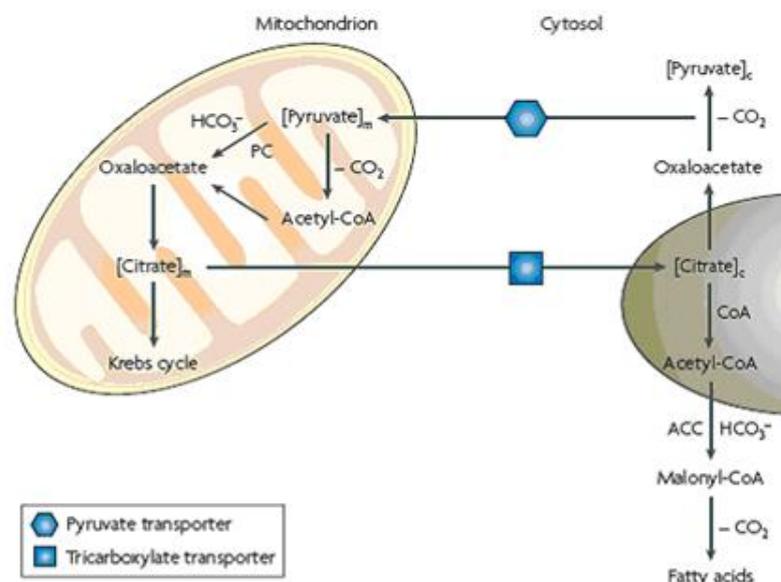


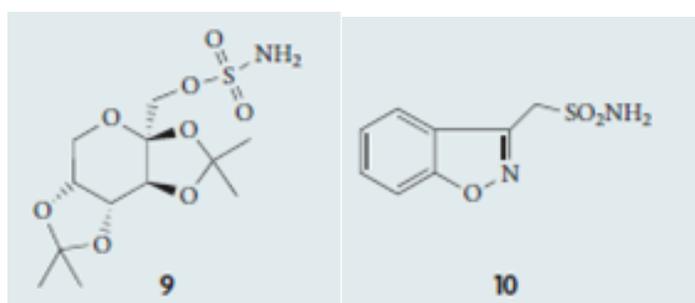
Figura 8. Sintesi del substrato, il bicarbonato, a livello mitocondriale.

Diversi studi hanno evidenziato che le CAIs hanno un potenziale come farmaci anti-obesità, che può essere dovuto per i loro effetti sugli isoenzimi CA.

Il topiramato (9) è un farmaco anti-epilettico che possiede potenti effetti anticonvulsivanti per un meccanismo d'azione multifattoriale: il blocco dei canali al sodio e dei recettori cainato/AMPA (acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo-propionico), la ritenzione di CO_2 secondaria all'inibizione dei globuli rossi del sangue e degli isoenzimi CA del cervello, come l'aumento del sistema di trasmissione GABA (acido- γ -amminobutirrico)-ergico [30]. Un effetto collaterale di questo farmaco, osservato in pazienti obesi era la perdita di peso corporeo, anche se nessuna spiegazione farmacologica di tale fenomeno è stata fornita [31]. Inoltre, il topiramato ha mostrato di ridurre le calorie e i grassi acquistati nei ratti obesi e in ratti Zucker. E' stato recentemente dimostrato che il topiramato è anche un potente inibitore di differenti isoenzimi CA, come la II, VA, VB, VI, VII, XII e XIII (tabella 3), ed è stata determinata la struttura cristallina a raggi X

del suo complesso con la CA II umana, rivelando le interazioni molecolari che spiegano l'elevata affinità di questo composto per il sito attivo della CA [30]. Poiché il topiramato agisce anche come un efficace inibitore degli isoenzimi CA VA e VB mitocondriali umani, l'inibizione di entrambi gli isoenzimi CA mitocondriali e citosolici coinvolti nella lipogenesi possono costituire un nuovo approccio per controllare la perdita di peso [29,31].

La zonisamide (**10**) è un altro farmaco anti-epilettico usato come terapia aggiuntiva per parziali attacchi refrattari. Tale composto ha multipli meccanismi d'azione, e mostra un ampio spettro d'azione nell'attività anticonvulsivante.



Analogamente al topiramato (**9**), recenti studi clinici hanno dimostrato un potenziale aggiuntivo per l'uso terapeutico nel dolore neuropatico, nei disturbi bipolari, nell'emigrania, nell'obesità, nelle malattie legate al cibo e nel morbo di Parkinson. La zonisamide (**10**) è una solfonammide alifatica, che inibisce in maniera potente le CAs citosoliche e mitocondriali coinvolte nella lipogenesi (tabella 3). Inoltre, la zonisamide in associazione con una dieta povera di calorie (deficit di 500 Kcal per giorno), ha prodotto, in più, una riduzione del peso medio di 5 Kg confrontato con una sola dieta effettuata da pazienti obese di sesso femminile [32].

Sia il topiramato (**9**) che la zonisamide (**10**) determinano una perdita di peso dovuta all'inibizione della lipogenesi, mediata da questi due agenti, che a loro volta è mediata dall'inibizione di alcuni isoenzimi CA coinvolti nella carbossilazione del piruvato ad ossaloacetato (isoforme mitocondriali CA VA e VB) e dell'acetil-coenzima-A a malonil-coenzima-A (isoforma

citosolica CA II), come mostrato schematicamente in Figura 8. L'effetto globale è una potente inibizione della lipogenesi. Attualmente, una combinazione del topiramato **9** (sostenuta forma di rilascio) con la fentermina, Qnexa, è in fase III di sperimentazione clinica per il trattamento dell'obesità, mettendolo in una prima classe di farmaci, con un nuovo meccanismo d'azione.

Quindi, l'inibizione delle isoforme mitocondriali CA VA e VB, probabilmente in associazione con le isoforme citosoliche CA II che sono ubiquitarie, possono rappresentare i bersagli per nuovi farmaci anti-obesità che riducono la lipogenesi inibendo le CA [29].

3.4. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA QUALI FARMACI PER L'OSTEOPOROSI

L'isoforma CA II altamente attiva è abbondante nelle ossa ed è presente solo negli osteoclasti a concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quello presente a livello dei reni. Il suo ruolo è quello di fornire ioni idrogeno, formati dall'idratazione della CO₂, ad una pompa protonica ATP-dipendente, la quale li utilizza nella mobilizzazione del calcio dalle ossa. Queste attività sono richieste per la dissoluzione della matrice inorganica che precede la rimozione enzimatica della matrice organica delle ossa. Per valutare il ruolo fisiologico delle CAs di membrana negli osteoclasti, sono stati usati nuovi inibitori della CA che non permeano la membrana strutturalmente correlati al composto **18** [33].

In una coltura di osteoclasti di ratti, che sono stati esposti ad una bassa concentrazione di inibitore, è stato osservato un aumentato numero di osteoclasti e un'attività di riassorbimento osseo. Il trattamento con inibitori disturba anche l'acidificazione intracellulare degli osteoclasti. Gli isoenzimi

di membrana CA IV e CA XIV sono espressi negli osteoclasti *in vivo* e *in vitro*. In aggiunta, gli esperimenti sugli inibitori forniscono nuove evidenze a supportare l'ipotesi che la regolazione del pH intracellulare negli osteoclasti può coinvolgere il trasporto di metaboloni e che potrebbe essere possibile l'uso di alcuni inibitori nella progettazione di nuove terapie anti-osteoporosi [33].

3.5. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA QUALI POTENZIALI FARMACI ANTICANCRO [34]

Un aspetto importante di molti tumori è l'ipossia [35]. L'inadeguato rifornimento di ossigeno è la principale conseguenza fisiopatologica della microcircolazione disturbata sia strutturalmente che funzionalmente e dei processi di diffusione dell'ossigeno deteriorati. L'ipossia nei tumori appare essere fortemente associata con la propagazione del tumore, con la trasformazione in maligno, e con la resistenza alla chemioterapia e alla radioterapia. L'ipossia regola l'espressione di differenti geni, incluso l'isoenzima CA IX, attraverso la cascata del fattore di ipossia inducibile 1 (HIF1). L'espressione della CA IX è fortemente sovra-regolata dall'ipossia e viene sotto-regolata dalla proteina soppressiva di tumori *wild type* di von Hippel-Lindau (pVHL) (Figura 9) [35].

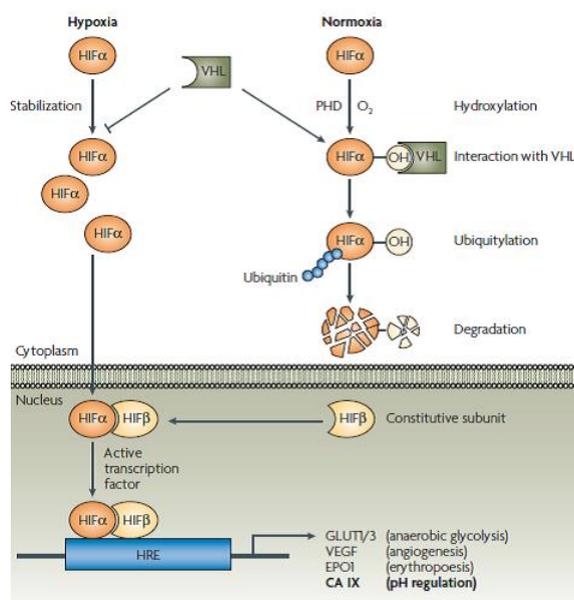


Figura 9. *Regolazione dell'espressione della CA IX.*

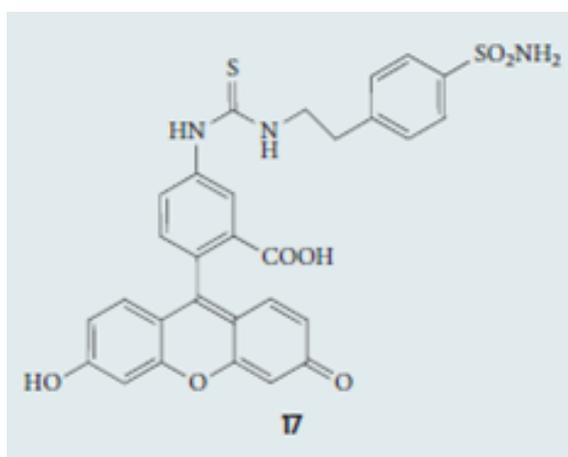
In alcune cellule cancerogene, il gene VHL è mutato portando ad una forte sovra-regolazione della CA IX (fino a 150 ripiegamenti) come conseguenza dell'attivazione dell'HIF costitutiva. L'ipossia attraverso la cascata dell'HIF porta ad una alta sovraespressione della CA IX in molti tumori. Complessivamente la conseguenza di ciò è un pH sbilanciato, con la maggior parte dei tumori ipossici che hanno un pH acido con valori intorno a 6, in contrasto con i normali tessuti, i quali hanno un pH caratteristico con valori intorno a 7.4.

La CA IX appartiene alla famiglia delle α -CAs umane molto attive, dove le sue proprietà catalitiche della reazione di idratazione della CO₂ sono paragonabili con quelle del catalizzatore CA II altamente evoluto, infatti, siccome la struttura a raggi X della CA IX non è ancora disponibile, molti studi hanno usato la struttura della CA II per il modello e il disegno di inibitori della CA IX. Come per tutte le α -CAs, la CA IX è sensibile all'inibizione da anioni, dalle solfonammidi e sulfamati, con gli inibitori che coordinano direttamente con lo ione zinco dentro la cavità del sito

attivo e che partecipano a varie interazioni favorevoli con residui amminoacidici situati nel mezzo idrofobico e idrofilico del sito attivo.

Diversi anni fa sono stati identificati molti inibitori della CA IX con concentrazioni del basso nanomolare (Tabella 3) [36-38]. Fra loro, qualche sulfamato e solfonammide è stata caratterizzata con la cristallografia a raggi X e con modelli analoghi. Tali studi hanno messo in evidenza anche composti che non permeano la membrana (e così inibiscono in modo specifico la CA IX in vivo) o agiscono come inibitori duali CA IX-COX2 (cicloossigenasi 2). Sia le solfonammidi eterocicliche che aromatiche come anche le solfonammidi/sulfamati/sulfammidi alifatiche possiedono un'attività inibitoria nell'ordine del basso nanomolare per le CA IX che sono state scoperte finora.

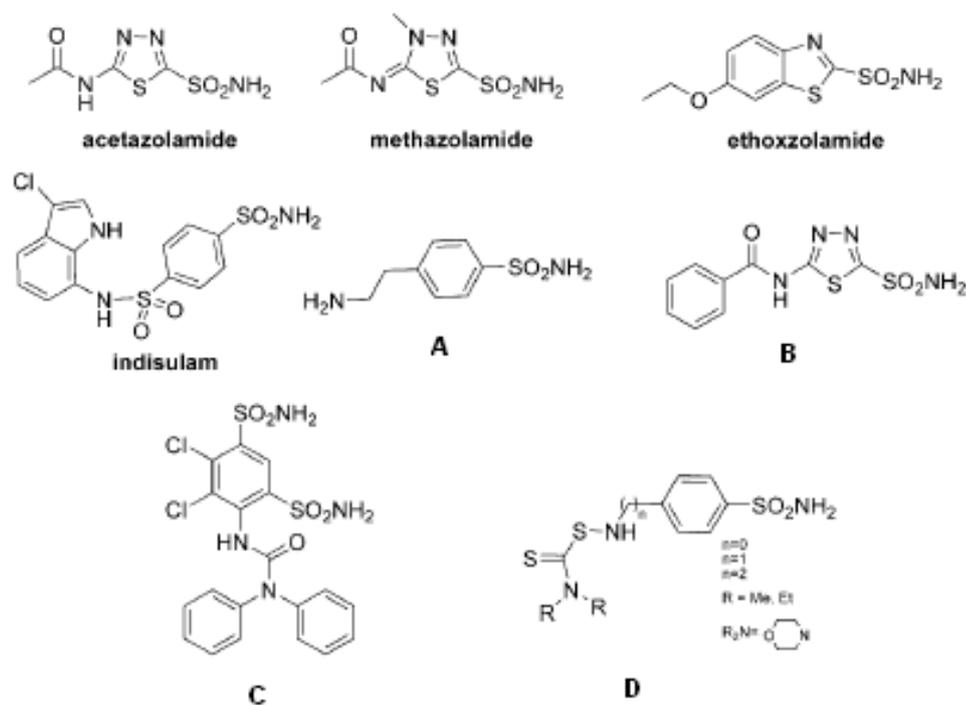
Sono state anche descritte solfonammidi che incorporano vari zuccheri, ma finora la maggior parte degli CAIs usati per comprendere la funzione di questa proteina in vivo sono stati i composti fluorescenti del tipo **17**.



I composti solfonamidici aromatici (i classici inibitori delle CAs) hanno mostrato di:

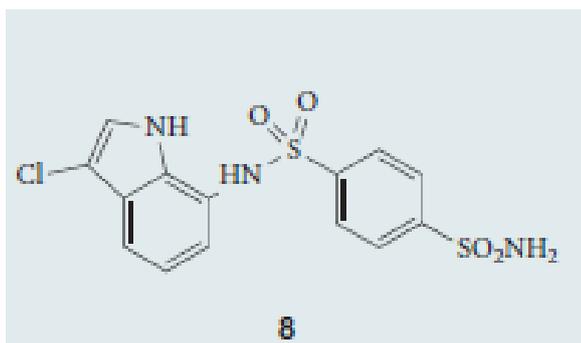
- i) invertire l'effetto dell'acidificazione tumorale (composto **A**);

- ii) inibire la crescita delle cellule cancerose con valori di GI50 (corrispondenti alla molarità degli inibitori che producono il 50% di inibizione della crescita delle cellule tumorali dopo 48 ore di esposizione al farmaco) nell'intervallo del micromolare (metazolamide, etossizolamide, indisulam, composti **B-D**);
- iii) sopprimere l'invasione del tumore mediata dalle CAs associate al cancro (acetazolamide).



Teicher e colleghi hanno riportato che l'acetazolamide ha ridotto la crescita del tumore dove veniva somministrata da sola, e ritardava lo sviluppo del tumore quando era somministrata in combinazione con diversi agenti chemioterapici [39].

Tra le più interessanti molecole sviluppate come agenti anticancro, l'indisulam (**8**), un derivato solfonammidico (originariamente chiamato E7070), ha recentemente mostrato di agire come inibitore nell'ordine del nanomolare della CA IX (Tabella 3). [40]



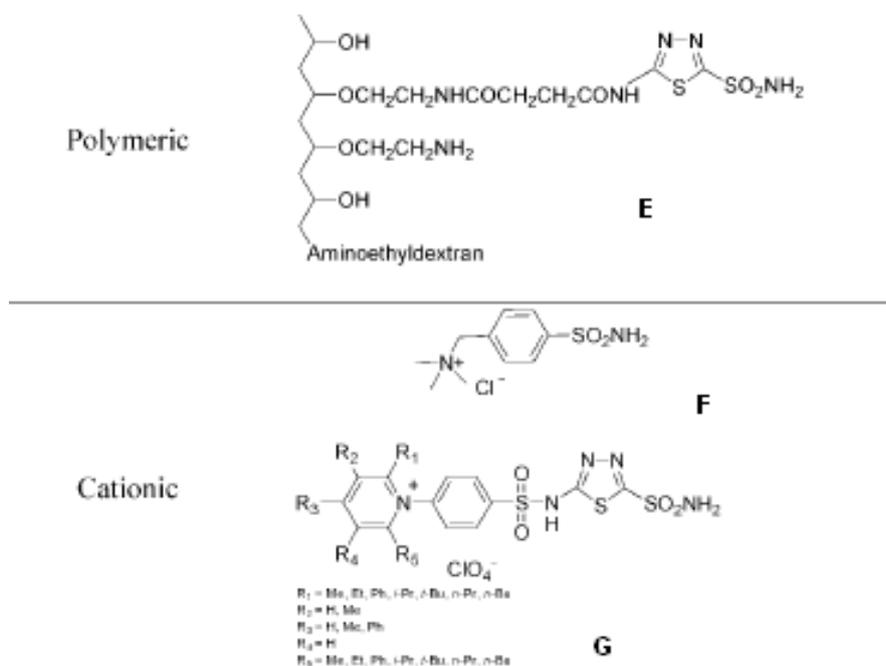
L'indisulam è attualmente in fase II di sperimentazione clinica, il suo dettagliato meccanismo d'azione non è chiaro, ma si sa che è coinvolto nella perturbazione del ciclo cellulare nelle fasi G1 e/o G2, nella sottoregolazione delle cicline, nella riduzione dell'attività della chinasi 2 ciclina dipendente (CDK2), nell'inibizione della fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb), nell'espressione differenziata di molecole che partecipano all'adesione cellulare, nella risposta di segnale e immunitaria, in aggiunta alle sue proprietà inibitorie nei confronti della CA IX. L'indisulam ha mostrato efficacia *in vivo* contro *xenografts* di tumori nei topi nudi, evidenziando un significativo effetto antitumorale e passando alla fase clinica I e II per il trattamento dei tumori solidi. Fra i principali derivati riportati finora, alcuni dei più interessanti potenti inibitori della CA IX sono dei composti studiati da Svastova *et al.* (struttura **17**) [41].

Sfortunatamente, tutti gli inibitori classici della CA non bersagliano selettivamente le CA IX e XII, perciò essi sono anche capaci di inibire altri isoenzimi della CA (ad esempio CA I e CA II) che hanno rilevanza fisiologica.

Perciò negli ultimi anni sono state proposte varie strategie per ottenere composti che bersagliano in modo specifico le isoforme associate ai tumori. Gli isoenzimi CA IX e XII condividono una topologia globale che le distingue dalle CA I e II, fisiologicamente dominanti: gli isoenzimi IX e XII sono proteine transmembrana che orientano il loro dominio catalitico CA

fuori dalla cellula, mentre gli isoenzimi I e II sono proteine solubili localizzate nel citosol. La preparazione delle solfonammidi aromatiche con una minore capacità di diffondere attraverso la membrana lipidica è quindi una possibile strategia per ottenere la specificità nei confronti degli isoenzimi associati al cancro.

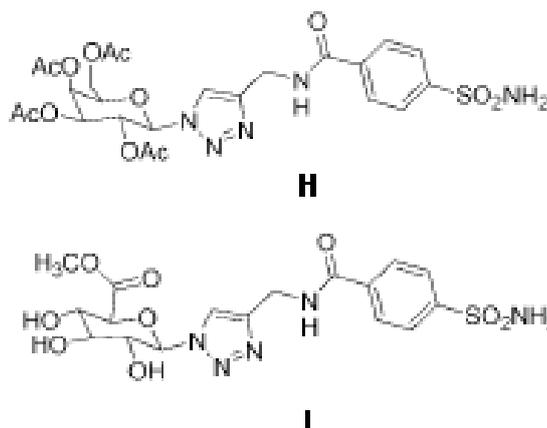
Il primo approccio storico per indurre l'impermeabilità della membrana agli inibitori della CA è stato quello di progettare inibitori polimerici ad alto PM (composto **E**). Tuttavia, gli effetti *in vivo* di questi composti sono stati deludenti a causa dei soliti problemi connessi ai polimeri (reazioni allergiche o problemi di biodisponibilità). Allora è stato iniziato lo sviluppo delle solfonammidi cationiche, ottenute facendo reagire solfonammidi eterocicliche aromatiche contenenti gruppi NH₂ liberi con sali di pirilio, a dare derivati pirimidinici. La solfonammide con la funzione ammonica quaternaria **F** è stata una delle molecole *lead* nella progettazione degli inibitori cationici. I composti derivati dal **G** sono stati correlati con una affinità del basso nanomolare per la CA IX associata ai tumori (KI nell'intervallo di 3-5 nM).



Studi *ex vivo* hanno mostrato che tali composti possono discriminare tra l'isoenzima CA legato alla membrana e quello del citosol. Comunque, *in vivo*, questi composti non erano capaci di attraversare la membrana plasmatica. Quindi, poichè tali composti non inibiscono le CAs intracellulari, possono mostrare minori effetti collaterali confrontandoli con i composti attualmente disponibili (come l'acetazolamide), i quali inibiscono indiscriminatamente tutte le CAs.

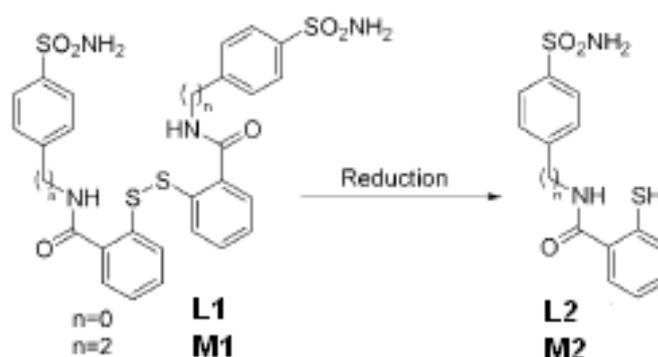
Come è ben noto, i carboidrati non possono diffondere attraverso la membrana, e per questo motivo Wilkinson e colleghi hanno recentemente preparato una serie di solfonammidi benzeniche glucoconiugate attaccando, attraverso “*click-tailing*”, funzioni zuccherine al farmacoforo costituito dalle classiche solfonammidi aromatiche ad alta affinità (Ar-SO₂-NH₂) [42]. Due composti (**H**, **I**) si sono rivelati sia molto attivi che selettivi verso la CA IX. Le code zuccherine hanno mostrato quindi di essere un prezioso approccio per ottenere composti selettivi nei confronti degli isoenzimi della CA.

Glycoconjugate



Poiché l'ipossia costituisce una caratteristica di molti tumori solidi, un'altra strategia per bersagliare gli isoenzimi associati ai tumori è la progettazione di inibitori della CA bioriduttivi, ipossia-attivabili (composti **L** e **M**).

Hypoxia-activatable



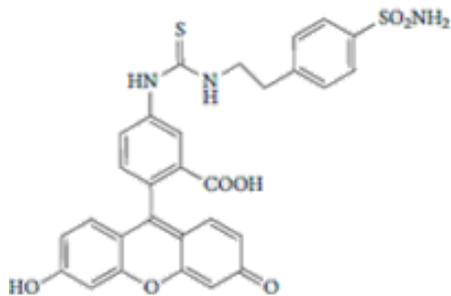
Il razionale è basato sullo sfruttamento delle condizioni di riduzione presenti in tali tumori, dove l'ossigeno è generalmente meno dell'1%, per convertire un profarmaco inattivo in un CAI attivo. Inoltre, questo tipo di riduzione può eventualmente essere mediata dalla proteina riducente tioredoxina-1, che è stata trovata ad alta concentrazione in molti tipi di cancro umani. Così sono stati sintetizzati i derivati disolfurici delle solfonammidi eterocicliche aromatiche da De Simone e colleghi [43]. Inizialmente, tali solfonammidi contenenti disolfuri dovevano essere abbastanza ingombrate e di conseguenza incapaci di legarsi all'interno dello

spazio ristretto del sito attivo della CA, che si adatta normalmente solo ad una porzione della solfonammide eterociclica/benzensolfonammidica. Comunque, la bioriduzione nei tumori ipossici di tali solfonammidi dimeriche dovrebbe generare tioli, che sono molto meno voluminosi e dovrebbero legarsi al sito attivo degli enzimi associati al cancro, trovati nei tumori ipossici.

3.6. INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA NELLA DIAGNOSI DEL CANCRO [34]

Come menzionato precedentemente, le CAs IX e XII sono espresse nelle cellule cancerose e potrebbero essere usate come *marker* per una vasta gamma di tumori solidi ipossici. Diverse solfonammidi fluorescenti sono state così progettate come strumenti interessanti per l'*imaging* e la successiva ricerca dei tumori ipossici. Uno dei più promettenti composti sviluppati fino ad oggi è il derivato **17** (4-sulfamoilfeniletlioureido) fluoresceina, preparato attraverso la reazione della fluoresceina tiocianato (FITC) con una omosulfanilammide aromatica ammino sostituita. E' stato mostrato che il composto **17** lega solo il tessuto tumorale ipossico sovraesprimendo gli isoenzimi associati al cancro, diventando un importante candidato per evidenziare l'*imaging* di questo tipo di cancro. Questo composto presenta una KI verso la CA IX di 24 nM e mostra proprietà di impermeabilità alla membrana valutata attraverso un modello *in vivo* delle membrane delle cellule rosse del sangue. Il composto **26** è stato anche capace di ridurre l'acidificazione extracellulare delle cellule CA IX del rene canino Madin–Darby (MDCK-CA IX) nell'ipossia, ed il loro effetto sul pH extracellulare normossico era trascurabile. Attualmente, è

stato sviluppato negli studi clinici come strumento diagnostico per l'*imaging* dei tumori ipossici.



17

*Introduzione alla
Parte Sperimentale*

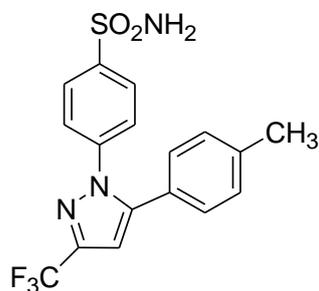
Le anidrasi carboniche (CAs) sono un gruppo di metalloenzimi molto diffusi in tutti gli organismi. Nei mammiferi sono state isolate almeno 15 differenti isoforme dell'anidrasi carbonica α , dove questi zinco-enzimi hanno importanti ruoli fisiologici. Gli isoenzimi CA svolgono varie ed importanti funzioni fisiologiche e fisio-patologiche relative alla respirazione e al trasporto della CO_2 /bicarbonato tra i tessuti metabolizzanti e i polmoni, al pH e all'omeostasi della CO_2 , alla secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti/organi, alle reazioni biosintetiche, come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'ureogenesi (negli animali), alla fissazione della CO_2 (nelle piante e nelle alghe), alla tumorigenicità, alla crescita e virulenza dei vari patogeni, ecc. La presenza di questi enzimi ubiquitari in così tanti tessuti e in così tante isoforme, rappresenta un bersaglio attraente per la progettazione di inibitori con applicazioni biomediche. La loro inibizione è stata sfruttata clinicamente per decenni per varie classi di diuretici e per agenti antiglaucoma che agiscono a livello sistemico.

Negli ultimi anni sono emerse nuove applicazioni degli inibitori delle CA (CAIs), come i farmaci antiglaucoma che agiscono a livello topico, gli anticonvulsivanti, gli antiobesità, gli antipánico, e gli agenti antitumorali/strumenti diagnostici. Di conseguenza sono state descritte numerose nuove classi di CAIs, al fine di modularne le proprietà farmacologiche.

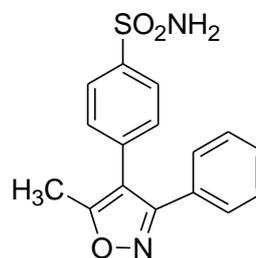
Le CAs vengono inibite principalmente da due classi di composti: gli anioni (tra cui molti carbossilati) e le solfonammidi/sulfamati/sulfammidi, che generalmente si legano allo ione Zn^{2+} del sito attivo dell'enzima.

In tale settore, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia tesi ha recentemente descritto i nuovi derivati triciclici **1**, contenenti lo *scaffold* benzotipiranopirazolico e piridotipiranopirazolico sul quale è stata inserita una funzione benzensolfonammidica [44]. Questi composti erano stati progettati quali analoghi rigidi di celecoxib e valdecoxib che, nati

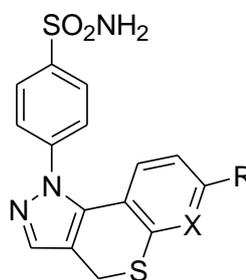
come inibitori selettivi della COX2, hanno mostrato di essere anche potenti inibitori delle CAs.



CLX

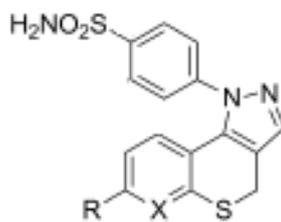


VLX



1 R = H, CH₃, OCH₃ X = CH, N

I composti **1a-e**, così come i composti di riferimento **CLX** e **VLX**, sono stati saggiati quali inibitori catalitici delle isoforme hCA I-XIV (Tabella 1) presso il laboratorio del dottor Supuran dell'Università di Firenze.



1 a-e

- 1 a:** X = CH R = OCH₃
- 1 b:** X = CH R = Cl
- 1 c:** X = CH R = CF₃
- 1 d:** X = N R = H
- 1 e:** X = N R = CH₃

enzyme	K_i (nM) ^a						
	1a	1b	1c	1d	1e	CLX	VLX
hCA I	65	212	318	193	155	50000	54000
hCA II	16	29	210	72	49	21	43
hCA III	22700	32000	28600	6400	7900	7400	78000
hCA IV	8850	7200	7140	328	7500	880	1340
hCA VA	923	440	327	476	992	794	912
hCA VB	1072	3140	3250	3180	3270	93	88
hCA VI	7116	9280	9340	8055	8140	94	572
hCA VII	609	602	628	873	912	2170	3900
hCA IX	2182	1845	2570	2340	3250	16	27
hCA XII	4550	5620	6755	5540	5870	18	13
hCA XIII	938	2810	714	4300	4630	98	425
hCA XIV	931	797	548	715	844	689	107

Tabella 1. Dati di inibizione dei composti **1a-e** e dei composti di riferimento **CLX** e **VLX** nei confronti delle isoforme hCA I-XIV.

La caratteristica principale dei derivati pirazolici **1a-e** è risultata la predominante elevata inibizione dell'anidrasi carbonica umana (hAC) I e II, mentre la loro attività inibitoria verso hCA III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, e XIV è risultata di due ordini di grandezza più bassa.

Studi di cristallografia a raggi X e di sovrapposizione hanno permesso di spiegare lo specifico profilo di inibizione delle pirazolo-solfonammidi, che è risultato piuttosto differente da quello dei composti di riferimento **CLX** e **VLX**.

In particolare, per studiare il tipo di inibizione di questi composti sono stati condotti studi di cristallografia a raggi X del composto **1e** complessato con l'enzima hCA II (Figura 1).

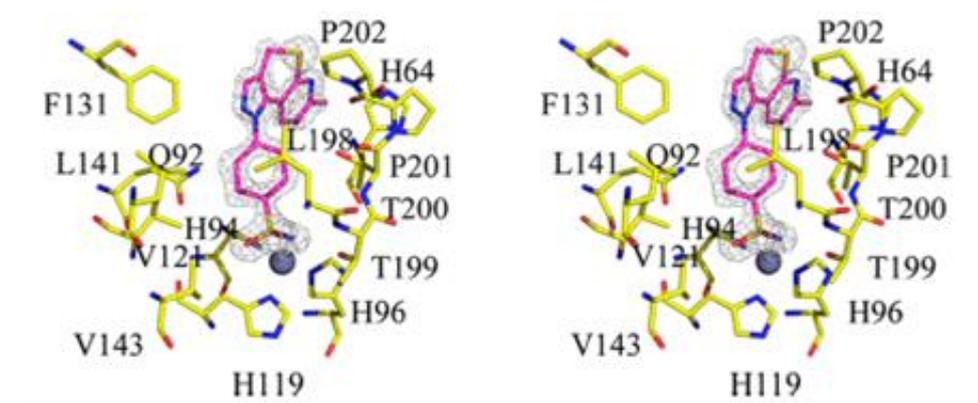


Figura 1. Studio di cristallografia a raggi X in cui il composto **1e** è stato complessato con l'enzima hCAII.

Il composto **1e** si inserisce profondamente nel sito attivo dell'enzima, spiazza il solvente legato allo zinco catalitico, per cui l'azoto del gruppo solfonammidico si lega direttamente allo ione Zn. L'azoto e l'ossigeno della solfonammide sono infatti alla giusta distanza per formare legami a idrogeno con la treonina 199 (Figura 1).

L'atomo di zolfo distorce l'anello del composto ma non è direttamente coinvolto nell'interazione con l'enzima. Gli anelli idrofobici del sistema eterociclico si protendono all'esterno e sono stabilizzati principalmente da residui idrofobici che delimitano la cavità del sito attivo mediante interazioni di Van der Waals con le catene laterali di valina 121, fenilalanina 131, leucina 198, prolina 202 ed istidina 64.

In Figura 2 è riportata la sovrapposizione della struttura hCA II-**1e** (Fig. 2A) che è stata effettuata parallelamente con **VLX** (Fig. 2B) e **CLX** (Fig. 2C), sempre in complesso con hCA II.

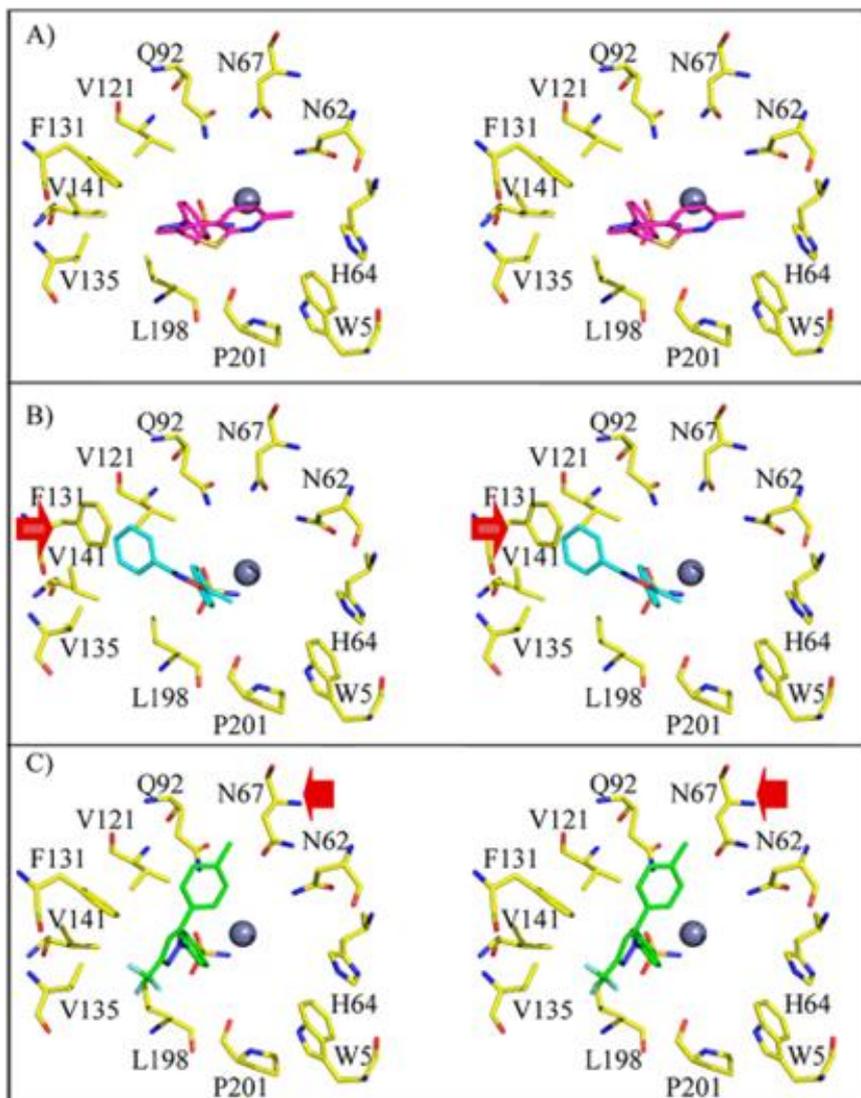
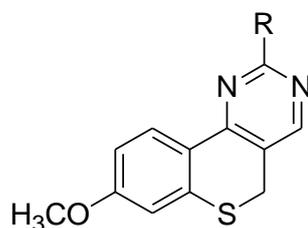


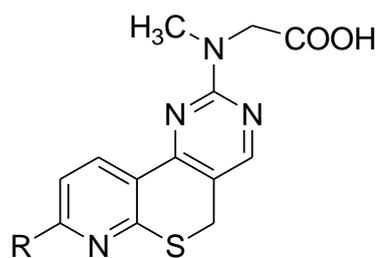
Figura 2. Sovrapposizione della struttura hCA II-1e (Fig. 2A) effettuata parallelamente con VLX (Fig. 2B) e CLX (Fig. 2C) in complesso con hCA II.

L'aspetto più interessante di questa comparazione ha rivelato che tutti i tre composti si sono legati allo zinco del sito attivo e che i loro gruppi terminali hanno la capacità di occupare zone diverse sulla superficie del sito attivo. I risultati hanno quindi indicato che le benzensolfonammidi **1a-e** costituiscono una classe di CAIs altamente interessante, grazie alla loro specificità nei confronti di un numero ristretto di CA isoforme.

In un recente lavoro di tesi sono stati sintetizzati gli omologhi superiori dei derivati pirazolici appena descritti ad ottenere derivati tricyclici di tipo benzotiopirano[4,3-d]pirimidinico e piridotiopirano[4,3-d]pirimidinico sul cui *scaffold* è stata inserita la funzione amminoacidica (quindi carbossilata, composti delle serie **2** e **3**) per verificare se tale sostituzione potesse comunque mantenere la selettività dei composti ottenuti verso specifiche isoforme di anidraasi carbonica.



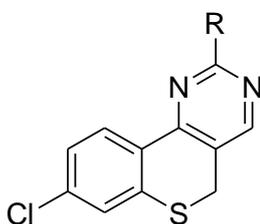
R



R

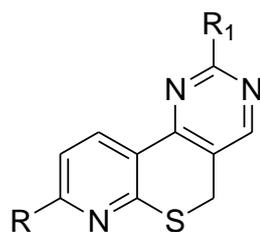


Lo scopo della mia tesi è stato quello di modificare la struttura della serie di composti **2** e **3** in modo da avere a disposizione una gamma più completa di relazioni struttura-attività. Infatti è stata progettata la sostituzione del gruppo metossilico con un atomo di cloro sul sistema benzotiopirano[4,3-d]pirimidinico e l'introduzione di altre catene amminoacidiche sul sistema piridotiopirano[4,3-d]pirimidinico, per ottenere, rispettivamente, i derivati **4a-c** e **5a-b**.



R

- 4a** $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{COOH}$
4b NHCH_2COOH
4c $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$



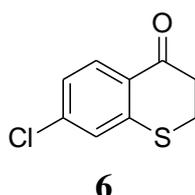
R

R₁

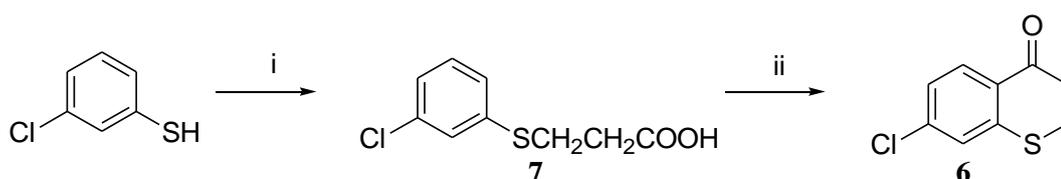
- 5a** H NHCH_2COOH
5b CH_3 NHCH_2COOH

Sintesi delle benzotiofiranopirimidine 2-aril sostituite

La procedura di sintesi impiegata nella preparazione dei composti **4a-c** ha coinvolto, come primo passaggio, la preparazione del composto 7-cloro-2,3-diidro-1-benzotiofiran-4(4*H*)-one **6** già descritto [45] ottenuto con una procedura sintetica illustrata nello schema 1.



Schema 1



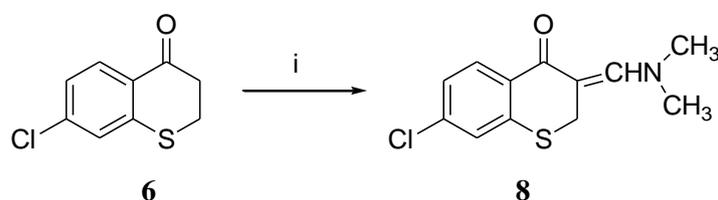
Reagenti e condizioni: i: acido 3-bromopropionico in NaHCO_3 soluzione acquosa e KOH 10% 100°C , 4h, ii: H_2SO_4 75°C , 2h.

Un eccesso di acido 3-bromopropionico in una soluzione satura di bicarbonato di sodio è stato aggiunto ad una soluzione di 3-clorotiofenolo in una soluzione acquosa al 10% di idrossido di potassio. La miscela di reazione è stata sottoposta ad agitazione a 100°C per 4 ore, raffreddata ed acidificata con acido cloridrico concentrato fino a pH 3. Il solido precipitato è stato raccolto tramite filtrazione e lavato con acqua per ottenere il corrispondente acido tiopropionico **7** puro, con una buona resa, questo, per trattamento con acido solforico, ha dato il 2,3-diidro-1-benzotiofiran-4(4*H*)-one **6** grezzo, che è stato purificato mediante cristallizzazione da etere di petrolio $30^\circ\text{-}60^\circ$ (Schema 1).

Generalmente, la procedura di sintesi che porta al sistema pirimidinico sfrutta la reattività 1,3-bielettrofila di intermedi 3-dimetilamminometilenici [46-48] nella reazione con amidine binucleofile o con le guanidine appropriate in ambiente basico [49].

L'intermedio chiave per la sintesi del sistema benzotiopirano pirimidinico è quindi il derivato **8** che è stato ottenuto con buone rese a partire dal tiopiranone **6**, per reazione con un eccesso di dimetilformammide dimetilacetale (DMF DMA) in toluene a riflusso (Schema 2) [50].

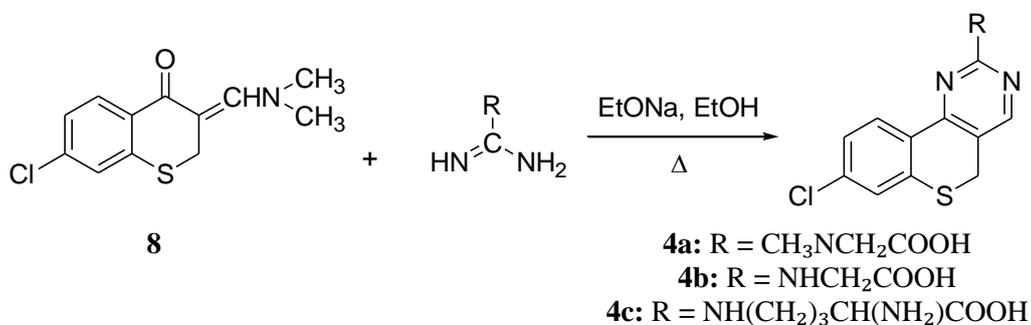
Schema 2



Reagent e condizioni: i: DMF-DMA a riflusso in toluene.

I derivati **4a-c** sono stati ottenuti a partire dall'intermedio elettrofilo dimetilamminometilenico **8**, per reazione con i derivati binucleofili creatina, acido guanidin acetico e arginina, scelti per ottenere composti con caratteristiche di differente polarità (Schema 3).

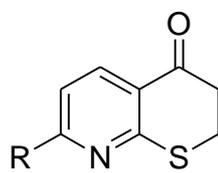
Schema 3



La miscela di reazione, in soluzione etanolica e in presenza di etossido di sodio, è fatta rifluire per un tempo opportuno, da 8 a 24 ore, controllandone l'andamento mediante TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 7:3$ o Benzina 60-80°/AcOEt = 9:1); dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata concentrata a circa metà volume, trattata con acqua (10 ml) e acidificata (pH=3-4) con HCl 1M. Il precipitato solido è stato raccolto, lavato con acqua, purificato mediante ricristallizzazione e caratterizzato mediante dati analitici e spettroscopici (Tabelle I e II).

Sintesi delle piridotiopirano-pirimidine 2-aril sostituite

Analogamente, la via sintetica utilizzata nella preparazione dei composti **5a-b** ha coinvolto, come primo *step*, la preparazione dei già descritti 2,3-diidrotiopiran[2,3-b]piridin-4(4*H*)-one **9a** [51] e **9b** [52].



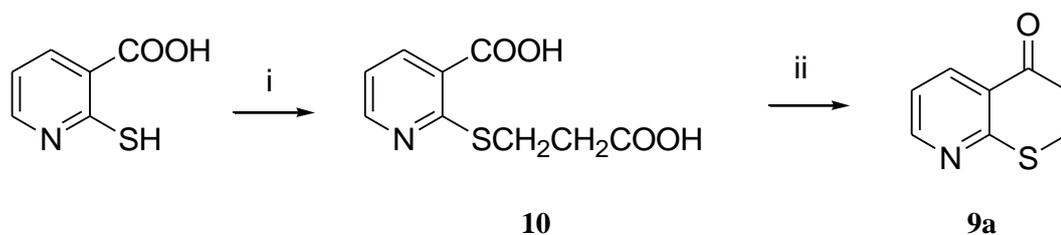
9a: R = H

9b: R = CH₃

La reazione dell'acido 2-mercaptopiridin-3-carbossilico con l'acido 3-bromopropionico in soluzione acquosa di idrossido di potassio ha dato l'acido 3-(3-carbossi-2-piridiltio)propionico **10** con resa quantitativa, questo, per trattamento con acetato di sodio anidro in anidride acetica a 160°C, ha portato al composto grezzo desiderato **9a** (Schema 4), la cui purificazione è stata effettuata tramite filtrazione su colonna cromatografica

in gel di silice (60/0.040-0.063 mm), utilizzando come miscela eluente etere di petrolio 60°-80°/acetato di etile = 7:3.

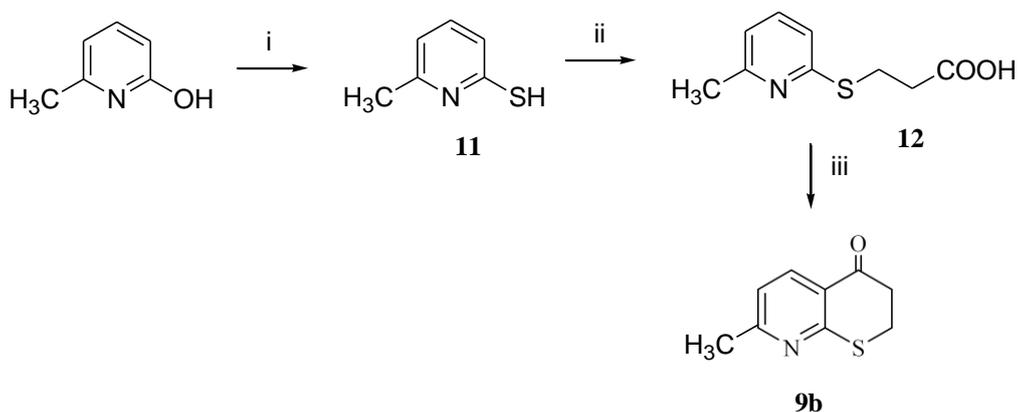
Schema 4



Reagenti e condizioni: i: acido 3-bromopropionico in NaHCO_3 aq. e NaOH 10%, 60°C, 4h; ii: $\text{AcONa}/\text{Ac}_2\text{O}$, 160°C, 2h.

La sintesi del piridotiopiranone 7-metil sostituito **9b** è stata effettuata secondo una procedura già descritta [52] e riportata nello Schema 5.

Schema 5

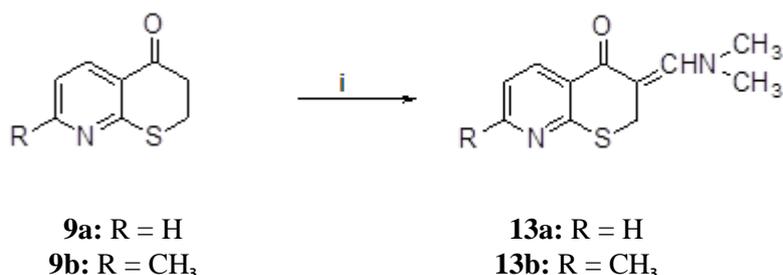


Reagenti e condizioni: i: P_2S_5 , 150°C, 4 h; ii: acido 3-bromopropionico in NaHCO_3 aq. e NaOH 10%, t.a., 4 giorni; iii: PPA , 170°C, 3 h.

La 2-idrossi-6-metilpiridina viene miscelata in mortaio con una quantità equivalente di P_2S_5 , quindi si scalda la miscela a $150^\circ C$ per ottenere la 2-mercapto-6-metilpiridina **11**. Questa viene solubilizzata in KOH 10% ed addizionata di una quantità equimolare di acido 3-bromopropionico in $NaHCO_3$ acquoso. La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 4 giorni a formare l'acido **12**, che viene poi ciclizzato con PPA per ottenere il tiopirano desiderato **9b**.

La preparazione dei derivati intermedi 3-dimetilamminometilenici **13a-b** [49] è stata effettuata, con buone rese, a partire dai tiopiranoni **9a-b** [51,52], per reazione con un eccesso di dimetilformammide dimetilacetale a refluxo in toluene (Schema 6).

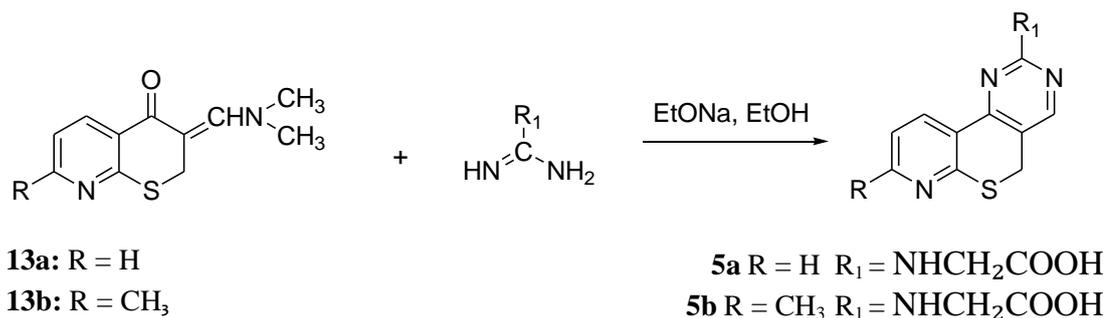
Schema 6



Reagenti e condizioni: i: DMF-DMA a refluxo in toluene.

In maniera analoga i composti piridotiopiranopirimidinici **5a-b** sono stati ottenuti facendo reagire i derivati **13a-b** con acido guanidin acetico, in soluzione etanolica a refluxo in presenza di etossido di sodio (Schema 7).

Schema 7

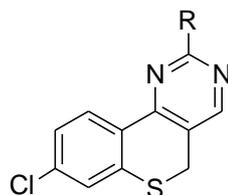


L'acido guanidin acetico è stato aggiunto, a temperatura ambiente, in corrente di azoto, ad una soluzione di etossido di sodio in etanolo. La sospensione risultante è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti, successivamente è stato addizionato l'opportuno derivato dimetilamminometilenico **13a-b** e la miscela di reazione è stata fatta rifluire per 4 ore. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata concentrata a circa metà volume, trattata con acqua (10 ml) e acidificata (pH=3-4) con HCl 1M. Il precipitato solido è stato raccolto, lavato con acqua, purificato mediante ricristallizzazione e caratterizzato mediante dati analitici e spettroscopici (Tabella III-IV).

L'attività biologica dei nuovi composti pirimidinici sintetizzati sarà valutata grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca del dott Supuran presso l'Università di Firenze.

Tabella I

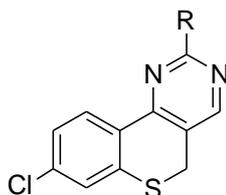
Caratteristiche chimico-fisiche dei derivati 8-cloro-5H-benzotiopirano [4,3-d]pirimidinici **4a-c**



N	R	Resa (%)	P.f. (°C) (solv. crist.)	Formula
4a	CH ₃ NCH ₂ COOH	47	185° (Etanolo)	C ₁₄ H ₁₂ N ₃ O ₂ ClS
4b	NHCH ₂ COOH	75.72	165°-170° (Etanolo)	C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₂ ClS
4c	NH(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOH	61.73	175°-180° (Etanolo)	C ₁₆ H ₁₇ N ₄ O ₂ ClS

Tabella II

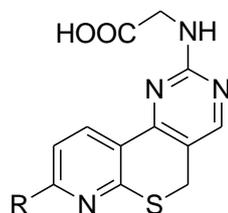
Caratteristiche spettroscopiche dei derivati 8-cloro-5H-benzotiopirano [4,3-d]pirimidinici **4a-c**



N	R	¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , ppm)
4a	CH ₃ NCH ₂ COOH	3.496 (bs, 2H, NHCH ₂); 3.905 (s, 2H, CH ₂ S); 6.208 (t, 1H, NH scamb.); 6.866-6.903 (m, 2H, ArH); 8.167 (s, 1H, ArH); 8.188 (d, 1H, ArH)
4b	NHCH ₂ COOH	3.200 (s, 3H, NCH ₃); 3.951 (s, 2H, CH ₂ S); 4.309 (s, 2H, NCH ₂); 6.874-6.954 (m, 2H, ArH); 8.160 (d, 1H, ArH); 8.277 (s, 1H, ArH); 12.568 (s, 1H, COOH, scamb.)
4c	NH(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOH	1.64 (m, 4H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂); 3.93 (s, 2H, CH ₂ S); 7.32-7.37 (m, 2H, ArH); 7.49 (s 1H, NH scamb.); 8.00-8.24 (m, 1H, NH scamb, 2H, Ar-H);

Tabella III

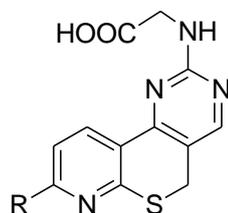
Caratteristiche chimico-fisiche dei derivati piridotiopirano [4,3-d]pirimidinici **5a-b**



N	R	Resa (%)	P.f. (°C) (solv. crist.)	Formula
5a	H	11.5	>200° (Etanolo)	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
5b	CH ₃	n.d.	n.d.	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂ S

Tabella IV

Caratteristiche spettroscopiche dei derivati piridotiopirano [4,3-d]pirimidinici **5a-b**



N	R	¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm)
5a	H	3.96 (d, 2H, NHCH ₂); 4.11 (s, 2H, CH ₂ S); 7.33 (t, 1H, NH scamb.); 7.52-7.56 (m, 2H, ArH); 8.33 (s, 1H, ArH); 8.42-8.46 (m, 1H, ArH); 12.45 (s, 1H, COOH scamb.)
5b	CH ₃	n.d.

Parte Sperimentale

Materiali e metodi

Se non diversamente specificato tutti i solventi ed i reagenti utilizzati per la sintesi sono stati acquistati dalle ditte fornitrici e sono stati usati senza ulteriore purificazione.

Come agente essiccante è stato utilizzato il solfato di magnesio.

L'evaporazione dei solventi è stata eseguita sotto vuoto utilizzando l'evaporatore rotante.

Le rese (%) sono riferite a composti cromatograficamente e spettroscopicamente ($^1\text{H-NMR}$) omogenei.

Le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (T.L.C.) realizzate su foglio di alluminio ricoperte di silice (MERK 60 F-254, spessore 0.2 mm). Per le colonne cromatografiche è stata usata il gel di silice 60 (230-400 mesh).

Gli spettri di risonanza magnetica del protone ($^1\text{H-NMR}$) sono stati eseguiti in soluzione di dimetilsolfossido esa-deuterato (DMSO- d_6) con uno spettrometro Varian Gemini-200 (200-MHz) utilizzando $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS) come standard interno.

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio di Reichert Köfler e non sono stati corretti.

Acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico 7 [45]

3.3 ml (0.0285 moli) di 3-clorotiofenolo vengono solubilizzati in 12 ml di una soluzione di KOH 10% e 4.580 g (0.0365 moli) di acido 3-bromopropionico vengono solubilizzati in una soluzione ottenuta sciogliendo 3.1 g (0.0365 moli) di NaHCO₃ in 28 ml di H₂O. Le due soluzioni vengono riunite e la miscela così ottenuta è lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e quindi a riflusso per 4 ore. Si ottiene una soluzione che viene acidificata con HCl conc. fino a pH = 3. Il solido bianco che precipita viene raccolto per filtrazione ottenendo 5.66 g di prodotto **7** (resa: 92%). P. f.: 75-80°C

7-Cloro-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4H)-one 6 [45]

A 5.66 g (0.0262 moli) di prodotto **7** vengono addizionati 45 ml di acido solforico conc., la miscela di reazione viene tenuta in agitazione magnetica a temperatura ambiente. Dopo alcune ore la miscela ottenuta è trattata con ghiaccio ed il solido che precipita viene raccolto per filtrazione, ottenendo il composto desiderato **6** che viene purificato mediante cristallizzazione con etere di petrolio 30°-60°. G 3.679 di prodotto puro (resa: 70.74 %). P. f.: 60-62°C

3-dimetilamminometilen-2,3-diidro--1-benzotiopiran-4(4H)-one 8

3.2 ml (0.024 moli) di dimetilformammide dimetilacetale (DMF DMA) vengono addizionati ad una soluzione, in agitazione, di 2.0 g (0.01 moli) di benzotiopiranone **6** in 10 ml di toluene; la miscela risultante viene fatta rifluire per 12 ore controllando l'andamento della reazione mediante TLC (Benzina 60o-80o/AcOEt = 9:1).

Per raffreddamento si ottiene una soluzione che viene portata a secco a pressione ridotta ed il residuo viene ripreso con Et₂O, fatto seccare e filtrato, ottenendo il prodotto desiderato **8** (resa quantitativa).

P.f. 105-110°C

Acido 3-(3-carbossi-2-piridiltio)propionico 10 [51]

11.83 g (77.3 mmoli) di acido 3-bromopropionico in 100 ml d'acqua e 6.5 g (72.0 mmoli) di sodio idrogeno carbonato sono stati aggiunti ad una soluzione di 10 g (64.5 mmoli) di acido 2-mercaptopiridin-3-carbossilico in 62 ml di soluzione acquosa di idrossido di sodio al 10%. La miscela di reazione è lasciata in agitazione per 4 ore a 60°C, raffreddata e acidificata con acido cloridrico fino a pH=2. Il solido precipitato è stato raccolto e lavato con acqua a dare 14.64 g (100% di resa) di prodotto **10** puro. P.f. 205-208°C (dec) (etil acetato)

2,3-Diidrotiopirano[2,3-b]piridin-4(4H)-one **9a** [51]

Una soluzione di acido 3-(3-carbossi-2-piridiltio)propionico **10** (10.0 g, 44.1 mmoli) ed acetato di sodio anidro (6.728 g, 80.1 mmoli) in 90 ml di anidride acetica è stata fatta rifluire a 160°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita con acqua, alcalinizzata con una soluzione di NH₄OH al 30% fino a pH=8-9. La sospensione ottenuta è filtrata per eliminare il materiale scuro, successivamente è stata estratta con acetato di etile. Gli estratti combinati sono stati lavati con acqua, essiccati e portati a secco a dare il composto **9a** grezzo con aspetto di un olio arancione. La purificazione è stata effettuata mediante filtrazione su colonna cromatografica di gel di silice (60/0.040-0.063 mm), usando come miscela eluente etere di petrolio 60°-80°/ acetato di etile = 7:3. Il prodotto recuperato dalle frazioni meno mobili (TLC) ha dato 1.5 g (21% di resa) di **9a** puro. P.f. 66-67°C (etere di petrolio 60°-80°)

2-mercapto-6-metilpiridina **11** [52]

7.70 g (0.07 moli) di 2-idrossi-6-metilpiridina vengono miscelati in mortaio con 7.70 g di P₂S₅. La miscela, introdotta in un pallone collegato ad un agitatore meccanico, è riscaldata a 150°C per 4 ore. Quindi si solubilizza con acqua bollente e si porta a pH=6-7 con Na₂CO₃. Si ottengono 4.420 g di prodotto **11** che viene lavato con acqua (resa: 77.20%).

P.f. 154-156°C cristallizzato da toluene.

Acido-S-(6-metilpiridin-2-il)-tiopropanoico **12** [52]

Ad una soluzione di 7.65 g (0.05 moli) di acido 3-bromopropionico e 4.2 g (0.05 moli) di NaHCO₃ in 30 ml di acqua viene aggiunta una soluzione di 5.0 g (0.04 moli) di 2-mercapto-6-metilpiridina **11** in 30 ml di KOH acquoso al 10%. La miscela di reazione viene posta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 4 giorni. Si ottiene una soluzione che viene acidificata con HCl conc. fino a pH=4 ed estratta con CHCl₃. La soluzione cloroformica è seccata su MgSO₄ ed evaporata a secchezza. Si ottiene un olio che viene fatto solidificare in freezer dando 5.00 g di prodotto desiderato **12** (resa: 63%).

7-metil-2,3-diidro-tiopirano[2,3-b]piridin-4(4H)-one **9b** [52]

Una miscela di 1.00 g (0.05 moli) di acido-S-(6-metilpiridin-2-il)-tiopropanoico **12** e 10.0 g di acido polifosforico è scaldata a 170°C per 3 ore sotto agitazione meccanica. Dopo raffreddamento la miscela di reazione è decomposta con ghiaccio e acqua ed alcalinizzata fino a pH=8 con NH₄OH conc. La soluzione viene estratta con CHCl₃ e la fase cloroformica, seccata su MgSO₄, evaporata a pressione ridotta ottenendo 0.947 g di un residuo oleoso rosso scuro, che viene solubilizzato in toluene e purificato su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente etere di petrolio 60°-80°/acetato di etile = 3:2. Si ottengono 0.23 g di prodotto desiderato **9b** (resa: 24.6%).

P.f. 90-92°C cristallizzato da etere di petrolio.

2,3-Diidro-3-dimetilamminometilentiopirano[2,3-b]piridin-4(4H)-one 13a [49] e 7-metil-2,3-Diidro-3-dimetilamminometilentiopirano[2,3-b]piridin-4(4H)-one 13b [49]

Un eccesso di dimetilformammide dimetilacetale (1 ml, 7.5 mmoli) è stato aggiunto ad una soluzione, in agitazione, di 3.03 mmoli dell'opportuno tiopirano **9a-b** in 5 ml di toluene e la miscela è stata fatta rifluire per 16 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione ottenuta è stata evaporata a pressione ridotta, fornendo un residuo che è stato trattato con etere etilico, raccolto e purificato per mezzo di cristallizzazione da toluene-etere di petrolio 60-80°C a dare i rispettivi metilen derivati **13a-b**.

13a P.f. 100-101°C

13b P.f. 140-141°C

Procedura generale per la sintesi dei derivati 8-cloro-5H-benzotiopirano [4,3-d]pirimidinici 4a-c

L'opportuno reattivo: acido guanidinacetico, creatina monoidrato o arginina cloridrato (1.60 mmoli) è stato aggiunto, a temperatura ambiente, in corrente di azoto, ad una soluzione di etossido di sodio (0.092 g, 4.0 mmoli di sodio in 8 ml di etanolo anidro). La sospensione risultante è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti, successivamente è stato addizionato il 3-dimetilamminometilen-7-cloro-2,3-diidrobzotiopiran-4(4H)-one **8** (0.200 g, 0.8 mmoli) e la miscela di reazione è stata fatta rifluire per 8-24 ore (analisi TLC). Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata concentrata a circa metà volume, trattata con acqua (10 ml) e acidificata (pH 3-4) con HCl 1 M. Il

precipitato solido è stato raccolto, lavato con acqua e purificato mediante cristallizzazione da etanolo (Tabelle I-II).

Procedura generale per la sintesi dei derivati piridotiopirano pirimidinici 5a-b

L'acido guanidin acetico (0.210 g, 1.4 mmoli) è stato aggiunto, a temperatura ambiente, in corrente di azoto, ad una soluzione di etossido di sodio in etanolo (0.034 g, 1.50 mmoli di sodio in 3 ml di etanolo anidro). La sospensione risultante è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 15 minuti, successivamente è stato addizionato l'opportuno derivato dimetilamminometilenico **13a-b** (0.95 mmoli) e la miscela di reazione è stata fatta rifluire per 4 ore. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata concentrata a circa metà volume, trattata con acqua (10 ml) e acidificata (pH 3-4) con HCl 1 M. Il precipitato solido è stato raccolto, lavato con acqua e purificato mediante ricristallizzazione (Tabelle III-IV).

Bibliografia

- [1] Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets, An Overview Current Topics in *Medicinal Chemistry*, **2007**, 7, 825-833.
- [2] Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23, 146–189.
- [3] Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hanninen, M.; Hamalainen, J. M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, **2005**, 392, 83-92.
- [4] Guerri, A.; Briganti, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Mangani, S. Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction. *Biochemistry*, **2000**, 39, 12391-12397.
- [5] Whittington, D. A.; Grubb, J. H.; Waheed, A.; Shah, G. N.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 7223-7228.
- [6] Supuran C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2008**, 7, 168-181.
- [7] (a) Clare, B. W.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. Part 3. Structure-activity correlations for a series of isozyme II activators. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 768-773; (b) Temperini, C.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II: stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3019-3027.

[8] (a) Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10384-10392; (b) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Puccetti, L.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with L-histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 5136-5141; (c) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isozymes I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-histidine and crystallographic analysis of their adducts with isoform II: engineering proton-transfer processes within the active site of an enzyme. *Chemistry*, **2006**, 12, 7057-7066; (d) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators: L-Adrenaline plugs the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 628-635; (e) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: kinetic and X-ray crystallographic study for the interaction of D- and L-tryptophan with the mammalian isoforms I-XIV. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 8373-8378.

[9] Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with istamine. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10384-10392.

[10] Stams, T.; Christianson, D. W. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. In *The Carbonic Anhydrases—New Horizons*; Chegwiddden, W. R., Edwards, Y., Carter, N., Eds.; Birkhäuser Verlag, Basel, **2000**; 159–174.

[11] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.; *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators*; CRC Press: Boca Raton (FL), USA, **2004**; 1–363.

- [12] Thiry, A. *et al.* Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2006**, 27, 566–573.
- [13] Nishimori, I. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 381–388.
- [14] Vullo, D., *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1005–1009.
- [15] Lehtonen, J. *et al.* Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 2719–2727.
- [16] Saczewski, F. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic human isozymes I and II, and the transmembrane, tumor-associated isozymes IX and XII with substituted aromatic sulfonamides activatable in hypoxic tumors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 4846–4851.
- [17] (a) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets—General Presentation. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009**; 15–38; (b) Winum, J. Y.; Rami, M.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran C., Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med. Res. Rev.*, **2008**, 28, 445-463; (c) Domsic, J. F.; Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R., Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 30766-30771.
- [18] (a) Supuran C. T., Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 641-648; (b)

Supuran, C. T.; Di Fiore, A.; De Simone G., Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2008**, 13, 383-392; (c) De Simone, G.; Di Fiore, A.; Supuran C. T., Are carbonic anydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs?. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 655–660; (d) Mincione, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Antiglaucoma Carbonic Anhydrase Inhibitors as Ophthalmologic Drugs. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009**; 139–154; (e) Krungkrai, J.; Supuran C. T., The alpha-carbonic anhydrase from the malaria parasite and its inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 631-640.

[19] Köhler, K. *et al.* Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007**, 46, 7697–7699.

[20] Mincione, F. *et al.* The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, 7, 849–854.

[21] Sugrue, M. F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Retin. Eye Res.*, **2000**, 19, 87–112.

[22] Scozzafava, A. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2641–2650.

[23] Temperini, C.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of the antiepileptic drug sulthiame with twelve mammalian isoforms: kinetic and X-ray crystallographic studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4866-4872.

[24] Steele, R. M.; Batugo, M. R.; Benedini, F.; Biondi, S.; Borghi, V.; Carzaniga, L.; Impagnietello, F.; Miglietta, D.; Chong, W. K. M.; Rajapakse, R.; Cecchi, A.; Temperini, C.; Supuran C. T., Nitric oxide-donating carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of open-angle glaucoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6565-6570.

[25] Gao, B. B. *et al.* Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Med.*, **2007**, 13, 181–188.

[26] Maren, T. H. The development of topical carbonic anhydrase inhibitors. *J. Glaucoma*, **1995**, 4, 49–62.

[27] Innocenti, A. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membrane-bound human and bovine isozymes IV with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 1149–1154.

[28] Liao, S. Y. *et al.* Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CA XII) in glaucoma. *J. Med. Genet.*, **2003**, 40, 257–261.

[29] Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2003**, 13, 1545–1550.

[30] Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 841-845.

[31] Picard, F. *et al.* Topiramate reduces energy and fat gains in lean (*Fa/?*) and obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Obesity Res.*, **2000**, 8, 656–663.

[32] Gadde, K. M. *et al.* Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial. *JAMA*, **2003**, 289, 1820–1825.

[33]. Ahlskog, J. K.; Schliemann, C.; Mårilind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R. B.; Neri, D. Br., Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *J. Cancer* **2009**, 101, 645-657.

[34] Thiry, A.; Supuran, C.T.; Masereel, B.; Dogné, J.M., Recent developments of carbonic anidrase inhibitors as potential anticancer drugs. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3051-3056.

[35] Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Let.*, **2007**, 581, 3582–3591.

[36] Thiry, A. *et al.* Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2006**, 27, 566–573.

[37] Nishimori, I. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 381–388.

[38] Vullo, D., *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1005–1009.

[39] Teicher, B. A.; Liu, S. D.; Liu, J. T.; Holden, S. A.; Herman, T. S. A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Res.* **1993**, 13, 1549–1556.

[40] Abbate, F. *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and

transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 217–223.

[41] Svastova, E. *et al.* Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.*, **2004**, 577, 439–445.

[42] Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A., A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by “clicktailing”. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6539–6548.

[43] De Simone, G.; Vitale, R. M.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5544–5551.

[44] Marini, A.M.; Maresca, A.; Aggarwal, M.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; Simorini, F.; La Motta, C.; Taliani, S.; Nuti, E.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Rossello, A.; Supuran C.T., Tricyclic Sulfonamides Incorporate Benzothiopyrano[4,3-c]pyrazole and Pyridothiopyrano[4,3-c]pyrazole Effectively Inhibit α - and β -Carbonic Anhydrase: X-ray Crystallography and Solution Investigations on 15 Isoforms. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 9619–9629.

[45] Degani, I.; Fochi, R.; Spunta, G. Heteroaromatic cations. VI. Synthesis Of Thiachromylium Perchlorate Derivatives, *Bollettino Scientifico Della Facolta Di Chimica Industriale Di Bologna*, **1966**, 24, 75-91.

[46] Eiden, F.; Schmiz, E. Studies On Pyrones And Pyridones. 76. Dihydrobenzothiopyrano[4,3-b][1,5]Benzodiazepin-7-Ones And Benzodiazepinium Salts, *Archiv Der Pharmazie*, **1978**, 311, 867-873.

[47] Marini, A.M.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; La Motta, C.; Simorini, F.; Taliani, S.; Bertini, D.; Gia, O.; Dalla Via, L., Synthesis and in vitro antiproliferative activity of new substituted benzo[3',2':5,6] thiopyrano[4,3-d]pyrimidines, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2008**, 45, 745-749.

[48] Chu, S-L, Chyan, W-H, Chang, C-C. Inst. Of Med. Sci., Shangai, The preparation of the derivatives of 3-dialkylaminomethylthio chroman-4-ones, *Huaxue Xuebao*, 1956, 22, 371-378. [46] Bruno, O.; Schenone, S.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Filippelli, W.; Falcone, G.; Motola, G.; Mazzeo, F. Antiinflammatory agents: new series of N-substituted amino acids with complex pyrimidine structures endowed with antiphlogistic activity, *Farmaco*, **1999**, 54, 95-100.

[49] Primofiore, G.; Marini, A.M.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; Bertini, D.; Dalla Via, L.; Marciani Magno, S. *J. Heterocyclic Chem*, **2003**, 40, 783-788.

[50] Bruno, O.; Schenone, S.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Filippelli, W.; Falcone, G.; Motola, G.; Mazzeo, F. Antiinflammatory agents: new series of N-substituted amino acids with complex pyrimidine structures endowed with antiphlogistic activity, *Farmaco*, **1999**, 54, 95-100.

[51] Da Settimo, A.; Marini, A.M.; Primofiore, G.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; La Motta, C.; Pardi, G.; Ferrarini, P.L.; Mori, C. *J. Heterocyclic Chem*, **2000**, 37, 379-382.

[52] Ferrarini, P.L.; Mori, C.; Badawneh, M.; Calderone, V.; Greco, R.; Manera, C.; Martinelli, A.; Nieri, P.; Saccomanni, G. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 815.

