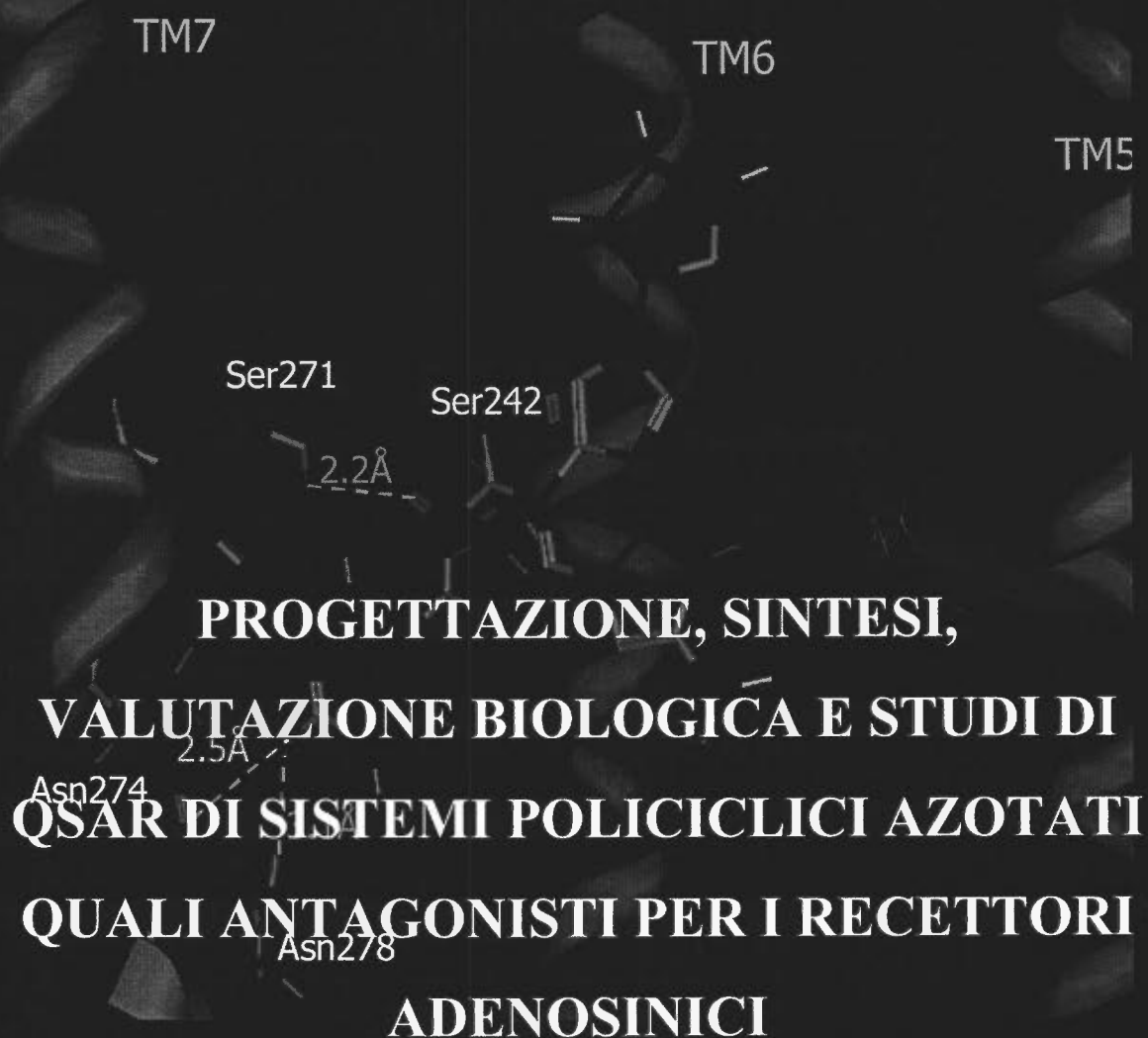


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

XVI ciclo del Dottorato di ricerca in

SCIENZE DEL FARMACO



Dottoranda:

Giorgia Pastorin

Coordinatore del Collegio dei Docenti:

Chiar.mo prof. Maurizio Prato

Relatore:

Chiar.mo prof. Giampiero Spalluto

DRP/1/10

1021656

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

XVI ciclo del

Dottorato di ricerca in SCIENZE DEL FARMACO

PROGETTAZIONE, SINTESI,
VALUTAZIONE BIOLOGICA E STUDI DI
QSAR DI SISTEMI POLICICLICI AZOTATI
QUALI ANTAGONISTI PER I RECETTORI
ADENOSINICI.

Dottoranda:

Giorgia Pastorin 146

CS

Coordinatore del Collegio dei Docenti:

Chiar.mo prof. Maurizio Prato



Relatore:

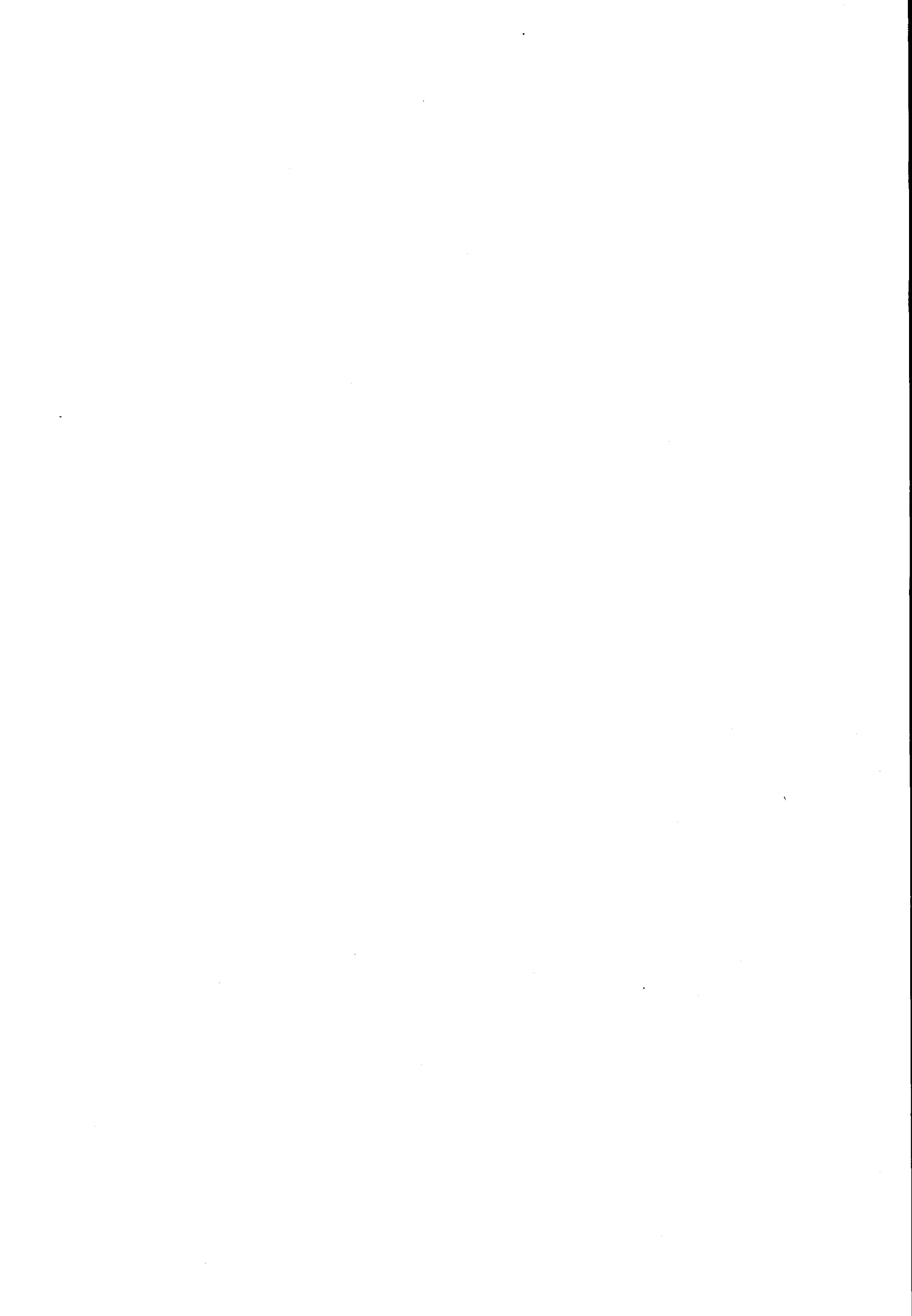
Chiar.mo prof. Giampiero Spalluto

ANNO ACCADEMICO 2002-2003

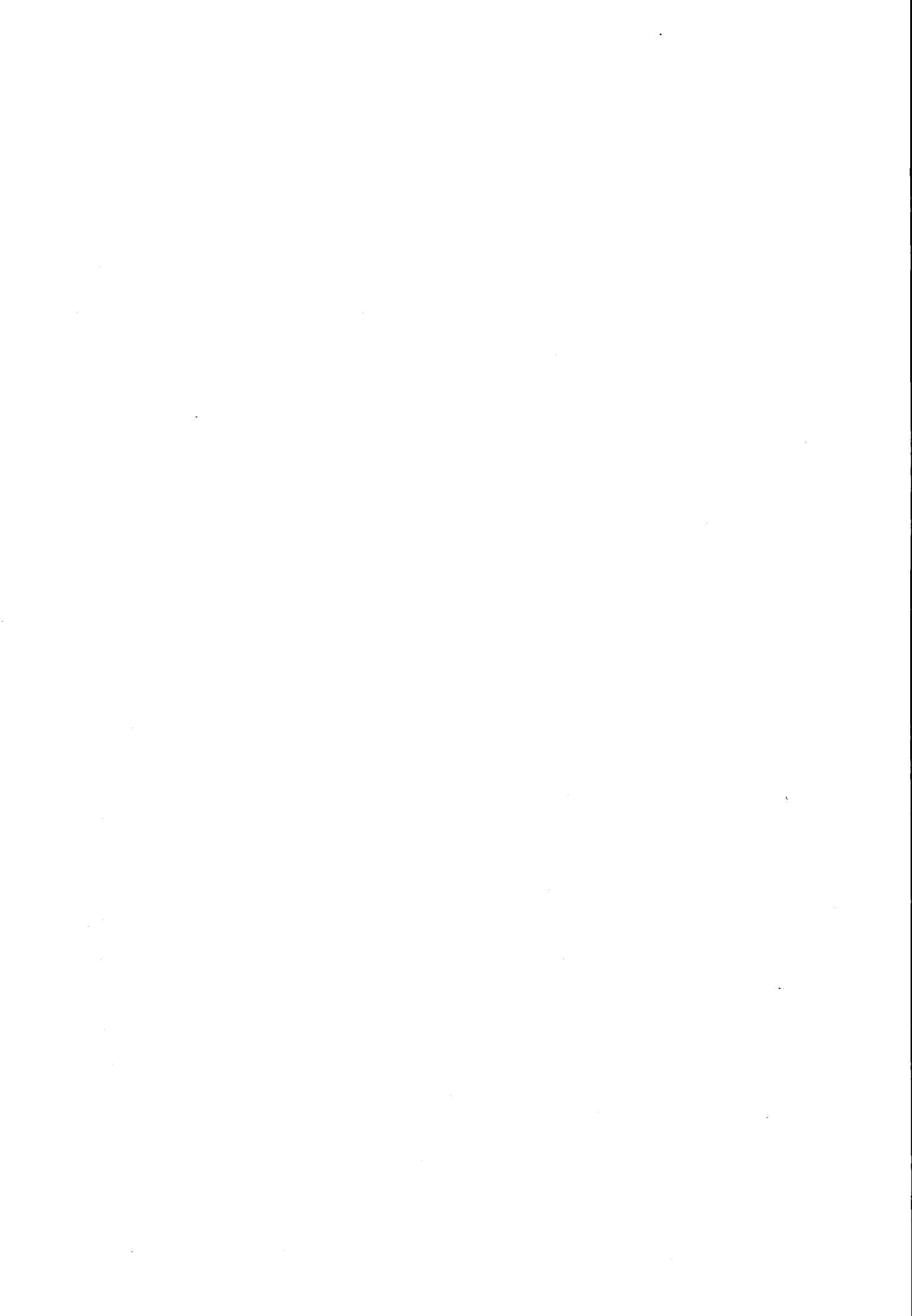


INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. L'Adenosina	pag. 1
1.2. Classificazione dei recettori adenosinici	pag. 3
1.2.1 Recettori adenosinici A_1	pag. 8
<i>1.2.1.a. A_1 Agonisti</i>	pag. 11
<i>1.2.1.b. A_1 Antagonisti</i>	pag. 12
1.2.2 Recettori adenosinici A_{2A}	pag. 15
<i>1.2.2.a. A_{2A} Agonisti</i>	pag. 17
<i>1.2.2.b. A_{2A} Antagonisti</i>	pag. 19
1.2.3 Recettori adenosinici A_{2B}	pag. 23
<i>1.2.3.a. A_{2B} Agonisti</i>	pag. 26
<i>1.2.3.b. A_{2B} Antagonisti</i>	pag. 29
1.2.3 Recettori adenosinici A_3	pag. 34
<i>1.2.3.a. Agonisti</i>	pag. 37
<i>1.2.3.b. Antagonisti</i>	pag. 40
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 53
3. EFFETTO SUL FENILE	pag. 55
3.1. Introduzione	pag. 55
3.2. Chimica	pag. 61
3.3. Risultati e discussione	pag. 64
3.4. Conclusioni	pag. 74
3.5. Parte sperimentale	pag. 75
4. SOLUBILI	pag. 96
4.1. Introduzione	pag. 96
4.2. Chimica	pag. 98
4.3. Risultati e discussione	pag. 102
4.4. Conclusioni	pag. 109
4.5. Parte sperimentale	pag. 110
5. Co. M. F. A.	pag. 120
5.1. Introduzione	pag. 120
5.1.a. Modellistica molecolare	pag. 120
5.1.b. Modello Co.M.F.A	pag. 122



5.2. Chimica	pag. 127
5.3. Risultati e discussione	pag. 129
5.4. Conclusioni	pag. 136
5.5. Parte sperimentale	pag. 137
6. EFFETTO IN N5 SU hA_{2B} E hA₃	pag. 144
6.1. Introduzione	pag. 144
6.2. Chimica	pag. 148
6.3. Risultati e discussione	pag. 150
6.4. Conclusioni	pag. 164
6.5. Parte sperimentale	pag. 165
7. TRIAZOLO TRIAZINE	pag. 172
7.1. Introduzione	pag. 172
7.2. Chimica	pag. 175
7.3. Risultati e discussione	pag. 178
7.4. Conclusioni	pag. 184
7.5. Parte sperimentale	pag. 185
8. BIBLIOGRAFIA	pag. 198
9. APPENDICE	pag. 214
9.1. Chimica	pag. 214
9.2. Biologia	pag. 215
<i>Preparazione di membrane ottenute dalle cellule CHO</i>	pag. 215
<i>Saggio di binding sui recettori adenosinici umani</i>	pag. 215
<i>Saggio di binding sui recettori adenosinici di ratto</i>	pag. 217
<i>Saggio dell'Adenilato Ciclasi</i>	pag. 219
<i>Inibizione dell'Adenilato ciclasi</i>	pag. 220
<i>Dosaggio dei livelli di c-AMP</i>	pag. 220
9.3. Approccio computazionale	pag. 221
9.4. Analisi elementari	pag. 223



1. INTRODUZIONE

1.1. L'Adenosina

L'adenosina (1) è un nucleoside endogeno, largamente distribuito nell'organismo sia a livello centrale che periferico. Essa è costituita dalla base purinica Adenina (un anello purinico sostituito in posizione 6- da un gruppo amminico primario) legata ad una molecola di ribosio tramite un legame β -glicosidico¹(Figura 1).

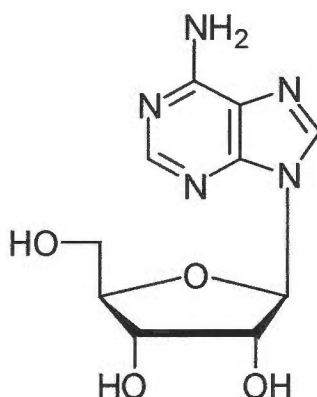


Figura 1. Adenosina (1)

L'adenosina si genera per idrolisi dell'AMP ad opera dell'enzima ecto-5'-nucleotidasi² ed è quindi parte integrante della regolazione energetica in ambito cellulare; in condizioni omeostatiche, essa viene prodotta di continuo sia a livello intra- che extra-cellulare. Nel primo caso, la sintesi avviene attraverso i meccanismi riportati in **Figura 2**.

- 1) idrolisi enzimatica di nucleotidi adeninici, come l'idrolisi di ATP ad ADP, di ADP ad AMP e di AMP ad adenina, catalizzata da endonucleotidasi;
- 2) conversione enzimatica di S-adenosil-metionina (SAM), agente metilante, in S-adenosil-omocisteina (SAH) prima e in adenosina poi;
- 3) sintesi "de novo".

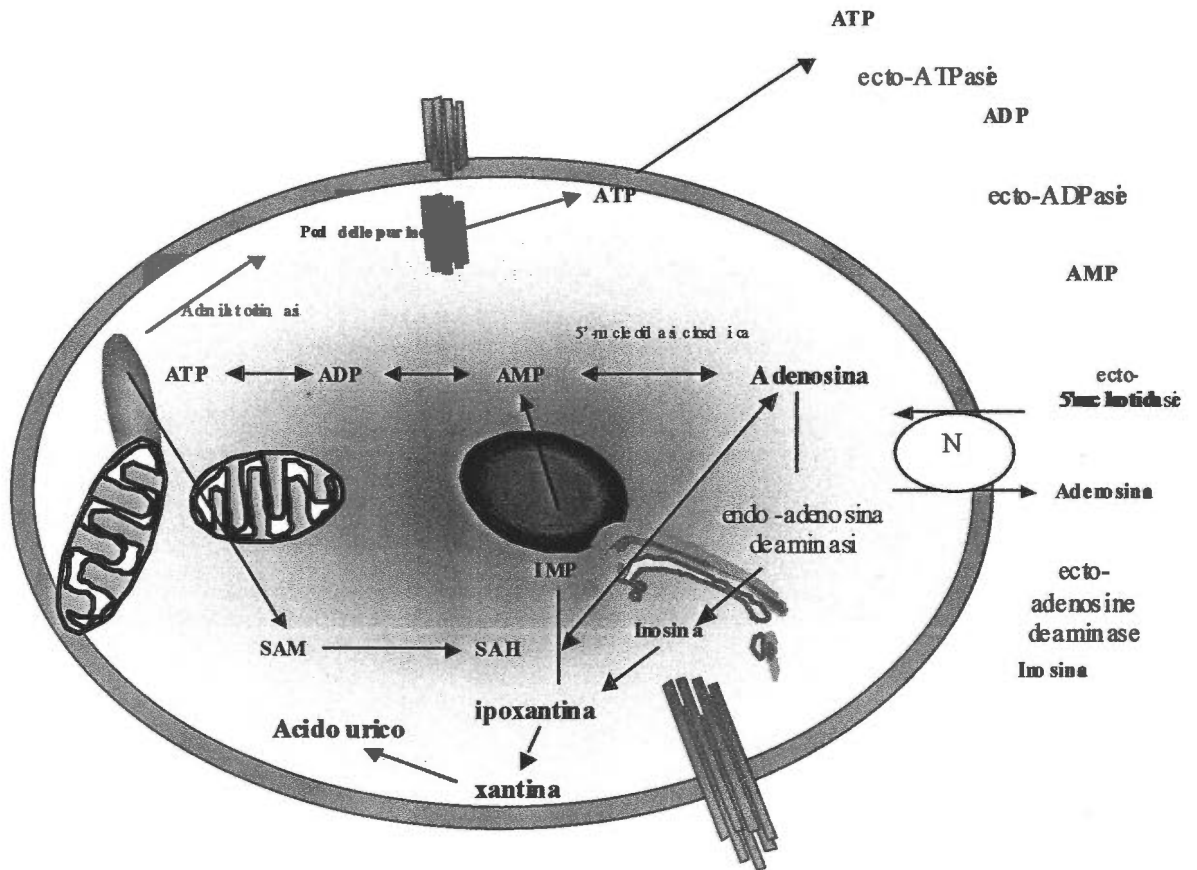


Figura 2. Metabolismo dell'adenosina

A livello extracellulare, l'adenosina deriva dall'ATP rilasciato insieme ai principali neurotrasmettitori; questo può essere successivamente convertito in ADP, 5'-AMP e, infine, in adenosina da una serie di ectoenzimi.

Nel caso di situazioni anomale (come, ad esempio, durante l'ipossia)³ le concentrazioni di adenosina possono aumentare fino a 50-100 volte a causa della degradazione, ad opera della 5'-nucleotidasi citosolica, di eccessive quantità di AMP. Quando i livelli di adenosina, nello spazio extracellulare, sono elevati, si ha un rapido reuptake mediato da trasportatori proteici.

A livello intracellulare, la molecola può venir inattivata attraverso due principali vie

cataboliche: la fosforilazione ad AMP da parte di una adenosina chinasi, o la deaminazione ad inosina ad opera della adenosina deaminasi.

L'adenosina ha numerose proprietà in comune con i classici neurotrasmettitori:

esercita la sua azione attraverso recettori⁴;

- la sua azione può venir inibita da antagonisti specifici;

- gli enzimi deputati alla produzione di adenosina sono presenti nelle sinapsi;

- ci sono efficienti sistemi, metabolico e di reuptake, che ne interrompono l'azione.

Tuttavia, l'adenosina viene generalmente designata come *neuromodulatore*⁵, in quanto non si è ancora dimostrato che essa venga immagazzinata o rilasciata da specifici nervi purinergici.

L'elevata velocità metabolica e l'insufficiente approvvigionamento di ossigeno determinano una locale formazione di adenosina attraverso un'aumentata rottura dell'ATP. L'effetto è quello di contrastare la situazione che si è generata e questo suggerisce che l'adenosina abbia un ruolo importante nel regolare l'approvvigionamento di energia e di ossigeno secondo la richiesta locale. Nel complesso, a questa molecola vengono attribuiti svariati ruoli: una regolazione omeostatica in condizioni fisiologiche normali, ed un effetto protettivo in situazioni di emergenza come l'ischemia o l'infarto⁶; in tali circostanze, l'azione protettiva si esplica riducendo l'ipereccitabilità neuronale, aumentando il rifornimento di sangue locale, riducendo l'influsso di Ca^{2+} nelle cellule e prevenendo la morte cellulare. Questo implica interazioni con differenti recettori adenosinici che si trovano in prossimità di canali del Ca^{2+} e/o del K^+ , con i quali comunicano tramite mediatori associati alla membrana.

1. 2. *Classificazione dei recettori adenosinici*

L'adenosina regola numerose azioni fisiologiche mediante l'interazione con specifici recettori metabotropi di membrana⁷. I recettori purinergici, infatti, vennero suddivisi da Burnstock (nel 1978)⁸ in P1 e P2, a seconda che vengano attivati rispettivamente dall'adenosina o da nucleotidi quali ATP, ADP, UTP e UDP⁹ (**Tabella 1**).

	<i>Adenosina/recettori P1</i>	<i>recettori P2</i>	
<i>Ligandi naturali</i>	Adenosina	ATP, ADP, UTP, UDP	
<i>Sottogruppi</i>	----	P2X	P2Y
<i>Tipi</i>	Recettori associati a proteine G (GPCr)	Canali ionici	Recettori associati a proteine G (GPCr)
<i>Sottotipi</i>	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	P2X ₁₋₇ , P2X _n	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆

Tabella 1: classificazione dei recettori purinergici

I P2 sono distinti in canali ionici a controllo di ligando (P2X) e recettori accoppiati alla proteina G (P2Y).¹⁰

I recettori P1 o adenosinici sono localizzati sulle membrane di diversi tipi di cellule all'interno del sistema nervoso centrale, quali neuroni e cellule gliali¹¹; sugli elementi della circolazione sanguigna quali piastrine, neutrofilo e linfociti; sulle cellule del muscolo liscio; sui miociti¹² e sui mastociti.

Tutti i recettori adenosinici¹³ appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, e la loro struttura putativa (**Figura 3**) consiste di sette α eliche anfipatiche disposte all'interno della membrana cellulare in modo da creare un sito di "binding" per i ligandi, e si ritiene che l'agonista si leghi nella parte superiore rispetto a questo sito. Ciascuna α elica è costituita da 21-28 amminoacidi idrofobici; la porzione N-terminale della proteina è posizionata a livello extracellulare mentre la coda C-terminale si trova sul lato citoplasmatico

della membrana. I domini transmembrana sono connessi da tre “loops” extracellulari e da tre “loops” citoplasmatici idrofili di diversa grandezza.

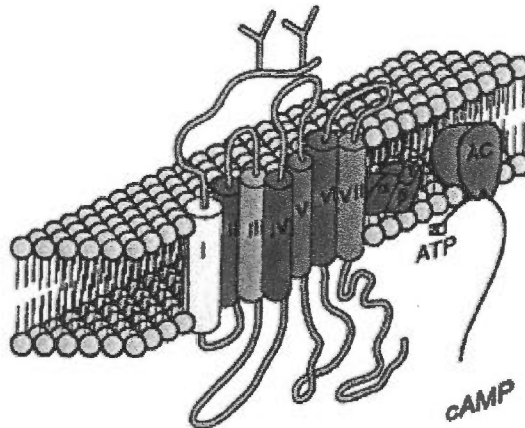


Figura 3. Struttura putativa dei recettori adenosinici

Le regioni transmembrana sono generalmente le più conservate con elevata omologia di amminoacidi nei domini TM2, TM3, TM5.

Tali recettori sono stati inizialmente suddivisi in R_i e R_s ¹⁴, dove R indica la necessità di mantenere una molecola di ribosio intatta, ma sono stati in seguito sostituiti con A_1 e A_2 a seconda, rispettivamente, dell'inibizione o della stimolazione dell'adenilato ciclasi¹⁵. In un secondo tempo, i recettori A_2 sono stati ulteriormente classificati, sulla base della loro alta o bassa affinità nei confronti dell'adenosina, nei due sottotipi recettoriali A_{2A} e A_{2B} .^{4, 13}

La scoperta del recettore A_3 , invece, risale al 1991 quando, tramite una reazione polimerasica a catena, si identificarono sequenze di cDNA di ratto codificanti un recettore accoppiato a proteine regolatorie (proteine G) (Figura 4).

In seguito, Zhou e collaboratori¹⁶ dimostrarono che una di tali sequenze possedeva un'elevata omologia (58%) con i recettori A_1 e A_{2A} precedentemente riportati. Tuttavia, a differenza degli altri sottotipi recettoriali (che evidenziano un'omologia di sequenza pari all'85-95% fra

le diverse specie)¹⁷ questo “nuovo” recettore mostrava solo un’omologia del 72% tra sottotipo umano e di ratto, dimostrando anche una certa differenza nel “binding” degli antagonisti.¹⁸

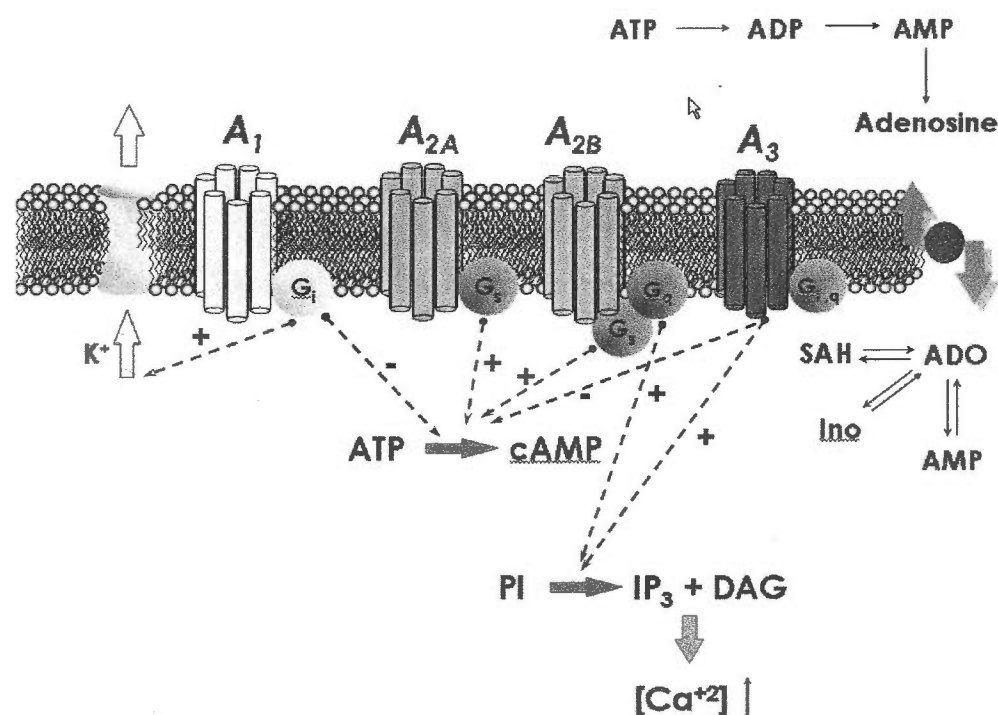


Figura 4. Recettori adenosinici (P1) e accoppiamento all'adenilato ciclasi

La classificazione dei recettori P1 è stata convalidata dai recenti studi di clonaggio molecolare ed è stata approvata dalla Commissione IUPHAR sulla Nomenclatura dei Recettori e sulla Classificazione dei Farmaci^{19,20,21} (Tabella 2).

Nonostante gli innumerevoli sforzi volti ad una più approfondita conoscenza dell'adenosina e all'individuazione di ligandi selettivi verso i sottotipi recettoriali, sono davvero pochissimi gli analoghi adenosinici in fase preclinica oppure impiegati come farmaci.

Il maggior limite è rappresentato dall'ampia gamma di azioni fisiologiche mediate dall'attivazione dei recettori adenosinici, nonché dalla distribuzione piuttosto ubiquitaria di

	RECETTORI A ₁	RECETTORI A _{2A}	RECETTORI A _{2B}	RECETTORI A ₃
Distribuzione:	SNC: corteccia, ippocampo, cervelletto, talamo Tessuti periferici: cuore, rene, tessuto adiposo bianco, stomaco, fegato, milza, vescica vaso deferente, neutrofili, polmoni, macrofagi.	SNC: nucleo accumbens, striato, tubercolo olfattorio Tessuti periferici: cellule endoteliali della muscol. liscia vascolare, piastrine, linfociti, neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi, mastociti, basofili, cuore, polmoni, fegato.	Rivelato in bassa quantità in ogni cellula studiata; presente in maggiore abbondanza nel tratto gastrointestinale e vescica	Specie dipendente: Ratto: testicolo>>polmone, rene, cuore>cervello Uomo: polmoni, fegato, placenta>>cervello, aorta, reni>cuore Capra: polmoni, milza>cervello, testicoli
Clonaggio	Cane, ratto, uomo, bovino, coniglio, topo, cavia. 326-328 aminoacidi	Cane, ratto, uomo, cavia, topo; 409-412 aminoacidi	Ratto, uomo, topo; 332 aminoacidi	Ratto, uomo, capra, coniglio 317-320 aminoacidi
Agonisti	Affinità Alta (0.3-3 nM) <i>CPA, CHA, R-PIA, CCPA</i> Intermedia (3-30 nM) <i>NECA, 2-CADO, S-PIA, ADO</i> Bassa (>350 nM), CV 1808, CGS21680	Affinità Alta (1-20 nM) <i>HENECA, NECA, CGS 21680</i> Intermedia (20-200 nM) <i>CADO, CV 1808, R-PIA</i> Bassa (200-1000 nM) <i>CPA, CHA, S-PIA</i>	Affinità Alta (0.5-5 mM) <i>NECA</i> Intermedia (5-20 mM) 2-CADO, ADO, R-PIA Bassa (20-100 mM) S-PIA, CGS 21680	Affinità Alta (0.3-1 nM) <i>CI-IBMECA, IB-MECA</i> Intermedia (10-100 nM) AB-MECA, NECA, R-PIA Bassa (100-1000 nM) CGS 21680
Antagonisti	Alta (0.5-2 nM) <i>DPCPX, XAC</i> Intermedia (2-200 nM) CGS 15943, CPT Bassa (1-20 mM) IBMX, teofillina	Alta (0.5-1 nM) <i>SCH 58261, ZM 241385</i> Intermedia (0.2-2 mM) DPCPX, CPT Bassa (2-20 mM) Teofillina	Alta (20-100 nM) <i>DPCPX, ZM 241385</i> Bassa (10-20 mM) teofillina	Alta (0.5-1 nM) <i>MRE 3008-F20</i> Intermedia (20-100 nM) VUF 8504, MRS 1523 Bassa (2-20 mM) MRS1191, MRS 1067
Sistema effettore	Accoppiati a Proteine G: Gi, Go Adenilato ciclasi: ↓cAMP Fosfolipasi C: ↑ Ca ⁺⁺ Canali Ionici: ↑ K ⁺ ↓ Ca ⁺⁺	Accoppiati a Proteine G: Gs Adenilato ciclasi: ↑ cAMP	Accoppiati a Proteine G: Gs, Gq Adenilato ciclasi: ↑ cAMP Fosfolipasi C: ↑ Ca ⁺⁺	Accoppiati a Proteine G: Gi, Gq Adenilato ciclasi: ↓ cAMP Fosfolipasi C: ↑ Ca ⁺⁺ ↑ IP ₃

Tabella 2. Classificazione, distribuzione e caratteristiche principali dei recettori adenosinici

tali recettori. Proprio nel tentativo di ridurre eventuali effetti indesiderati, gli agonisti parziali potrebbero rappresentare interessanti profili terapeutici, in quanto è noto che i “full agonists” sono in grado di indurre effetti massimali accompagnati, però, da azioni collaterali spesso fastidiose, dovute all’attività intrinseca elevata ($\alpha = 1$); nel caso, invece, di “partial agonists”, tale fattore è inferiore ($0 < \alpha < 1$), consentendo, quindi, di ottenere gli effetti voluti su un tessuto specifico che esprima, in alte densità, un determinato sottotipo recettoriale.

1. 2. 1. Recettori adenosinici A_1

I recettori adenosinici A_1 sono in particolar modo ubiquitari all’interno del sistema nervoso centrale, dove sono presenti sulla membrana neuronale sia in posizione pre- che post-sinaptica.

Alti livelli di questi recettori sono espressi nella corteccia cerebrale, nell’ippocampo, nel cervelletto, nel talamo, nella colonna vertebrale^{22, 23} e nel tessuto adiposo.

A livelli intermedi i recettori A_1 sono presenti nel muscolo scheletrico, nel fegato, nei reni, nelle ghiandole salivari, nell’esofago, nel colon, nell’antro e nei testicoli.

Livelli ancora più bassi di recettori A_1 si trovano nei polmoni e nel pancreas.

I recettori A_1 mediano una vasta gamma di risposte (**Tabella 3**) causate dall’accoppiamento di questi recettori con differenti proteine G appartenenti alla famiglia delle Gi/q^{24, 25}; infatti la via di trasduzione del segnale, maggiormente riconosciuta ad opera di tali recettori, è l’inibizione dell’adenilato ciclasi, che causa un decremento nei livelli del secondo messaggero cAMP.^{26, 27}

Questo a sua volta modula l’attività di una proteina chinasi cAMP-dipendente, la quale fosforila diverse proteine target.

Un altro meccanismo di trasduzione del segnale mediato dai recettori A_1 è l’attivazione della fosfolipasi C (PLC), che comporta un aumento nella produzione di inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3) e di diacilglicerolo (DAG), con conseguente mobilizzazione di Ca^{2+} dai depositi

intracellulari.^{28, 29}

Infine, la stimolazione di recettori A_1 può attivare diversi canali del K^+ , che si trovano principalmente nel muscolo cardiaco e nei neuroni.

I recettori A_1 sono stati clonati in differenti specie animali, compreso l'uomo, e i vari cloni codificano per una proteina di 326 amminoacidi. L'omologia tra queste specie è approssimativamente dell'87-92%, anche se sono state evidenziate leggere differenze nell'accoppiamento con le proteine G, nonché una distribuzione tissutale specie-dipendente.

Uno dei più interessanti effetti dell'adenosina è la riduzione dell'attività neuronale nel SNC, che avviene o attraverso l'apertura dei canali del K^+ (che a sua volta provoca iperpolarizzazione e riduzione dell'eccitabilità postsinaptica), o attraverso un decremento del rilascio di neurotrasmettitori. Dunque l'adenosina sembra fungere da agente neuroprotettivo, e la sua azione a livello dei recettori A_1 comporta effetti sedativi, anticonvulsivanti, ansiolitici e locomotore-deprimenti.^{30, 31}

Nel tessuto adiposo³², invece, A_1 agonisti sembrano esercitare effetti anti-lipolitici che potrebbero risultare vantaggiosi in alcuni stati patologici quali diabete e obesità. In tal senso, il Tecadenoson® (9- β -D-Ribofuranosil-N-[(3R)tetraidrofuran-3-il]-9H-purin-6-ammina) svolge un'azione anti-lipolitica a dosi che non compromettono la velocità di conduzione cardiaca, confermando una maggiore riserva recettoriale a livello di adipociti piuttosto che nel cuore.³³

Inoltre l'adenosina facilita l'azione dell'insulina nel trasporto del glucosio³⁴, riducendone così i livelli plasmatici, con un meccanismo in cui sembrano essere coinvolti i recettori A_1 .

A livello cardiaco, l'adenosina esercita un ruolo protettivo che sembra essere mediato sia dai recettori A_1 che A_3 , e questo rende difficile una loro distinzione. Nonostante ciò, l'Adenocard® (9- β -D-Ribofuranosil-9H-purin-6-ammina) viene impiegato da una decina d'anni per il trattamento di aritmie sopraventricolari, in quanto l'adenosina è in grado di prolungare il periodo refrattario del nodo AV, riducendo la conduzione dell'impulso (effetto

dromotropo negativo), che si è rivelato estremamente utile nella “tachicardia parossistica sopraventricolare”(PSVT).^{35, 36}

Tuttavia, a causa dell'emivita molto ridotta e degli effetti indesiderati (vasodilatazione determinata dalla stimolazione dei recettori A_{2A} e A_{2B}) si è ricorsi al Tecadenoson®: gli elettrocardiogrammi di pazienti con PSVT trattati con tale agonista, rispetto a quelli sottoposti ad adenosina, hanno dimostrato minor incidenza di aritmie ventricolari, senza causare ipotensione.³⁷

Nel complesso, si può affermare che il recettore adenosinico A₁, grazie alla sua stimolazione, media cardioprotezione attraverso un effetto cronotropo, dromotropo e inotropo negativo¹², mentre il suo blocco attualmente non sembra avere sbocchi dal punto di vista clinico.

Nei reni, il blocco del recettore A₁ riduce l'assorbimento del Na⁺ a livello di tubulo prossimale, perciò antagonisti selettivi risultano potenti diuretici, esercitando inoltre un ruolo protettivo nel danno acuto renale.³⁸ Se utilizzati in associazione con diuretici convenzionali (es. furosemide), sono in grado di incrementare il volume di urina, mantenendo inalterata la velocità di filtrazione glomerulare (GFR).³⁹

SNC	Riduzione del rilascio di trasmettitori Riduzione dell'attività locomotoria Sedazione Effetti anticonvulsivanti
Sist.metabolico	Effetto antilipolitico Incremento sensibilità all'insulina
Sist.cardiovascolare	Effetto inotropo - Effetto cronotropo - Effetto dromotropo -
Tratto GI	Inibizione della secrezione acida
Sist.renale	Riduzione di GFR Inibizione del rilascio di renina Effetto antidiuretico Vasocostrizione dell'arteria afferente

Tabella 3. Effetti mediati dal recettore A₁ in vari sistemi

1. 2. 1. a. A_1 Agonisti

Purtroppo i recettori A_1 mediano fenomeni periferici quali depressione cardiaca, per cui gli effetti centrali degli agonisti A_1 avvengono in associazione a ipotensione, bradicardia, sedazione e ipotermia; ciò ha impedito lo sviluppo di agonisti A_1 quali nuovi agenti terapeutici⁴⁰. Tuttavia, si sono rivelate particolarmente interessanti alcune strutture, come i derivati adenosinici N6-sostituiti: ad esempio l' N^6 -ciclopentiladenosina (CPA, 2)⁴¹, l' N^6 -cicloesiladenosina (CHA, 3) e l' N^6 -(2-fenilisopropil)adenosina (R-PIA, 4), che presentano un range di affinità tra 0.6 e 1.3 nM^{42, 43}, con alta selettività verso gli altri sottotipi (Figura 5).

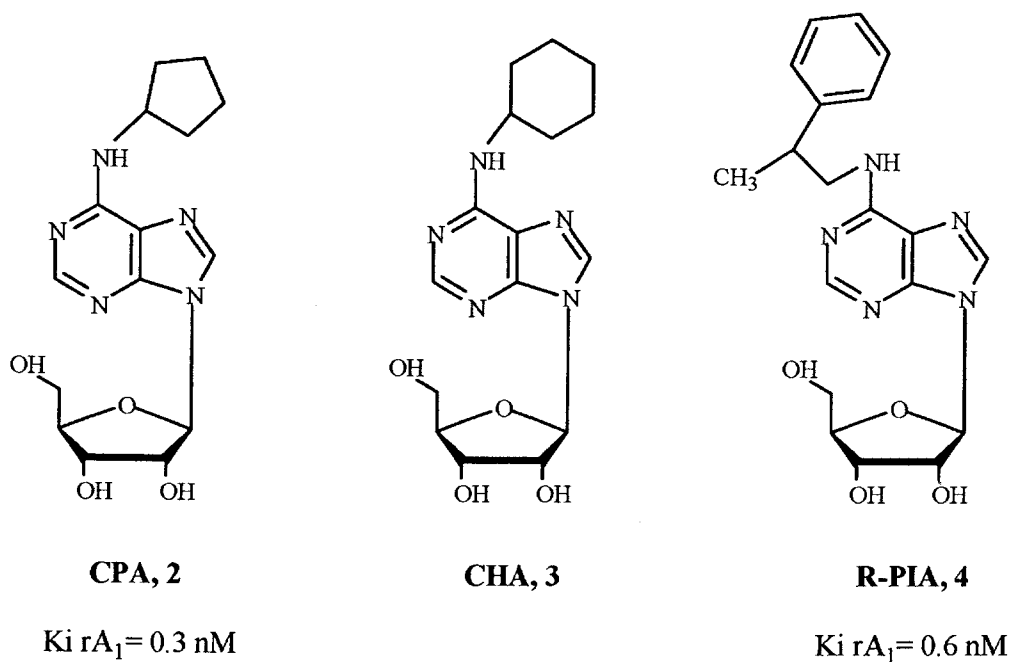


Figura 5. A_1 agonisti

E' possibile anche una sostituzione contemporanea in C2 senza compromettere la selettività⁴⁴; questo è stato riscontrato nei saggi *in vitro*, in cui viene valutato lo spiazzamento dell'agonista [^3H](R)-PIA dalle membrane di cervello di ratto esprimenti il recettore adenosinico A_1 . Un ulteriore tentativo è stato quello di sintetizzare alcuni N^6 -3-iodobenzil derivati, che però

hanno evidenziato un'affinità peggiore verso A_1 di ratto ($K_i A_1 = 340$ nM), e decisamente superiore verso il sottotipo A_3 ($K_i A_3 = 5.16$ nM) espresso in cellule CHO, con conseguente inversione di selettività.

1. 2. 1. b. A_1 Antagonisti

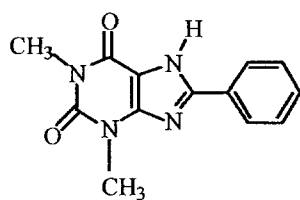
Xantine

La scarsa solubilità in acqua dei derivati xantinici rappresenta la maggior difficoltà riscontrata negli esperimenti clinici.⁴⁵ Si vede infatti che il farmacoforo 8-fenile nella xantina fa aumentare la potenza dei composti ma induce un decremento di solubilità.

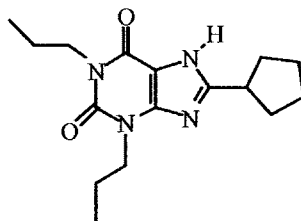
Così, l'**8-fenilteofillina (5)** è circa 6000 volte meno solubile della teofillina, ma risulta 100 volte più attiva verso i recettori A_1 . Un aumento di solubilità è invece rilevabile con l'introduzione di gruppi polari in posizione 1 e 3; la contemporanea introduzione di sostituenti idrofobici (fenile o cicloalchile) in posizione 8 ha dato origine a potenti antagonisti A_1 -selettivi, quali l'1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (**DPCPX, 6**), oppure l'1,3-dipropil-8-[2-(5,6-epossinorbopil)]xantina (**ENX, 7**)⁴⁶ (**Figura 6**).

1,2,4-Triazolo[4,3-a]chinossalin-1-oni e Imidazo[1,2-a]chinossaline

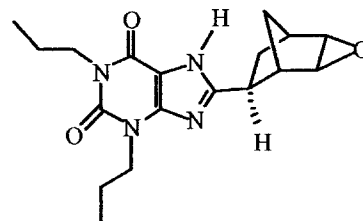
Composto leader per questa classe è il 4-ammino-2-fenil-1,2-diidro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinossalin-1-one (**8**), antagonista non selettivo per gli A_1 .⁴⁷ Se al gruppo amminico libero si aggiunge come sostituente un ciclopentano, si incrementano la potenza e la selettività (**9**). Modificazioni a carico dell'anello 2-fenilico, possono far variare la selettività; infatti, la presenza di un atomo di fluoro, in posizione 3 dell'anello, diminuisce la selettività verso gli A_{2A} , mentre un gruppo metilico la diminuisce verso gli A_3 (**Tabella 4**).



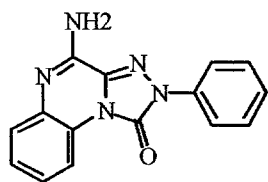
8-fenilteofilina, 5



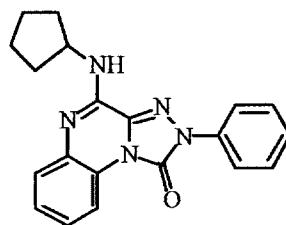
DPCX, 6



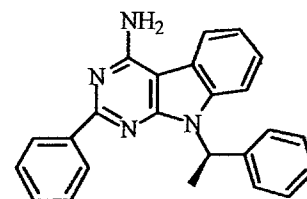
ENX, 7



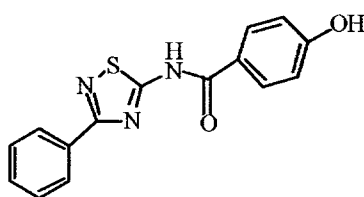
8



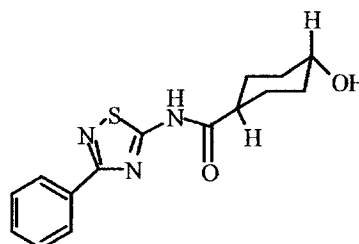
9



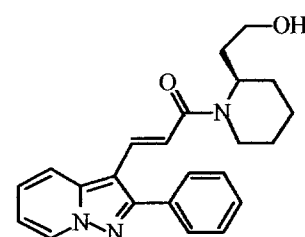
APEPI, 10



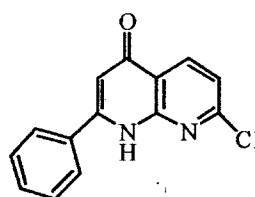
LUF 5437, 11



VUF 5472, 12



(R) FK 453, 13



14

Figura 6. A₁ antagonisti

	hA ₁ (nM)	hA _{2A} (nM)	hA _{2B} (nM)	hA ₃ (nM)
<i>DPCPX, 6</i>	3.90	130	50	4,000
<i>ENX, 7</i>	0.45	1,100	180	4,000
<i>CHINOSSALIN-1-ONE, 8</i>	0.42	1,000		55
<i>IMIDAZOCHINOSSALINA</i>	(r)7.90	(r)2,500		10,000
<i>PIRIMIDO-INDOLO(APEPI), 10</i>	2.60	6,200	>10,000	>1,000
<i>TIADIAZOLO(LUF 5437), 11</i>	(r)7.3	(r)570		130
<i>THIAZOLO</i>	(r)18	(r) >10,000		900
<i>PIRAZOLOPIRIDINE, 13</i>	0.026	140		

Tabella 4. A₁ antagonisti.

7-deazaadenine

In questa classe di composti, si è dimostrato interessante il composto a struttura pirimido[4,5-b]indolica, denominato **APEPI (10)**⁴⁸; esso è in grado di legare il recettore A₁ sulla corteccia di ratto con un'affinità più marcata per l'enantiomero (R). Questa interazione particolarmente favorevole sembra possa essere attribuita alla planarità del nucleo pirimindolico; ciò è stato confermato dal fatto che il corrispondente tetraidropirimindolo risulta essere solo un debole antagonista verso tale recettore.

Tiadiazoli e Tiazoli

La sostituzione del sistema biciclico, tipico dell'antagonista A₃ selettivo a struttura isochinolinica, con un tiadiazolo, ha dato origine all'**LUF 5437, (11, N-(3-fenil-1,2,4-tiadiazol-5-il)-4-idrossibenzammide)**, un composto con duplice attività sui recettori A₁ e A₃. L'affinità può essere ulteriormente incrementata sostituendo il 4-idrossi con la 4-idrossicicloesilammide (**VUF 5472, 12, isomero trans, con Ki rA₁= 20 nM; Ki rA_{2A} >10,000 nM; Ki hA₃= 1,900 nM**).⁴⁹

Pirazolo[1,5-a]piridine

Questi derivati sono strutturalmente differenti dai precedenti; il lead compound è rappresentato dall'FK 453, 13, (configurazione (R)), che esplica una potente azione diuretica proprio grazie all'interazione col sottotipo A₁. Infatti il doppio legame del gruppo cicloesenilacetico risulta essenziale per garantire selettività, che può essere ulteriormente incrementata mediante la sostituzione del gruppo carbossilico acido con molecole a maggior carattere idrofobico.⁵⁰ In tal modo sono stati ottenuti altri antagonisti, che prevedono l'introduzione di ammidi, ammine o piperidine in N2' dell'anello piridazinonico.

1,8-Naftiridine

Questi derivati (14) si comportano come antagonisti nei saggi di inibizione dell'adenilato ciclasi, effettuati in membrane della corteccia cerebrale di ratto, con un eccellente valore di IC₅₀ (0.034 nM).⁵¹

1. 2. 2. Recettori adenosinici A_{2A}

In base alla capacità dell'adenosina di stimolare l'adenilato ciclasi nelle membrane dello striato, Daly e collaboratori⁵² hanno introdotto la divisione del recettore A₂ in 2 sottotipi:

A_{2A} con alta affinità per l'adenosina (0.1-1.0 μM);

A_{2B} con bassa affinità per l'adenosina (>10 μM).

I recettori adenosinici A_{2A} sono più ampiamente espressi nei neuroni spinali intermedi dello striato, in stretta associazione con i recettori dopaminici D₂ con i quali sono state descritte reciproche interazioni.⁵³⁻⁵⁵

I recettori A_{2A} sono localizzati, a livello centrale, nelle aree ricche di dopamina quali striato, nucleo accumbens, tubercolo olfattorio e nelle cellule di Purkinji del cervelletto,⁵⁶ mentre a livello periferico sono abbondanti nelle cellule endoteliali della muscolatura liscia vascolare, in piastrine, linfociti, monociti, macrofagi, neutrofili, basofili, eosinofili, mastociti, polmoni, cuore, vescica e tessuti immunitari.⁵⁷⁻⁶⁰

Evidenze biochimiche, anatomiche e comportamentali suggeriscono che i recettori A_{2A} interagiscono sia direttamente che indirettamente con un certo numero di differenti sistemi di neurotrasmettitori quali dopamina, GABA, acetilcolina e glutammato, sia nei gangli basali che in altre strutture cerebrali.⁶¹

A livello del SNC, il blocco farmacologico⁶² dei recettori A_{2A} diminuisce il danno cellulare riducendone la morte neuronale.⁶³ Funzionalmente, l'attivazione dei recettori A_{2A} interagisce con i recettori dopaminergici D_2 nei neuroni spinali, e gli antagonisti del recettore A_{2A} sono stati studiati per un possibile uso nelle malattie neurodegenerative come il Morbo di Parkinson⁶⁴ o la Corea di Huntington.⁶⁵ In particolare, l'importanza degli antagonisti A_{2A} nel trattamento del Morbo di Parkinson è dovuta alla modulazione diretta della neurotrasmissione dopaminergica che si presume rovesci il mancato coordinamento motorio tipico di questa malattia.⁶⁶; questo può essere attribuito al fatto che l'attivazione di tale sottotipo recettoriale sembra sia in grado di ridurre l'affinità della dopamina per i recettori D_2 . Inoltre, il blocco dei recettori A_{2A} rallenta la progressione delle caratteristiche neuropatologiche della malattia.⁶⁷ Infine, visto l'importante ruolo dei recettori A_{2A} nel modulare il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori in diverse regioni del cervello, può essere positivo l'uso di antagonisti o di parziali agonisti A_{2A} per ridurre la perdita neuronale cui si va incontro nelle malattie neurodegenerative.

Gli antagonisti D_2 della dopamina vengono inoltre impiegati nel trattamento della schizofrenia; sulla base dell'effetto sinergico di inibizione D_2 / attivazione A_{2A} , agonisti selettivi A_{2A} potrebbero essere utilizzati nella schizofrenia⁶⁸ oppure nella depressione che spesso accompagna i malati di Parkinson, sfruttando le loro proprietà antipsicotiche.⁶⁹

Infine, il gruppo di Joel Linden ha indicato un ulteriore ruolo di tale sottotipo recettoriale, la cui attivazione sembra ridurre l'infiammazione, e quindi il danno tissutale, durante la riperfusione che segue l'ipossia.⁷⁰ Infatti l'attivazione di A_{2A} inibisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL-6, IL-8 e IL-12)^{71, 72} favorendo quello di citochine anti-infiammatorie (IL-10) dai monociti.

1. 2. 2. a. A_{2A} Agonisti

E' noto che la vasodilatazione coronarica, indotta dall'adenosina in differenti specie, è mediata dai recettori A_{2A} ,⁷³ ma è accompagnata da azioni secondarie, quali un effetto dromotropo negativo (dovuto all'attivazione anche degli A_1)⁷⁴ ed una broncoostrizione in pazienti asmatici (da parte degli A_3). Per questo motivo, è quanto mai auspicabile sintetizzare composti in grado di esercitare vasodilatazione ma non le funzioni mediate dai recettori A_1 e A_3 , garantendo quindi le desiderate azioni anti-aggreganti e anti-infiammatorie (**Figura 7**).

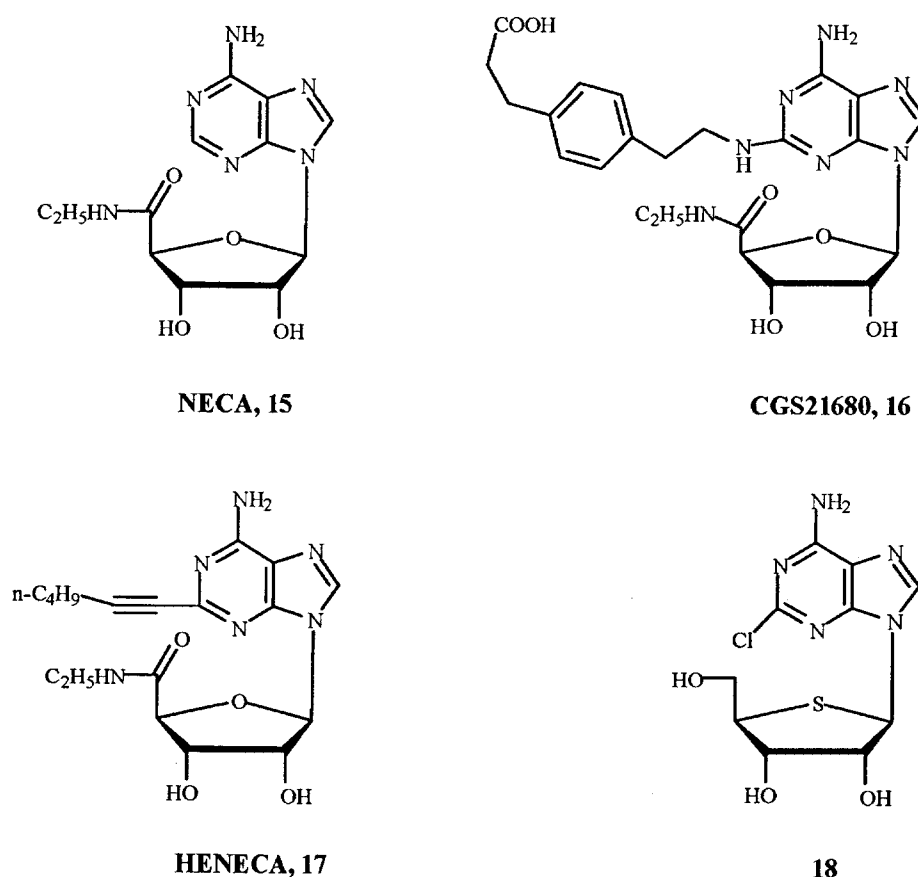


Figura 7. A_{2A} Agonisti

In genere, il recettore A_{2A} non interagisce con i derivati adenosinici N6-sostituiti, mentre modifiche in 2 e 5', se da un lato prolungano l'effetto di vasodilatazione coronarica, dall'altro ne riducono la potenza, con l'unica eccezione di sostituenti piuttosto ingombranti in posizione 2 dell'anello adeninico.⁷⁵ In particolare, il derivato N-etilcarbrossiammidoadenosina (**NECA, 15**)^{76, 77} si è rivelato un potente vasodilatatore, nonché ipotensivo e inibitore dell'aggregazione

piastrinica indotta dall'ADP, benché il suo impiego sia limitato dalla scarsa selettività rispetto ad A₁. Tuttavia, il derivato NECA C2-sostituito, il **CGS21680 (16)**,⁷⁸ risulta essere 140 volte più selettivo su A_{2A} rispetto ad A₁ e poco affine su A_{2B}, perciò è stato utilizzato, come radioligando, per discriminare tra i sottotipi A_{2A} e A_{2B}.

Sono stati anche studiati i derivati del NECA di tipo 2-(ar)alchinil e 2-eteroaralchinil: tra questi, il 2-esil-5'-N-etilcarbossammidoadenosina (**2-HE-NECA, 17**)⁷⁹ ha evidenziato una selettività, rispetto ad A₁, pari a 60 e 160 in studi di binding condotti rispettivamente su cervello di ratto e bovino, dimostrando di essere il più potente antiaggregante piastrinico.⁸⁰

Invece i gruppi 2'- e 3'-idrossi del ribosio,⁸¹ oppure gli azoti in 3 e 7 dell'adenosina, sembrano essere essenziali per garantire una buona potenza; l'unico cambiamento all'anello ribosidico che non compromette il profilo di binding è la sostituzione isosterica dell'ossigeno endociclico con un solfuro, **18**, che è in grado di incrementare la potenza di circa 3 volte.⁸²

La maggior parte dei composti, compreso il CGS 21680, evidenziano un'azione vasorilassante; contrariamente a quanto si potesse intuire dagli interessanti risultati ottenuti, nella caratterizzazione dei composti sintetizzati, su cellule clonate con tutti i sottotipi recettoriali umani, in realtà nessuno è risultato contemporaneamente affine e selettivo, dimostrando come non sia ancora disponibile un agonista ottimale.

1. 2. 2. b. A_{2A} Antagonisti

Xantine

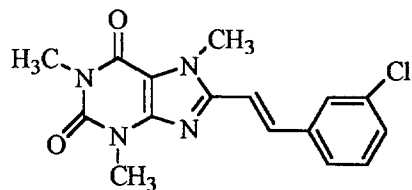
Benché sia stato dimostrato che le xantine naturali sono in grado di legare tutti i sottotipi recettoriali, senza discriminazione, ad una concentrazione micromolare (15-80 μM), tuttavia i derivati più interessanti, tra gli A_{2A} antagonisti, presentano una struttura di tipo xantinico; ad esempio le 8-stirilxantine, quali l' 8-(3-clorostiril)caffaina (CSC, 19)⁸³, che è un antagonista A_{2A} potente e selettivo, grazie alla sua capacità di annullare l'azione agonista sull'adenilato ciclasi (Figura 8).

Inoltre Suzuki e collaboratori hanno riportato il derivato 1,3-dipropil-7-metil-8-(3,4-dimetossistiril)xantina (KF 17837, 20)⁸⁴, mentre il gruppo di Muller ha proposto i derivati di DMPX, (21, 3,7-dimetil-1-propargilxantina) come buoni antagonisti; tra questi l'8-(*m*-bromostiril)-DMPX (22), che ha una K_i pari 8.2 nM ed una selettività superiore a 150 volte rispetto al sottotipo A_1 .⁸⁵

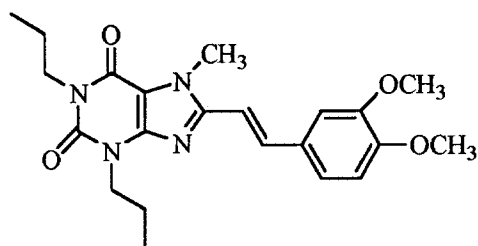
Purtroppo due problemi rilevanti accompagnano queste strutture: la scarsa solubilità in acqua e la tendenza a fotoisomerizzare una volta esposti alla luce⁸⁶. In generale, sembra che la sostituzione in posizione 1 con propargil o *n*-propil, accompagnata dal metile in 3 e 7, siano requisiti ottimali per garantire affinità e selettività verso questo recettore;⁸⁷ per quanto riguarda, invece, il problema della fotoisomerizzazione, è noto che l'isomero (*E*) sia più potente rispetto allo (*Z*); la radiazione solare comporta la conversione del derivato nella miscela isomerica (*E*, *Z*), con conseguente riduzione di affinità e selettività. Si è pensato, perciò, di ricorrere ad analoghi strutturalmente impediti, 23 (sostituendo, ad esempio, lo stirile con feniletinile, o fenilciclopropile...), ma ciò ha portato una brusca perdita di potenza.⁸⁸

Al contrario, per incrementare la solubilità in acqua, sono stati introdotti gruppi polari(es. $-\text{SO}_3\text{K}$) in *para* all'anello aromatico (24)⁸⁹, oppure si sono adottati i fosfati come profarmaci (25)⁹⁰; nel primo caso l'affinità è diminuita di 20-30 volte, mentre nel secondo si è potuto ottenere un composto altamente solubile (15 mM), molto stabile in ambiente acquoso, ed in

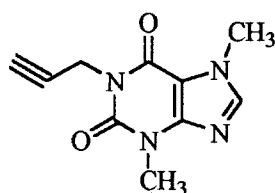
grado di liberare, sotto l'azione delle fosfatasi, l'MSX-2-(3-idrossipropil)7-metil-8-(3-metossistiril)-1-propargilxantina **26**.



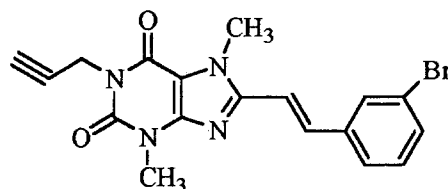
CSC, 19



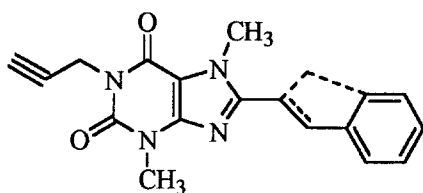
(E)- KF17837, 20



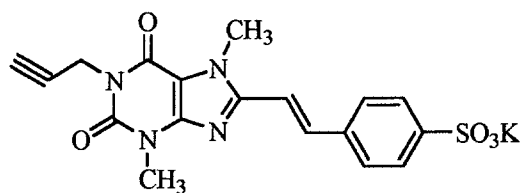
DMPX, 21



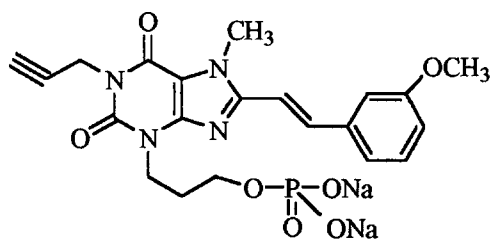
22



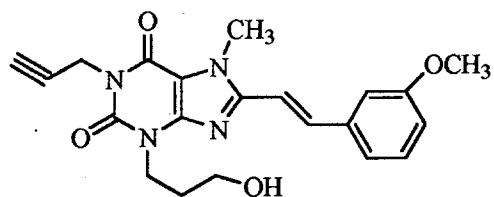
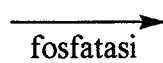
23



24



pro-farmaco, 25



26

Figura 8. A_{2A} antagonisti xantinnici

Derivati non-xantinici

Esistono anche altri interessanti composti di tipo non-xantinico (**Figura 9**); infatti il CGS **15943**, (**27**, 9-cloro-2-(2-furil)1,2,4-triazolo[1,5-c]chinazolin-5-ammina)⁹¹, evidenziando buona affinità ma non altrettanta selettività (lega anche il recettore hA₃ con K_i= 80 nM), ha comunque rappresentato il punto di partenza per la sintesi di altri composti.

Zocchi e collaboratori, invece, hanno riportato composti con profilo di binding, sul recettore A_{2A}, nel range nM: ad esempio l'SCH **58261**, (**28**, 5-ammino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina), la cui selettività può essere ulteriormente incrementata ricorrendo all'analogo, sintetizzato da Baraldi, SCH **63390**, (**29**, 5-ammino-7-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina).⁹²

Grazie ai numerosi derivati recanti questa struttura,⁹³ è emerso un profilo di SAR piuttosto preciso: il gruppo amminico in 5 deve essere possibilmente libero, mentre il furano in posizione 2 è essenziale (una sua sostituzione fa perdere attività). Infine, la sostituzione sul pirazolo influenza molto il valore di binding: in particolare, la presenza di una catena alchilica in N⁷ sembra essere essenziale sia nel modello di ratto che in quello umano.

Purtroppo, questi composti mostrano il forte limite di essere scarsamente solubili in acqua e, quindi, poco biodisponibili. Per questo motivo, si è pensato di introdurre gruppi polari come un -OH in *para* all'anello aromatico della catena laterale (**30**),⁹⁴ che fosse in grado di incrementare il carattere idrofilico, oltre l'affinità e la selettività, e si adattasse perfettamente ad un'eventuale tasca. E' interessante notare come tale gruppo sembri intervenire nella formazione di un legame idrogeno, sebbene non sia sufficiente a conferire buona solubilità alla molecola. Si assiste ad una brusca perdita di affinità qualora vengano introdotti gruppi carbossilici (**31**) o solfonici (**32**), confermando il carattere prettamente lipofilo di tale cavità.

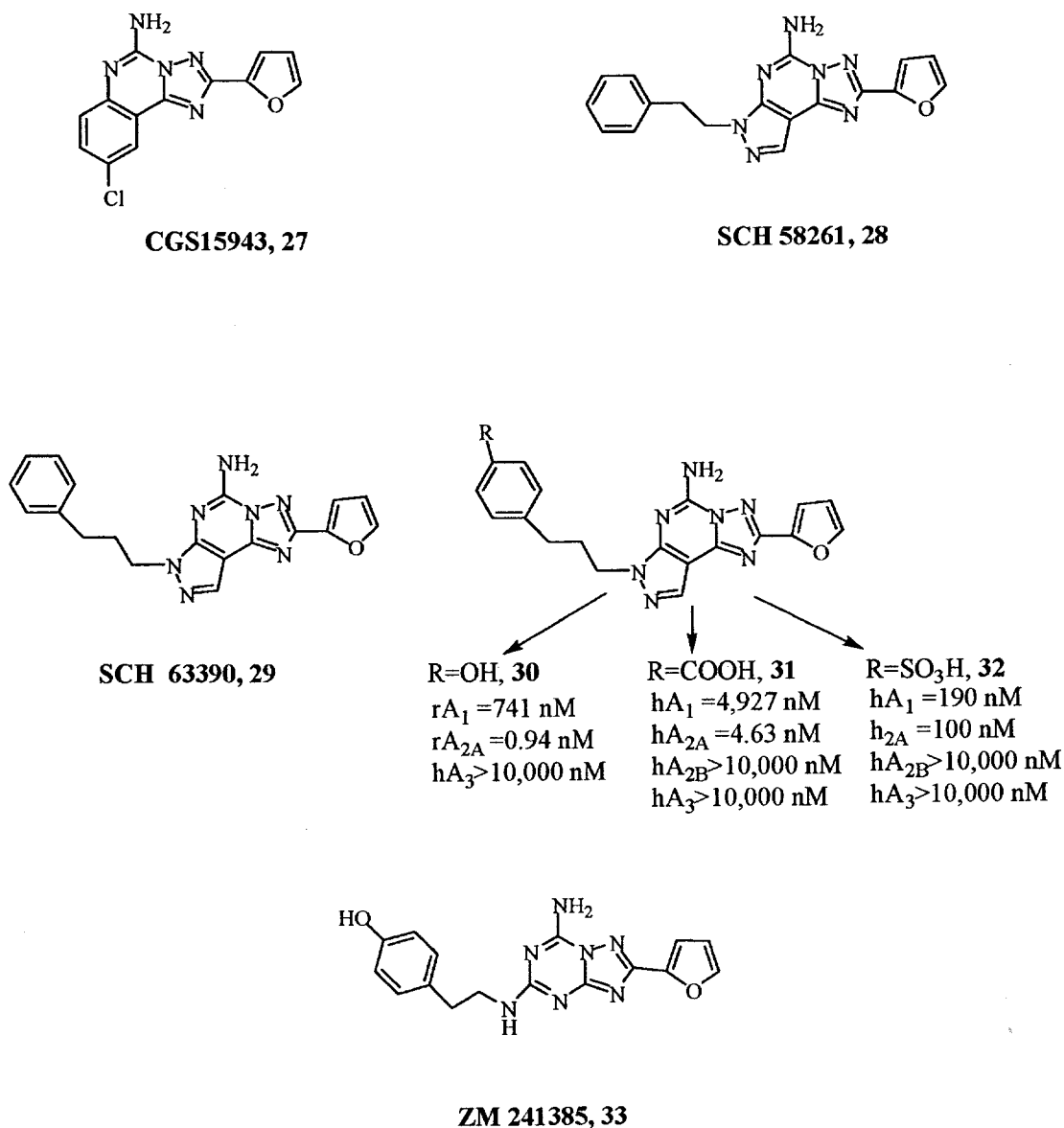


Figura 9. Antagonisti A_{2A} non xantinnici

E' stato anche utile verificare se il nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico fosse essenziale in ogni sua porzione per avere attività o se, piuttosto, una struttura semplificata fosse comunque in grado di dare risultati equivalenti; a tal proposito, il gruppo Zeneca ha fornito il derivato **ZM 241385**, (33, 4-[2-[7-ammino-2-(2-furil)[1,2,4]-triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-il]ammino]fenolo), l'analogo semplificato del sistema triciclico, che purtroppo lega anche il

sottotipo hA_{2B} e viene perciò utilizzato, nella forma triziata, per gli studi di binding di questo recettore.⁹⁵ Fino ad oggi, comunque, sembra piuttosto difficile conciliare buone affinità e selettività con un'altrettanto soddisfacente biodisponibilità (**Tabella 5**).

	rA_1 (nM)	rA_{2A} (nM)	hA_{2B} (nM)	hA_3 (nM)
<i>CSC, 19</i>	28,000	54	--	--
<i>(E)-KF17837, 20</i>	62	1	--	--
<i>DMPX, 21</i>	45,000	16,000	(m)11,000	--
<i>CGS15943, 27</i>	21	3.3	112	14-90
<i>SCH58261, 28</i>	128	2.3	--	>10,000
<i>SCH63390, 29</i>	504	2.4	--	>10,000
<i>ZM241385, 33</i>	2,040	0.3	(g)87	>10,000

Tabella 5. A_{2A} antagonisti

1. 2. 3. Recettori adenosinici A_{2B}

La presenza di questi recettori fu confermata, in molteplici sistemi, dalla stimolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi, che consentì di escludere facilmente il carattere inibente dei recettori A_1 e A_3 , mentre la distinzione tra i due sottotipi A_2 si è basata sul grado di potenza osservato con gli agonisti. Infatti, la più grande indicazione della presenza del recettore adenosinico A_{2B} è fornita dall'insensibilità verso il CGS 21680 (**16**), (EC_{50} tra 200 μ M e 1 mM), un agonista con alta potenza verso gli A_{2A} .

Studi iniziali riportavano che l'espressione del recettore A_{2B} fosse ristretta agli organi periferici quali vescica, intestino, polmone, epididimo e vasi deferenti come nella colonna vertebrale e nel cervello, ma tali sottotipi sono stati anche trovati nei fibroblasti,⁹⁶ in vari letti vascolari,⁹⁷ nelle cellule ematopoietiche,⁹⁸ nei mastociti,⁹⁹ nelle cellule del miocardio,¹⁰⁰ nelle cellule muscolari¹⁰¹ e dell'endotelio.¹⁰²

La determinazione quantitativa della distribuzione tissutale dei recettori adenosinici A_{2B} non è possibile oggi, per mancanza di potenti radioligandi con specifica selettività. In conseguenza di ciò, tutte le informazioni presenti in letteratura sono basate su dati riferiti ai livelli di mRNA (per es. tramite Northern blot analysis, che corrisponde alla determinazione diretta dell'mRNA)¹⁰³ e ipoteticamente riscontrabili in ogni tessuto. Assumendo che i livelli di mRNA corrispondano all'espressione della proteina, i più alti livelli recettoriali dovrebbero situarsi nel cieco, colon, vescica, seguiti da circolo sanguigno, polmoni, occhi e mastociti. Questi dati devono però essere valutati attentamente, sia perché potrebbe non esserci corrispondenza tra mRNA e proteina, sia perché si tratta di tessuti con un'ampia eterogeneità (Figura 10).

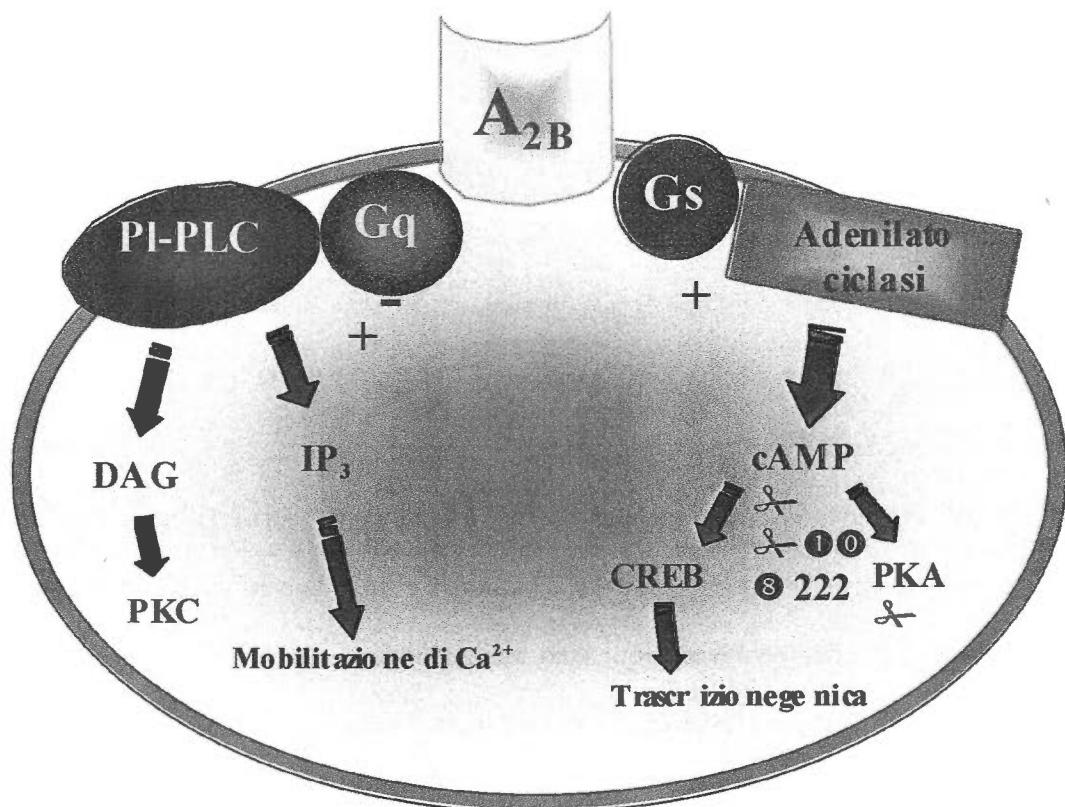


Figura 10. Meccanismi di trasduzione del segnale mediati dal recettore A_{2B} .

Il recettore A_{2B} stimola l'adenilato ciclasi mediante un accoppiamento diretto con proteine G_s intracellulari, comunque sono stati trovati altri meccanismi di trasduzione del segnale funzionalmente accoppiati a tale sottotipo. Un risultato della stimolazione dei recettori A_{2B} è l'accumulo di Ca^{2+} intracellulare, che sembrerebbe mediato da almeno due differenti meccanismi: l'accoppiamento con una proteina G_s che stimola l'adenilato ciclasi con conseguente aumento dei livelli di cAMP. Questo provoca un potenziamento dei canali del Ca^{2+} di tipo P, l'attivazione di una proteina chinasi A (PKA, che altera l'attività di proteine bersaglio fosforilando i loro residui di treonina e serina), e la stimolazione della trascrizione genica; oppure l'accoppiamento con un sistema fosfatidilinositolo-proteina lipasi C (PI-PLC) mediante una proteina della famiglia G_q . L'attivazione di questa via porta ad un aumento del diacilglicerolo (il quale attiva la PKC) e dell' IP_3 (che provoca una mobilizzazione del Ca^{2+}). Inoltre, la via di trasduzione del segnale dei recettori A_{2B} può essere modulata dall'interazione con altri sistemi recettoriali: ad esempio, agenti che aumentano il livello di Ca^{2+} intracellulare o che attivano la PKC potenziano la produzione di cAMP A_{2B} -mediata in varie cellule.¹⁰⁴

E' interessante notare che le vie di trasduzione intracellulari, collegate al recettore A_{2B} , hanno molto in comune sia con quelle dei recettori A_1 e A_3 (attivazione della fosfolipasi C) che con quelle del recettore A_{2A} (attivazione dell'adenilato ciclasi). Sfortunatamente, la mancanza di agonisti e antagonisti selettivi del recettore A_{2B} ha precluso la caratterizzazione farmacologica di tale sistema recettoriale, e resta ancora da chiarire se i meccanismi qui descritti appartengano a tutti i tipi di cellule che esprimono il recettore A_{2B} . Nonostante i recettori A_{2B} siano molto diffusi nel SNC, non si hanno a disposizione molte informazioni riguardanti la loro funzione. E' stato dimostrato che gli agonisti adenosinici aumentano il rilascio di amminoacidi eccitatori e di acetilcolina e che deprimono il GABA nella corteccia cerebrale di ratto, e sembrerebbe che il profilo dell'agonista sia indicativo per un evento A_{2B} -mediato.¹⁰⁵

Alti livelli di espressione del recettore A_{2B} sono stati trovati in diverse parti del tratto

intestinale e recentemente sono stati fatti degli studi riguardanti l'azione dei recettori A_{2B} sulle cellule della *mucosa gastrica*.¹⁰⁶

Ci sono alcune prove a favore del fatto che i recettori A_{2B}, che risiedono sui *mastociti*, siano coinvolti nei processi infiammatori come l'asma.¹⁰⁷ Questo ha portato ad un grosso sforzo nella ricerca, volto a trovare antagonisti A_{2B} selettivi quali potenziali antiasmatici.¹⁰⁸

Molteplici sono i potenziali impieghi terapeutici in corso di studio, sebbene il trattamento dell'asma sia il target maggiormente studiato.¹⁰⁹

Molti articoli attribuiscono agli A_{2B} effetti *cardiovascolari*; infatti la stimolazione di questi recettori, da parte dell'adenosina endogena o da parte di un agonista esogeno, può provvedere a importanti meccanismi di controllo a livello: a) della proliferazione fibroblastica;¹¹⁰ b) del ripristino cardiaco; c) di patologie cardiache quali ipertensione o infarto miocardico.¹¹¹

1. 2. 3. a. A_{2B} Agonisti

E' stato osservato che l'adenosina inibisce la produzione, da parte dei monociti, del fattore α di necrosi tumorale (TNF- α); questo avviene a concentrazioni relativamente alte del ligando, suggerendo l'implicazione di un recettore a bassa affinità, l'A_{2B} appunto, anche se la produzione di tale fattore sembra comunque influenzata anche dal recettore A₃ attraverso un meccanismo cAMP-indipendente. TNF- α è una citochina pro-infiammatoria che innesca l'attivazione a cascata delle altre citochine.¹¹² Quando viene prodotto in grandi quantità (per esempio quando il sistema immunitario è iper stimolato in risposta ai batteri patogeni) il TNF- α può portare a shock settico ed eventualmente a morte.¹¹³

Una futura proposta terapeutica per gli agonisti dei recettori A_{2B} può essere proprio rappresentata dal trattamento dello shock settico.

Sembra che il gruppo NH₂ dell'adenosina, il cui scheletro deve rimanere pressoché inalterato per garantire l'azione agonista, sia in grado di accomodare gruppi piuttosto ingombranti, senza comprometterne l'attività; questo fa ipotizzare che esista uno spazio nel recettore a tale

livello. Purtroppo non è stato ancora trovato un agonista potente e selettivo verso questo recettore; il migliore rimane il NECA (15) ($EC_{50}=3.1 \mu\text{M}$), la cui sostituzione in 5' con un gruppo N-ciclopropilcarbrossammidico (NCPCA, 34) ha portato un' EC_{50} pari a $5.3 \mu\text{M}$ ¹⁴ (Figura 11).

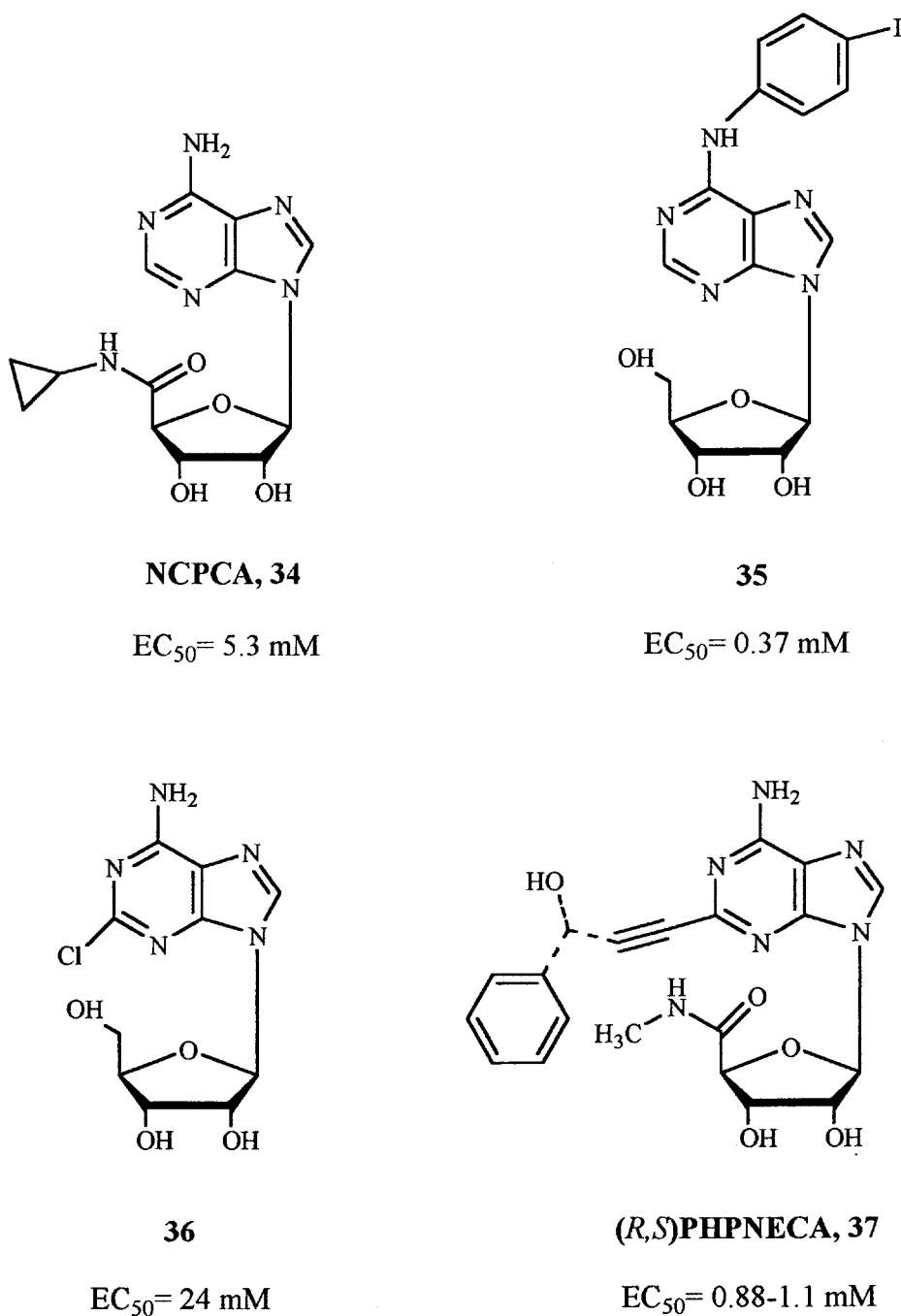


Figura 11. A_{2B} agonisti

Adenosine N⁶-sostituite

Mentre la mono-sostituzione del gruppo amminico in 6 è ancora tollerata (il derivato N⁶-metil-sostituito ha una EC₅₀=19 μM), la sua disostituzione deprime l'attività; l'agonista, selettivo A₁, N⁶-ciclopentiladenosina (CPA, 2) mostra bassa affinità verso A_{2B}, mentre l'analogo N⁶-(R)-fenilisopropil (R-PIA, 4) è più potente. La sostituzione, sull'anello aromatico, con alogeni, metile, metossi o etile, spesso incrementa l'affinità nell'ordine di potenza 4 > 2 > 3; in particolare la 4-iodiofeniladenosina, 35, è risultata essere il composto più potente della serie (EC₅₀=0.37 μM), migliore anche di NECA.¹¹⁵

Adenosine 5'- e N⁶-disostituite

Non sempre la doppia sostituzione porta ad un incremento in termini di potenza, come pure le modifiche a livello di ribosio.

Adenosine 2-sostituite

Una sostituzione a tale livello in genere non è ben tollerata; solo la 2-cloroadenosina, 36, indica un profilo discreto (EC₅₀= 24 μM).

Tuttavia, l'introduzione in 2 di catene alchiniliche variamente sostituite, ha permesso di ottenere derivati interessanti, come il racemo 2-fenilidrossipropilNECA ((R,S)PHPNECA, 37), con un'EC₅₀ compresa nel range 0.88-1.1 μM; la presenza di un -OH in α al triplo legame sembra essere importante per l'attività in quanto, se messo in β, ne riduce la potenza.¹¹⁶

In conclusione, sembrano esserci due siti, suscettibili di modifica, per aumentare la potenza di eventuali agonisti: le porzioni 5' ed N⁶ dell'adenosina.

1. 2. 3. b. A_{2B} Antagonisti

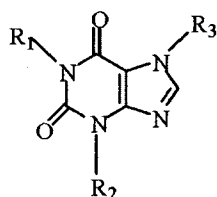
Recentemente Fiebich *e al.*, hanno dimostrato che NECA induce un incremento sia dell'mRNA sia della sintesi di una citochina, l'interleuchina-6 (IL-6), prodotta nelle cellule dell'astroglioma umano. L'evidenza di questo aumento suggerisce che l'IL-6 può rivestire un ruolo importante nelle fasi infiammatorie del morbo di Alzheimer.¹¹⁷ Gli antagonisti dei recettori A_{2B} potrebbero coadiuvare il controllo dei livelli di IL-6 e quindi trovare impiego nelle fasi iniziali del morbo di Alzheimer.

Inoltre, in una recente pubblicazione, è stato dimostrato, sulla base del profilo farmacologico *in vivo* degli agonisti (NECA > CGS21680) su topi geneticamente diabetici, che i recettori A_{2B} mediano l'antagonismo della produzione di glucosio epatico (indotta da adenosina)¹¹⁸ con una potenza comparabile all'antagonismo nei confronti dell'accumulo di cAMP, sempre mediato da NECA; gli antagonisti A_{2B} potrebbero perciò divenire nuovi farmaci per il trattamento di questa patologia metabolica.

Xantine

Le alchilxantine sono gli antagonisti classici dei recettori adenosinici e hanno dimostrato una certa affinità anche per i sottotipi A_{2B} . Le xantine naturali, quali la teofillina (38) e la caffeina (39), presentano valori di K_i pari a 9.07 e 10.4 μM , rispettivamente. La disostituzione del gruppo metilico in posizione 1 e 3 della teofillina con propili, come nella dipropilxantina (40), aumenta l'affinità di circa 15 volte.¹¹⁹ La presenza di un solo gruppo propilico in posizione 3, come nella emprofillina (41), risulta 2 volte più affine ai recettori A_{2B} rispetto alla teofillina, mentre la 1-metilemprofillina (42) è più potente rispetto all'emprofillina stessa.

Inoltre, l'introduzione di un sostituito in posizione 8 aumenta l'affinità per gli A_{2B}; in effetti l'antagonista selettivo A₁, l'8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (**DPCPX**, **6**) è molto potente anche nel legame verso gli A_{2B} (**Figura 12**).



teofillina, 38

R₁=R₂=-CH₃
R₃=-H

caffaina, 39

R₁=R₂=R₃=-CH₃

dipropilxantina, 40

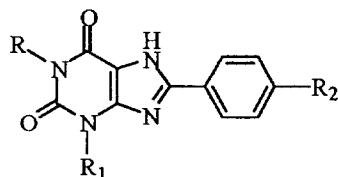
R₁=R₂=-C₃H₇;
R₃=-H

emprofillina, 41

R₁=-H;
R₂=-C₃H₇;
R₃=-H

1-metilemprofillina, 42

R₁=-CH₃;
R₂=-C₃H₇;
R₃=-H



1-propil-8-p-bromofenilxantina, 43

R = -C₃H₇; R₁ = -H; R₂ = -Br;

PBS 1115, 44

R = -C₃H₇; R₁ = -H; R₂ = -SO₃H;

Figura 12. A_{2B} antagonisti xantini.

In particolare, la presenza di un gruppo fenilico in posizione 8 (**5**) dimostra un'affinità nettamente superiore, purché le posizioni 1 (ed eventualmente 3) non siano libere, con un ordine di potenza: 1-propil > 1-butil > 1-etil.¹²⁰ Eppure la selettività della 1-propil-8-*p*-bromofenilxantina (**43**), con posizione 3 libera, diminuisce, mentre l'introduzione in questa posizione di sostituenti polari, che conferiscono una certa solubilità in acqua, diminuisce leggermente l'affinità ma incrementa la selettività. Infatti, l'analogo polare carbossifenilico e quello *p*-solfofenilico **PBS1115** (**44**) possiedono una buona selettività, dimostrando che la sostituzione in N-1 e non nella posizione N-3 è importante per l'alta affinità con i recettori

A_{2B}, e che le xantine 1,8-disostituite e aventi la posizione 3 inalterata risultano essere più selettive per questi recettori rispetto agli analoghi 3-sostituiti.

Non Xantinici

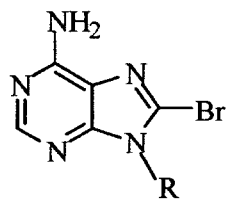
Adenine

La sostituzione del ribosio o di derivati del ribosio (presenti negli agonisti dei recettori adenosinici) con un gruppo alchilico, li trasforma nei rispettivi antagonisti non selettivi.

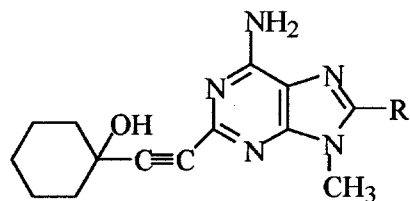
Nella serie delle 9-etiladenine-8-sostituite, la 8-bromo-9-etiladenina (**45**), risulta essere un potente antagonista per gli A_{2A} ed un buon antagonista dei recettori A_{2B}, con K_i= 840 nM nei saggi funzionali in cui viene valutata l'inibizione della stimolazione dell'adenilato ciclasi, mediata da NECA, nelle cellule di CHO presentanti il recettore adenosinico umano A_{2B}¹²¹ (**Figura 13**).

Inoltre la sostituzione del gruppo etilico in N-9 con un gruppo metilico (**46**) innalza ulteriormente la potenza verso gli A_{2B} e decresce l'affinità verso tutti gli altri recettori adenosinici, rimanendo comunque selettivo per gli A_{2A}.

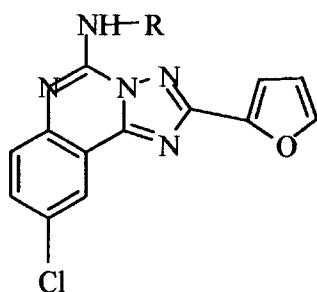
Interessante è la serie delle 2-alchinil-8-aril-9-metiladenine (**47, 48**)¹¹⁸ preparate come agenti ipoglicemici, che presentano elevata potenza per gli A_{2B} in un range nanomolare, e una IC₅₀ tra 14 e 23 nM. Da questi dati è possibile predire che la sostituzione del metile in N-9 dei derivati adeninici, con gruppi alchilici, potrebbe portare a potenti e selettivi antagonisti A_{2B}.



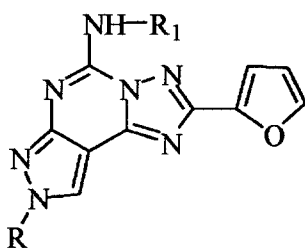
R = -C₂H₅, **45**
 R = -CH₃, **46**



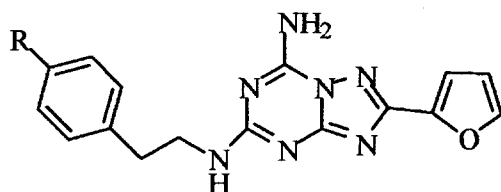
R = 2-furil, **47**
 R = -3F-C₆H₅, **48**



R = -H, **CGS15943**, **27**
 R = - CO-(CH₂)₃ -NH₂, **49**
 R = - CO-C(CH₃)₃, **50**
 R = - CO-O-C(CH₃)₃, **51**



R = -(CH₂)₂-CH(CH₃)₂ R₁ = -H, **52**
 R = -(CH₂)₂-Ph R₁ = -H, **53**



R = -OH, **ZM241385**, **33**
 R = -H, **54**

Figura 13. A_{2B} antagonisti non xantini

CGS 15943 e analoghi

L'antagonista selettivo degli A_{2A}, il 5-ammino-9-cloro-2-(2-furil)1,2,4-triazolo[1,5-c]chinazolina (**CGS 15943**, **27**) dimostra una IC₅₀ di 1.2 µM verso gli A_{2B} nei saggi funzionali, ed una K_i di 16.4 nM in quelli di binding.¹²²

Gli analoghi N⁵-sostituiti (**49-51**) sono stati sintetizzati al fine di individuare antagonisti selettivi A_{2B}; infatti la γ-amminobutirilammide (**49**) mostra accresciuta potenza verso gli A₁, A_{2A}, A_{2B}, mentre i derivati N⁵-pivaloilici (**50**) e N⁵-Boc-sostituiti (**51**) evidenziano bassa potenza verso gli A_{2B}, e alta affinità verso A₁, A_{2A} e A₃.

Pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine

Lo studio di una serie di pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine, che presentano sull'anello pirazolico in posizione 5 un gruppo amminico libero e in posizione 8 un gruppo isopentilico (**52**) o feniletilico (**53**), ha evidenziato che questi composti possiedono alta affinità per i recettori A_{2B}, sebbene non siano selettivi.¹²³

Questi dati indicano che il gruppo amminico libero in posizione 5 è importante per l'alta affinità recettoriale verso gli A_{2B} mentre la sostituzione, in differenti posizioni, del nucleo pirazolico, porta a potenti e selettivi antagonisti per questo sottotipo recettoriale.

ZM 241385 e analoghi

L'antagonista selettivo A_{2A}, lo **ZM 241385** (**33**), si è rivelato utile per la sintesi di composti dotati di un buon profilo di binding verso il sottotipo A_{2B}; infatti l'eliminazione del gruppo idrossilico in posizione *para* del capostipite, ha consentito di ottenere derivati più potenti (**54**).¹²⁴

1. 2. 4. Recettori adenosinici A₃

L'attivazione di tale sottotipo determina:

-stimolazione di fosfolipasi C e D (tramite accoppiamento con Gq);^{125, 126}

-inibizione di adenilato ciclasi (attraverso l'accoppiamento con Gi), con conseguente riduzione dei livelli di cAMP;

-rilascio di mediatori dell'infiammazione (es. istamina da mastociti)¹²⁷. In particolare, nelle cellule basofile leucemiche e negli eosinofili umani, l'attivazione del recettore A₃ comporta il rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari seguito dal suo recupero, mentre, in cellule dell'epitelio cigliare umano, tale attivazione sembra regolare i canali del cloro.

L'mRNA di A₃ è espresso a livello di testicolo, rene, placenta, cuore, cervello, milza, fegato, utero, vescica, colon prossimale e occhio di ratto, pecora e uomo, mentre non è stato rilevato nella pelle o nel muscolo scheletrico di topo²³. Nel ratto i testicoli sembrano presentare una concentrazione piuttosto alta, nell'uomo i livelli più elevati si osservano in polmone e fegato e quelli più bassi in aorta e cervello. Nella pecora, infine, si ha la maggiore concentrazione nel polmone, nella milza e nella ghiandola pineale.¹²⁸

A livello del sistema nervoso centrale l'adenosina ha potenti attività sedativo-ipnotiche, anti-convulsivanti ed anti-ansia; inoltre è uno dei più potenti inibitori dell'esocitosi presinaptica, in particolare di catecolamine, acetilcolina e amminoacidi eccitatori. La capacità dell'adenosina di inibire la scarica neuronale può essere importante per lo sviluppo di agenti antiepilettici e sembra essere mediata da recettori A₁ e A₃¹²⁹ (Tabella 6).

Sempre a tale livello, l'adenosina interviene in numerose patologie neurodegenerative come l'ictus cerebrale. Il recettore A₃ sembra possedere un ruolo molto importante nella genesi dei danni provocati dall'ischemia cerebrale: infatti l'attivazione ischemica dei recettori NMDA del glutammato, provoca il rilascio di adenosina che raggiunge la concentrazione extracellulare di circa 40 μM, sufficiente ad attivare i recettori A₃.¹³⁰

Questa attivazione annulla gli effetti neuroprotettivi esercitati dal recettore A_1 e potenzia la corrente di Ca^{2+} intracellulare attraverso un meccanismo dipendente dalla proteinchinasi A (PKA).¹³¹

I recettori A_3 , benché partecipino all'attivazione della fosfolipasi D necessaria per l'attività fagocitica dei neutrofilo e alla produzione dei radicali dell'ossigeno, non sono coinvolti nei processi di infiammazione post-ischemica, responsabili dei danni da ri-perfusione. Inoltre, in numerosi modelli di ischemia, è stato osservato che la pre-somministrazione intracerebrovascolare cronica di un agonista selettivo A_3 (IB-MECA, 55) produce un notevole effetto neuroprotettivo (postischemico), mentre la somministrazione acuta di alte dosi dello stesso agonista durante l'attacco ischemico aumenta i danni istologici e funzionali.¹³²

Gli effetti opposti provocati dalla somministrazione cronica e acuta dell'agonista IB-MECA, possono essere spiegati ipotizzando che la morte cellulare mediata dall'adenosina, durante un attacco ischemico, abbia lo scopo di isolare le aree maggiormente danneggiate e favorire quelle regioni cerebrali che possiedono ancora dei margini di recupero funzionale, sebbene permangano "paradossali" evidenze sperimentali in modelli di ischemia cerebrale.¹³³

Attraverso l'interazione con i recettori A_3 , l'adenosina esercita un ruolo cardioprotettivo indotto da un periodo di ischemia breve seguito da uno più sostenuto, fenomeno chiamato "ischemic preconditioning". Quindi, quando il cuore subisce un attacco ischemico, diventa resistente al successivo, grazie alla produzione di adenosina: essa va ad attivare i recettori A_3 presenti a livello delle cellule ventricolari cardiache, proteggendole. Infatti l'agonista selettivo A_3 (IB-MECA) somministrato in basse concentrazioni (nM), conferisce una potente protezione verso i danni reversibili e irreversibili di un attacco ischemico acuto.¹³⁴ Ulteriori studi hanno dimostrato che nelle cellule ventricolari cardiache, l'"ischemic preconditioning" viene determinato dall'attivazione di entrambi i recettori adenosinici A_1 e A_3 . Infatti le cellule

atriali cardiache, che mancano del recettore A_3 , mostrano una cardioprotezione meno prolungata rispetto alle cellule ventricolari che possiedono entrambi i recettori.

Agonisti A_3 in basse concentrazioni possono essere potenzialmente utilizzati a scopo terapeutico, come agenti cardioprotettivi.

E' necessario sottolineare la discrepanza tra gli effetti che la somministrazione di agonisti A_3 selettivi (IB-MECA) provoca nell'ischemia cardiaca e cerebrale. Come precedentemente osservato, basse concentrazioni di IB-MECA conferiscono una potente protezione verso i danni causati dall'ischemia del miocardio, mentre provocano un peggioramento dei danni istologici e funzionali dell'ictus. Perciò, l'impiego di agonisti A_3 selettivi per proteggere il cuore dall'infarto, necessita di numerose cautele.

A livello dell'apparato respiratorio l'adenosina induce broncocostrizione quando viene inalata dai pazienti asmatici ma non provoca nessun effetto negli individui normali.¹³⁵

Nei polmoni sono stati inoltre riscontrati alti livelli di recettori A_3 negli eosinofili. In questa sede essi sembrano mediare l'inibizione della degranulazione e della liberazione di radicali liberi dell'anione superossido, suggerendo che agonisti A_3 selettivi possano essere indicati come inibitori di stati infiammatori di tipo allergico incluso l'asma.¹³⁶

Proprietà antitumorali sono state attribuite al recettore A_3 , la cui attivazione sembra ridurre l'adesione dei linfociti citotossici alle cellule tumorali.¹³⁷

E' stato recentemente dimostrato che gli antagonisti determinano apoptosi in cellule leucemiche umane HL-60 e in cellule di linfoma U-937. Invece, basse concentrazioni (nM) dell'agonista A_3 selettivo **CI-IB-MECA (56)**, proteggono le cellule dalla morte indotta dagli antagonisti.¹³⁸

Negli ultimi anni, Fishman e collaboratori¹³⁹ hanno dimostrato la capacità dell'adenosina di inibire la crescita cellulare del linfoma interagendo con i recettori A_3 presenti sulla superficie delle cellule tumorali. Infatti, basse concentrazioni (5-25 μ M) di adenosina o di agonisti A_3

(IB-MECA), inibiscono la proliferazione delle cellule tumorali attraverso un effetto citostatico, che consiste nell'arresto del ciclo cellulare alla fase G₀/G₁. Al contrario, la somministrazione di adenosina ad alte dosi (100-200 μ M) determina la morte cellulare per apoptosi. Questo effetto, nelle cellule tumorali del linfoma, viene indotto dal trasporto attivo dell'adenosina a livello intracellulare, mediato da un trasportatore di nucleosidi.

SNC	Neuroprotezione Attività sedativo-ipnotiche, anticonvulsivanti ed anti-ansia; Inibizione dell'esocitosi presinaptica
Sist. respiratorio	Broncospasmo Inibizione di degranolazione
Sist. cardiovascolare	Cardioprotezione: "ischemic preconditioning" Effetto anticoagulante Ipotensione
Sist. immunitario	Protezione cellulare(basse dosi) Effetto pro-apoptotico(alte dosi)

Tabella 6. Effetti mediati dal recettore A₃ in vari sistemi

Non è chiaro se l'apoptosi sia causata dall'attivazione diretta dei recettori adenosinici, che sono presenti sulla superficie cellulare, anche se al momento sembra plausibile che agonisti A₃ selettivi possano avere un importante impiego terapeutico come inibitori della crescita delle cellule tumorali e della formazione delle metastasi.

1. 2. 4. a. A₃ Agonisti

Il valore di K_i dell'adenosina endogena, per il recettore A₃, è relativamente alto, nel range micromolare; si tratta di un'affinità molto bassa, se paragonata ai 10-100 nM per A₁ e A_{2A}, ma che può essere spiegata dall'importanza di un suo metabolita: l'inosina, che in condizioni particolari (infiammatorie o ischemiche) raggiunge livelli affatto trascurabili, facendo dubitare che il ligando endogeno, per il recettore A₃, non sia effettivamente l'adenosina. Di

fatto, comunque, l'inosina si presenta come debole full agonist sui recettori di ratto, ma è solo un agonista parziale sui corrispondenti umani.¹⁴⁰

Adenosine N⁶-e 5'-disostituite

E' noto che gli agonisti¹⁴¹ sono strettamente correlati alla struttura dell'adenosina stessa (**Figura 14**); in particolare risulta evidente l'importanza della funzione ribosidica per l'attività di questi derivati, sebbene sostituzioni in N6 e 5' sembrano essere efficaci nel migliorare affinità e selettività verso questo sottotipo recettoriale.¹⁴²

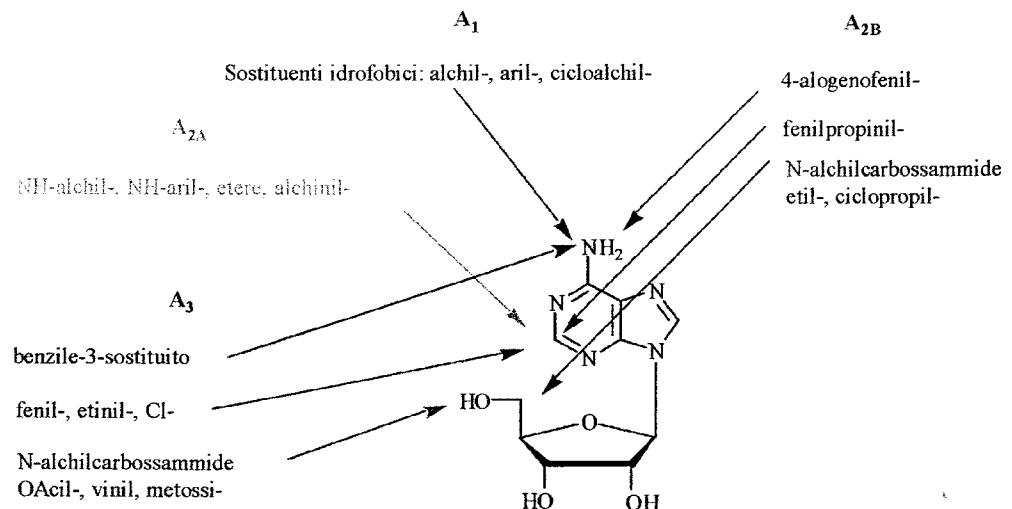


Figura 14. Adenosine modificate

Infatti, Jacobson ha proposto una serie di N6-benziladenosine-5'-uronammidi, dimostrando come la selettività aumenti nell'ordine N-Metil > N-etil = non-sostituito > N-ciclopropil; il sostituito 5'-(N-metilcarbrossiammido) conferisce una superiore selettività e affinità verso i recettori A₃, ed inoltre è stato dimostrato che la sostituzione, nella catena N⁶-benzilica in posizione 3, con gruppi voluminosi è ottimale, suggerendo che gli effetti sterici prevalgano su quelli elettronici.¹³³

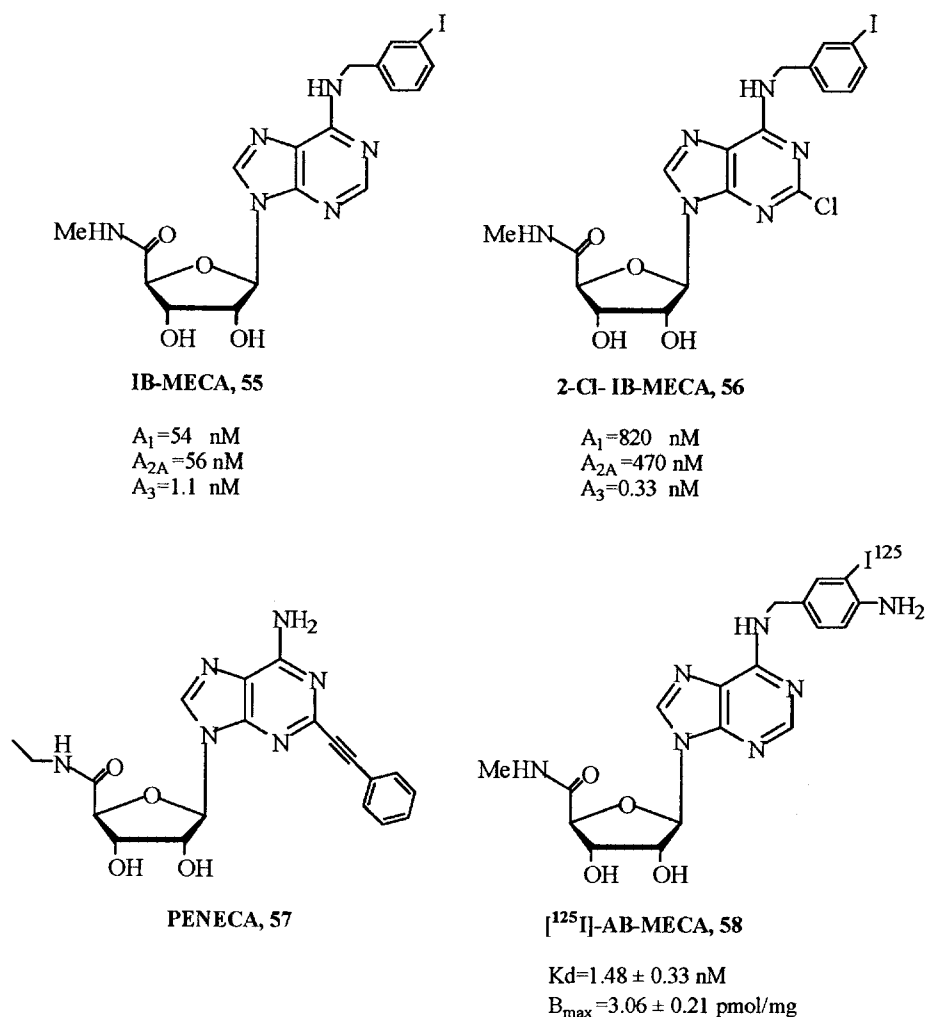


Figura 15. A_3 agonisti non xantinnici

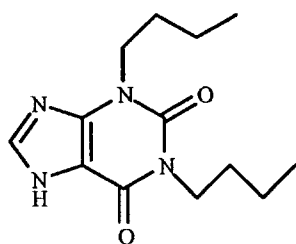
Questo studio ha portato all'identificazione dell'agonista **IB-MECA (55)**, e, successivamente, al **2-Cloro-IB-MECA (56)**, ancora più affine e selettivo ($K_i = 0.33 \text{ nM}$ su rA_3), indicando come sia possibile ottenere un ulteriore miglioramento con l'introduzione, in posizione 2, di sostituenti come alogeni, metil-ammine e gruppi tiometilici.^{143, 144}

A questi va aggiunto un derivato interessante: **PENECA (57)**, in cui un triplo legame, coniugato al fenile, incrementa l'affinità verso A_3 .

In seguito fu anche sintetizzato il radioligando [¹²⁵I]-**AB-MECA (58)**, affine e selettivo verso il recettore di ratto¹⁴⁵ (Figura 15).

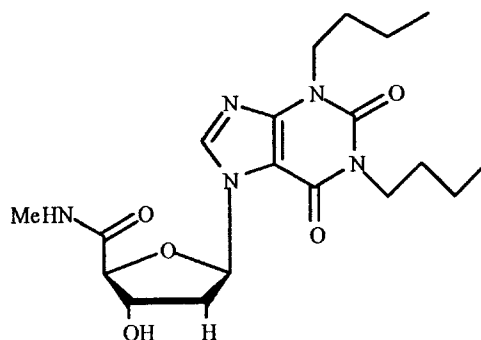
Derivati xantinici

Per quanto riguarda i derivati xantinici risulta importante, per l'affinità col recettore A_3 , la sostituzione in N^1 e N^3 con catene butiliche (59).^{146, 147}



59

$A_1 = 500$ nM
 $A_{2A} = 29,300$ nM
 $A_3 = 143,000$ nM



60

$A_1 = >7,300$ nM
 $A_{2A} = 19\%$ (10^{-4} M)
 $A_3 = 229$ nM

Figura 16. A_3 agonisti xantinici

Anche in questo caso la presenza del sostituente ribosidico è indispensabile per l'affinità con i recettori A_3 (60).

Tali composti, comunque, legando praticamente tutti i sottotipi recettoriali, non sono selettivi (Figura 16).

1. 2. 4. b. A_3 Antagonisti

Contrariamente agli agonisti, i composti in grado di inibire selettivamente il recettore A_3 sono strutturalmente diversi dall'adenosina (Tabella 7), e di solito legano il sottotipo recettoriale umano ma non quello di ratto, o viceversa. L'unica eccezione, in tal senso, è rappresentata dalle (ar)alchiniladenosine (61) in cui il ribosio, caratteristico degli agonisti, è comunque in

grado di conferire una certa potenza inibente.¹⁴⁸ Nel complesso, gli antagonisti sono stati suddivisi in alcune classi, come riportato di seguito.

	hA₁ (nM)	hA_{2A} (nM)	hA_{2B} (nM)	hA₃ (nM)
<i>(AR)ALCHILADENOSINE, 61</i>	1,280	600	>100,000	86
<i>PSB-11, 62</i>	4,080	3,270	(m)3,100	2.34
<i>MRS 1220, 63</i>	(r)305	(r)52		0.65
<i>64</i>	(b)90	(b)20,000		1.47
<i>VUF 5574, 65</i>	(r)10,000	(r)10,000		4
<i>VUF 5455, 66</i>				1,680
<i>MRS 1334, 67</i>	(r) >100,000	(r)>100,000		2.69

Tabella 7. A₃ antagonisti

Xantine

Tali derivati, strutturalmente correlati agli alcaloidi naturali caffeina e teofillina, sono praticamente inattivi sul ratto. Tuttavia, l'8-fenilxantina (**5**) è in grado di incrementare l'affinità, anche se verso tutti i recettori adenosinici.

Inoltre, sembra che l'ulteriore sostituzione, in 1 e 3, con catene alchiliche (in particolare con il propile) migliori il binding verso l'hA₃, pur non consentendo di ottenere una corrispondente potenza.¹⁴⁹

Imidazo[2,1-i]purin-5-oni

Questi composti, sostituiti in posizione 2 con un fenile, conferiscono anche una buona solubilità in acqua, grazie all'azoto basico che si può protonare in condizioni fisiologiche.¹⁵⁰

La metilazione in N4 (che corrisponde alla posizione N3 nelle xantine) sembra essere più sfavorevole, per gli A₁, rispetto alla propilazione; si osserva esattamente il contrario sugli A₃, che si differenziano anche per una preferenza per l'enantiomero (*R*) indicando, in tal modo, una discreta selettività (**PBS 11, 62**) (**Figura 17**).

In realtà, tali derivati si sono rivelati “inverse agonists” in studi di binding effettuati su recettori umani espressi su cellule CHO.¹⁵¹

Triazolochinazoline

Il derivato CGS 15943 (27), originariamente designato come antagonista A₁/A_{2A}, è in grado di legare anche il sottotipo umano A₃ (non quello di ratto, però) con buona affinità. Inoltre la sua acilazione sul gruppo amminico libero, ha portato ad un composto molto affine, l'MRS1220 (63, 5-fenilacetil-ammino-9-cloro-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[1,5-c]chinazolina), ma non altrettanto selettivo.^{152, 153}

Triazolochinossaline e pirazolochinoline

I composti evidenziano una similitudine strutturale con l'adenina; l'introduzione di un gruppo carbonilico, come accettore di legami idrogeno, sembra essenziale,(64), mentre è possibile modulare l'affinità mediante sostituzione dell'anello 2-fenilico, possibilmente con p-metil, p-metossi o p-cloro.⁴⁷

Isochinoline e Chinazoline

In uno screening effettuato su composti eterociclici, è stato osservato che il nucleo 3-(2-piridil)isochinolinico mostrava blanda affinità per il recettore umano A₃.

Mediante l'introduzione di catene benzoilamminiche in posizione 1, è stato ottenuto un derivato dotato di una discreta affinità e selettività per il recettore umano A₃ (VUF 5574, 65). Analogamente, bioisosteri di tipo chinazolinico mostrano un profilo biologico altrettanto interessante anche se recentemente hanno evidenziato un profilo di modulatori allosterici(enhancer) (VUF-5455, 66).¹⁵⁴

1,4-Diidropiridine e piridine

Questo gruppo deriva dai bloccanti dei canali del calcio di tipo L; molte diidropiridine legano i recettori A₁ nel cervello di ratto perciò, grazie alla similitudine con gli A₃, mediante l'introduzione di gruppi stericamente ingombranti nelle posizioni 4 e 5 sono stati ottenuti derivati con buona affinità e selettività nei confronti del recettore umano A₃.

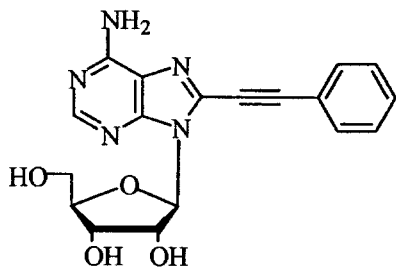
Tra questi, il derivato 2-etil-4-propil-3(etilsolfonilcarbonil)-5-propilossicarbonil-6-fenilpiridina (**MRS 1523**) rappresenta l'unico esempio di antagonista che, pur evidenziando un'ottima affinità verso il sottotipo umano A_3 , è comunque in grado di legare anche il recettore di ratto, con un rapporto di Ki_{rA_3}/Ki_{hA_3} pari a 22 ($Ki_{rA_1}=15,600$ nM; $Ki_{rA_{2A}}=2,050$ nM; $Ki_{rA_3}=113$ nM; $Ki_{hA_3}=18.9$ nM); questo, ovviamente, sembra un buon punto di partenza di tool farmacologici per gli studi *in vivo*, al fine di definire in dettaglio il ruolo fisiologico dei recettori A_3 .

Flavonoidi

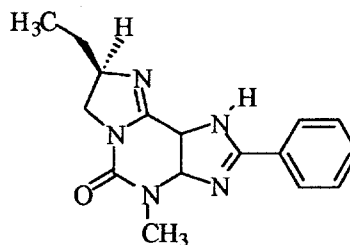
Studi effettuati su fitofarmaci hanno portato all'analisi di tali composti quali potenziali antagonisti dei recettori A_3 . Diverse modifiche sono state effettuate su tali nuclei, con particolare riguardo agli ossidrili, i quali non sembrano essere indispensabili ai fini della attività.¹⁵⁶

Purtroppo tali composti sono risultati inefficaci nel modello di ratto a causa della grande differenza di specie.

Va comunque precisato che nessuno tra i composti appena visionati, pur evidenziando buone affinità o selettività per il recettore A_3 , possiede entrambe le caratteristiche.

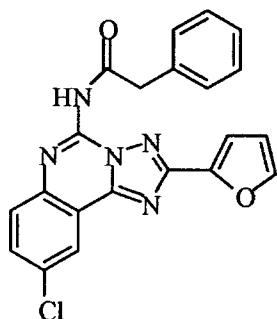


(ar)alchiladenosine, 61

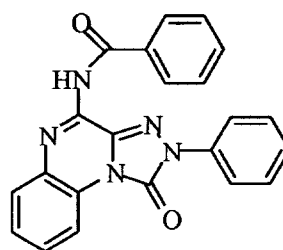


PSB-11, 62

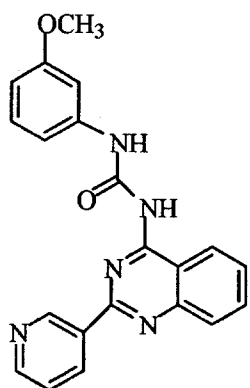
$rA_3 > 10,000 \text{ nM}$



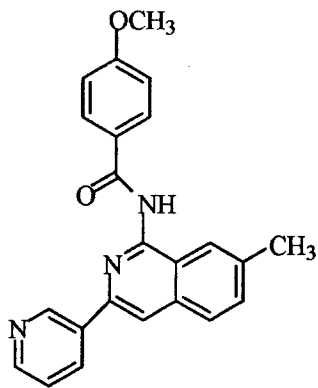
MRS 1220, 63



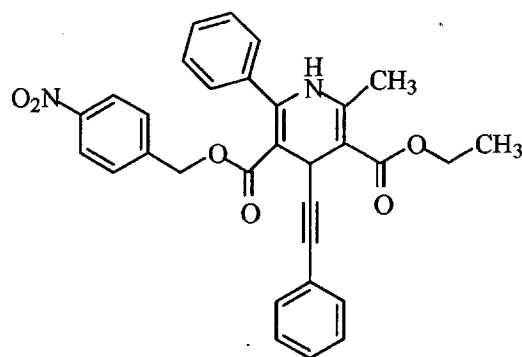
64



VUF 5574, 65



VUF 5455, 66



MRS 1334, 67

$rA_3 = 3,850 \text{ nM}$

Figura 17. A_3 antagonisti

Pirazolo-triazolo-pirimidine

Il nostro gruppo di ricerca da anni si occupa dello sviluppo di 5-ammino-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine¹⁴² con un furano in posizione 2, un piccolo gruppo alchilico (metile, etile...) in N8 ed una catena arilcarbamoilica in N5, allo scopo di ottenere antagonisti, verso il recettore umano A₃, sempre più potenti e selettivi.

La progettazione di questi derivati a struttura generale **68**, é basata sulla formazione di un ibrido molecolare (**Figura 18**) tra la catena fenilcarbamoilica, contenuta in A₃ agonisti (**69**) precedentemente riportati¹⁵⁷ e il nucleo della pirazolo-triazolo-pirimidina (**70**)⁹², caratteristico di una serie di A_{2A} antagonisti, strutturalmente correlati al CGS15943.

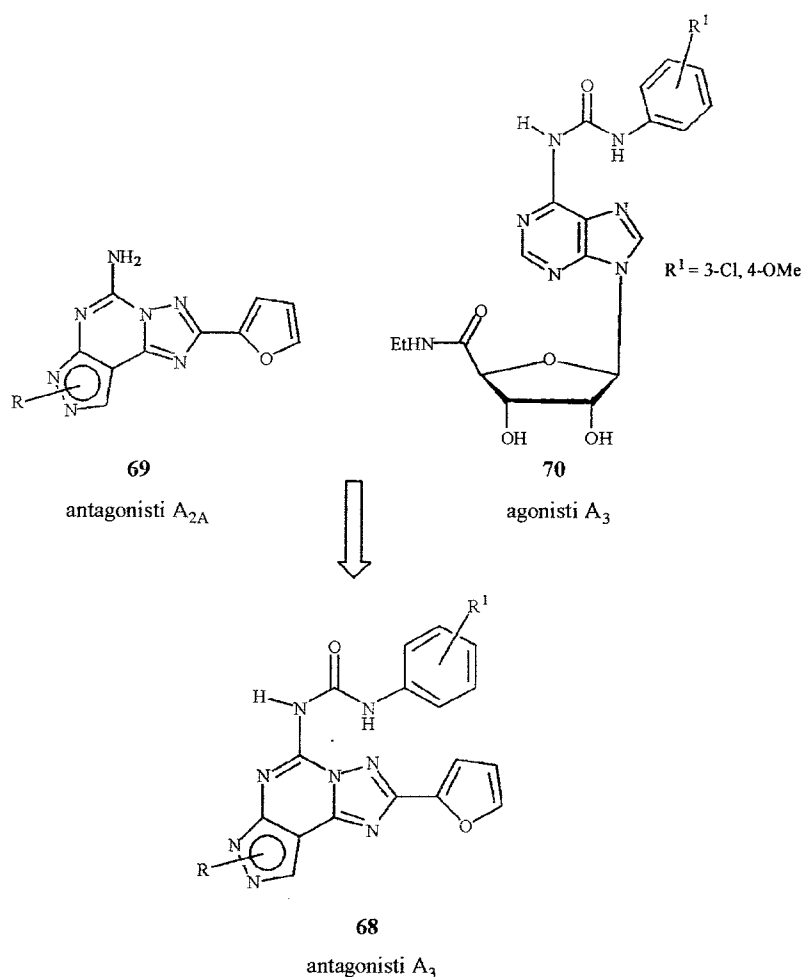


Figura 18. Razionale delle pirazolo-triazolo-pirimidine

Tali derivati (71-111, **Tabella 8**) sono praticamente inattivi sul ratto, mentre per il sottotipo umano si è visto che il sostituente ottimale in N8 è un metile (75); ciò è stato confermato, tra l'altro, da uno studio di QSAR classica (condotto dal Dottor Stefano Moro)¹⁵⁸, che ha consentito di ottenere una correlazione, lineare ma inversa, tra il valore di binding e il Volume molecolare del sostituente in tale posizione.

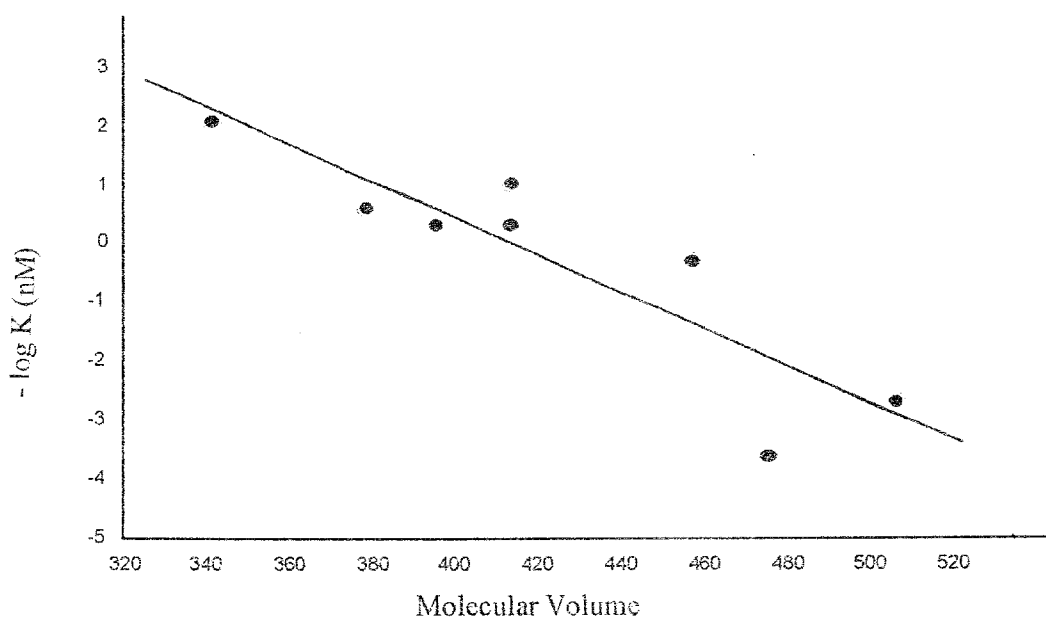


Figura 19. Correlazione lineare tra VM del sostituente in N8 e affinità

Come illustrato in **Figura 19**, e come precedentemente osservato, all'aumentare del volume e, quindi, dell'ingombro sterico, di tale gruppo, si assiste ad una concomitante riduzione di affinità. Logicamente, essendo presente una piccola cavità idrofobica attorno alla posizione 8, l'ingombro sterico di questa catena deve rispettare le dimensioni di tale tasca. Inoltre, estrapolando un modello del recettore umano A₃, basato sulla batteriorodopsina come

Tabella 8. Affinità di binding verso i recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati

Comp.	R	R ¹	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃
71	H	H	140 (123-160)	20 (17-24)	51 (44-58)	348 (267-453)	0.40	0.06
72	H	4-MeO-Ph-NHCO	448 (365-550)	520 (484-558)	350 (332-369)	0.14 (0.08-0.27)	3,200	3,715
73	H	3-Cl-Ph-NHCO	238 (179-317)	248 (218-283)	70 (61-80)	0.50 (0.34-0.73)	476	496
74	CH ₃	H	101 (81-127)	2.80 (2.40-3.55)	90 (81-101)	300 (265-339)	0.33	0.009
75	CH ₃	4-MeO-Ph-NHCO	1,097 (928-1,297)	1,390 (1,220-1,590)	261 (226-301)	0.20 (0.17-0.24)	5,485	6,950
76	CH ₃	3-Cl-Ph-NHCO	350 (323-378)	1,195 (1,024-1,396)	205 (157-268)	0.40 (0.24-0.64)	875	2,987
77	C ₂ H ₅	H	5.00 (4.05-6.20)	1.95 (1.70-2.10)	65 (56-75)	331 (285-385)	0.015	0.005
78	C ₂ H ₅	4-MeO-Ph-NHCO	1,026 (785-1,341)	1,040 (830-1,310)	245 (188-320)	0.60 (0.51-0.70)	1,710	1,733
79	C ₂ H ₅	3-Cl-Ph-NHCO	249 (215-289)	180 (160-210)	150 (107-210)	1.60 (1.42-1.79)	155	112
80	n-C ₃ H ₇	H	10 (7-14)	2.51 (1.90-3.37)	39 (35-45)	408 (364-460)	0.024	0.006
81	n-C ₃ H ₇	4-MeO-Ph-NHCO	1,197 (1,027-1,396)	140 (120-155)	2,056 (1,637-2,582)	0.80 (0.63-0.1.00)	1,496	175
82	n-C ₃ H ₇	3-Cl-Ph-NHCO	30 (23-40)	1,220 (880-1,682)	57 (50-63)	0.91 (0.85-0.98)	33	1,340
83	CH ₂ -CH=CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	1,531 (1,354-1,372)	176 (150-207)	2,030 (1,770-2,327)	0.48 (0.32-0.74)	3,189	366
85	n-C ₄ H ₉	4-MeO-Ph-NHCO	296 (269-326)	80 (65-92)	303 (260-352)	0.32 (0.27-0.34)	925	250
86	n-C ₄ H ₉	3-Cl-Ph-NHCO	245 (213-281)	95 (70-130)	70 (56-89)	0.60 (0.52-0.68)	408	158
87	t-C ₄ H ₉	H	175 (134-229)	45 (36-55)	400 (343-468)	1,149 (1,061-1,245)	0.15	0.04
88	t-C ₄ H ₉	4-MeO-Ph-NHCO	796 (632-1,003)	545 (461-645)	1,715 (1,531-1,920)	0.80 (0.63-1.00)	995	681

Comp.	R	R ¹	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃
89	t-C ₄ H ₉	3-Cl-Ph-NHCO	1,015 (885-1,163)	796 (632-1,003)	450 (432-469)	2.78 (2.13-3.62)	365	286
52	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂	H	2.00 (1.72-2.36)	0.78 (0.60-1.00)	9.1 (7.4-11.3)	700 (664-738)	0.002	0.001
90	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ - CH ₂ -	4-MeO-Ph-NHCO	175 (149-204)	65 (47-78)	54 (45-64)	30 (23-40)	5.8	2.16
91	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	100 (83-120)	115 (85-164)	61 (55-68)	40 (33-48)	2.5	2.87
92	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂	H	5.42	(4.72-6.23)	0.80	(0.65-1.06)	12	(8-18)
93	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	300 (254-356)	1,025 (850-1,230)	58 (52-65)	40 (35-47)	7.5	25.6
94	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	352 (329-375)	110 (85-140)	81 (70-94)	55 (50-61)	6.4	2.0
53	Ph-CH ₂ -CH ₂ -	H	1.00 (0.66-1.51)	0.34 (0.22-0.44)	5.1 (3.9-6.7)	280 (347-317)	0.003	0.001
95	Ph-CH ₂ -CH ₂ -	4-MeO-Ph-NHCO	201 (172-236)	120 (100-145)	81 (70-94)	0.98 (1.22-1.78)	205	122
96	Ph-CH ₂ -CH ₂ -	3-Cl-Ph-NHCO	251 (229-276)	105 (90-125)	90 (81-101)	8.0 (7.2-8.9)	6.3	13
97	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	H	3.00 (2.65-3.39)	0.18 (0.07-0.50)	48.3 (43.7-52.0)	2.666 (2.533-2.805)	0.001	0.018
98	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	4-MeO-Ph-NHCO	251 (221-286)	1,010 (880-1,160)	802 (719-895)	40 (33-48)	6.27	25.2
99	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	3-Cl-Ph-NHCO	1,500 (1,325-1,693)	200 (185-210)	226 (183-278)	60 (51-70)	25	3.3
100	2,4,5-Br ₃ -Ph-CH ₂ - CH ₂	H	247 (170-358)	348 (267-453)	1,113 (934-1,327)	4,481 (3,650-5,501)	0.06	0.08
101	2,4,5-Br ₃ -Ph-CH ₂ - CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	255 (191-339)	2,030 (1,770-2,327)	> 10,000	25 (17-36)	10.2	81.2
102	2,4,5-Br ₃ -Ph-CH ₂ - CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	389 (327-462)	3,600 (3,420-3,788)	1,816 (1,681-1,961)	71 (65-78)	5.50	51

Tabella 8. Affinità di binding verso i recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (continua)

Composto	R	R ¹	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃
103	2-(□-naftil)etil	H	348 (267-453)	896 (730-1,100)	4,294 (3,828-4,817)	3,416 (3,228-3,614)	0.10	0.26
104	2-(□-naftil)etil	4-MeO-Ph-NHCO	2,466 (2,362-2,575)	3,260 (2,826-3,761)	> 10,000	16 (14-19)	154	204
105	2-(□-naftil)etil	3-Cl-Ph-NHCO	3,164 (2,894-3,460)	> 10,000	> 10,000	51 (34-76)	62	> 196
CGS15943 (27)	-	-	4.4 (4.1-4.7)	0.43 (0.37-0.49)	23 (18-29)	85 (76-95)	0.05	0.005
106	-	4-MeO-Ph-NHCO	7.6 (6.5-8.7)	9.4 (8.7-10.2)	22 (19-27)	0.14 (0.08-0.24)	43	50
107	-	3-Cl-Ph-NHCO	8.1 (6.9-9.7)	9.5 (8.7-10.5)	30 (23-40)	0.19 (0.13-0.27)	54	67
108	CH ₃	Ph-CH ₂ -CO	702 (624-790)	423 (379-471)	165 (139-156)	0.81 (0.69-0.97)	867	522
109	C ₂ H ₅	Ph-CH ₂ -CO	714 (589-866)	335 (289-437)	161 (132-196)	1.03 (0.79-1.34)	693	345

^aSpiazzamento di [³H]-DPCPX nei recettori umani A₁ espressi in cellule CHO, (n=3-6). ^bSpiazzamento di [³H]-SCH58261 nei recettori umani A_{2A} espressi in cellule CHO. ^cSpiazzamento di [³H]-DPCPX nei recettori umani A_{2B} espressi in cellule HEK-293, (n=3-6). ^dSpiazzamento di [³H]MRE-3008F20 nei recettori umani A₃ espressi in cellule CHO. I dati sono espressi come media geometrica. Fra parentesi sono indicati i limiti di confidenza.

“templato”, è stata ottenuta una mappa farmacoforica che conferma quanto osservato (**Figura 20**).¹⁵⁹

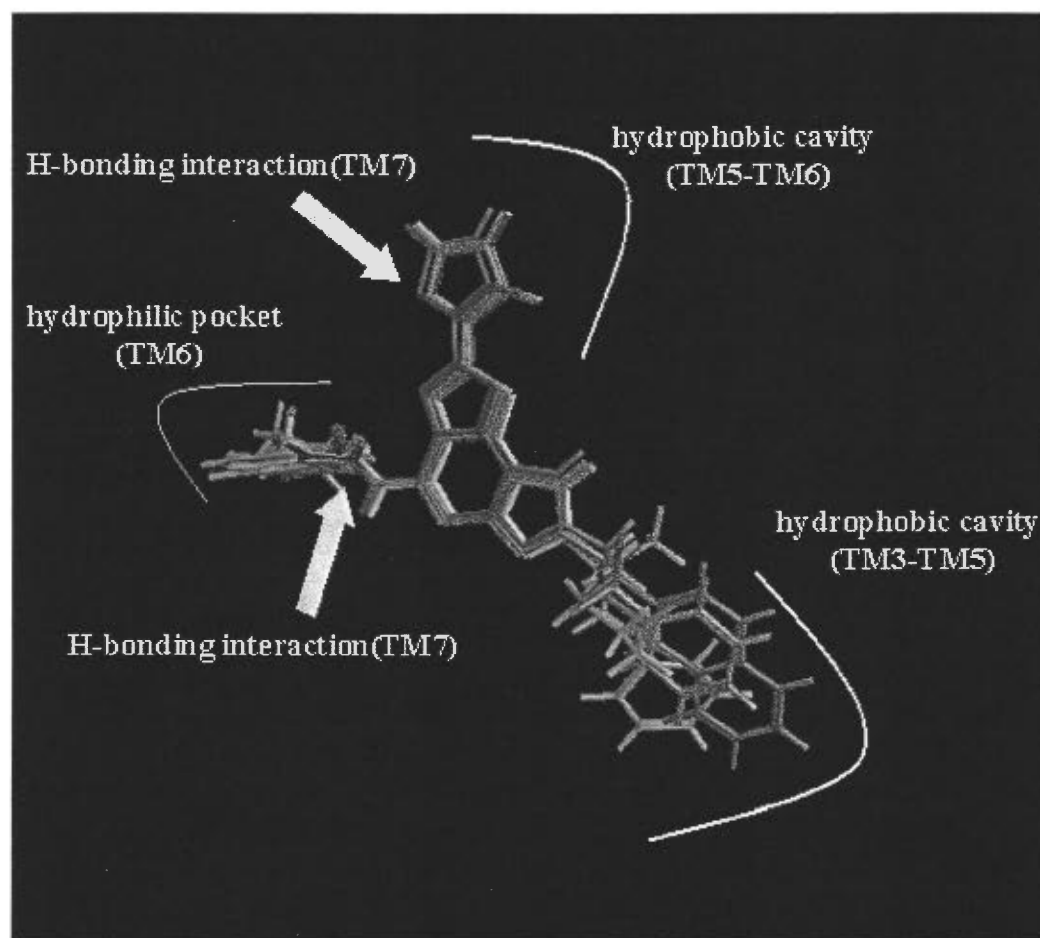


Figura 20. Mappa farmacoforica per il binding delle pirazolo-triazolo-pirimidine nel recettore adenosinico umano A₃.

Un profilo biologico, significativamente diverso, si osserva quando in posizione 8 sono presenti le catene ingombranti come quella feniletilica (97) e fenilpropilica (100); infatti è evidente una riduzione di affinità di circa 10-100 volte, e tale fenomeno potrebbe essere attribuito sia a effetti sterici che lipofili. In realtà, è stato osservato che l'ingombro sterico, specialmente quando si trova distante dall'azoto pirazolico in N8, prevale sul fattore

lipofilo; infatti con l'isopentile in N8 (**91**) si assiste ad una significativa diminuzione sia della affinità che della selettività nei confronti del recettore adenosinico umano A₃. Quando però, l'ingombro sterico è particolarmente vicino all'azoto pirazolico, come nel caso del tert-butile (**88**), vengono mantenute sia l'affinità che la selettività.

Inoltre, è stato definito il ruolo sia della catena fenilcarbamoilica che del nucleo pirazolico, mediante degli ibridi molecolari tra questi derivati tricyclici e l'MRS1220 (**63**) riportato da Jacobson e collaboratori. In pratica, è stata inserita la catena fenilcarbamoilica sul nucleo del CGS15943 e contemporaneamente la catena fenilacetica sul gruppo amminico dei nostri derivati (**Figura 21**).

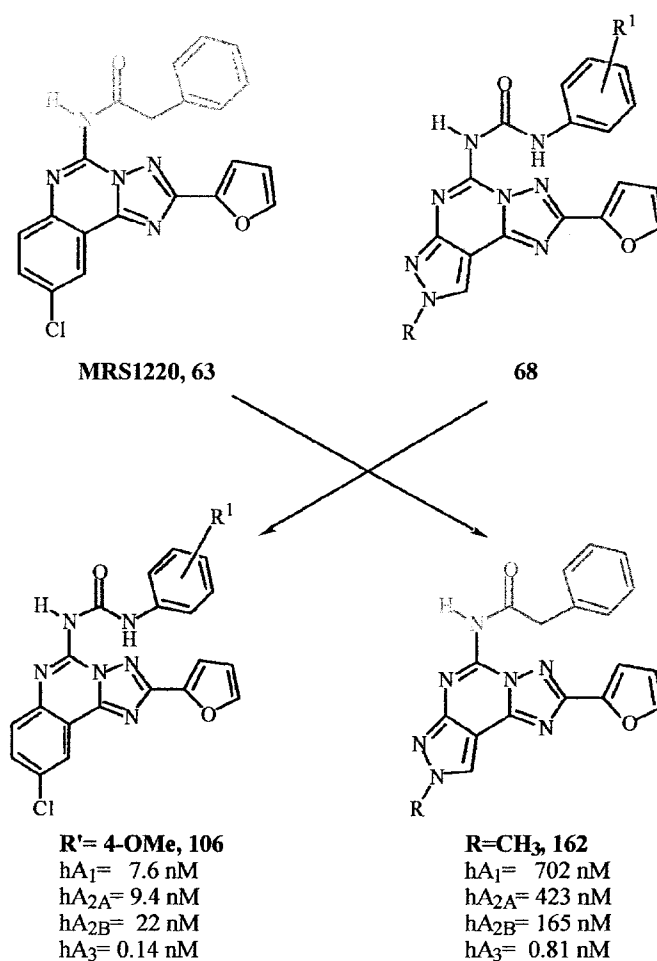


Figura 21. Ibridi molecolari tra le chinazoline e le pirazolo-triazolo-pirimidine

Si è potuto così osservare che per i derivati del CGS15943 (**106**) si ha una marcata affinità verso il recettore umano A_3 ($K_i hA_3 = 0.14$ nM), mentre si assiste ad una significativa perdita di selettività nei confronti degli altri recettori.

Al contrario, l'introduzione della catena fenilacetica sui nostri derivati, portanti i sostituenti ottimali in posizione 8, produce una perdita di affinità con una conseguente riduzione della selettività. (**162**). Queste ultime osservazioni sperimentali, permettono di dedurre che, mentre la catena fenilcarbamioilica induce potenza, la presenza degli azoti pirazolici induce selettività, consentendo, quindi, una discriminazione fra i vari sottotipi recettoriali.

2. SCOPO

Si è voluto incentrare questo lavoro di Dottorato sullo sviluppo di nuovi antagonisti adenosinici a struttura pirazolo-triazolo-pirimidinica; da studi effettuati precedentemente, è stata ottimizzata la sostituzione in 8, dimostrando che sono adatti, per il recettore hA_3 , sostituenti con basso volume molecolare (per es. CH_3 , C_2H_5 , $n-C_3H_7$, $n-C_4H_9$). Al fine di approfondire i requisiti strutturali ottimali per l'interazione ligando-recettore, ci si è occupati perciò di:

- valutare l'effetto del sostituente e la sua relativa posizione (*orto*, *meta*, *para*) sull'anello fenilico in 5 (capitolo 3);
- sintetizzare alcuni derivati recanti gruppi polari in grado di ridurre la lipofilia, di aumentare la solubilità in acqua e di mantenere inalterate sia l'affinità che la selettività (capitolo 4);
- affiancare il lavoro di sintesi a studi di modellistica molecolare, in collaborazione con il Dottor Stefano Moro dell'Università di Padova; i numerosi composti a disposizione (circa 109) hanno consentito di ottenere un modello in grado non solo di confermare, ma addirittura di predire il profilo di binding di nuovi composti (capitolo 5).
- comprendere i requisiti strutturali necessari per l'interazione col recettore hA_{2B} , sulla base delle informazioni acquisite indirettamente dallo studio di antagonisti hA_3 a nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico. Si è visto, infatti, che la sostituzione bioisosterica di un -NH ureidico con un - CH_2 comporta una significativa perdita di affinità verso hA_3 , di circa 5 volte, e un lieve aumento o ritenzione di affinità verso hA_{2B} (capitolo 6).
- ridurre il laborioso processo sintetico senza, per questo, rinunciare agli interessanti profili biologici delle pirazolo-triazolo-pirimidine; in tal caso, si è

ricorsi alla sintesi di analoghi semplificati di tale struttura e, in particolare, si è cercato di verificare se il nucleo triazolo triazinico potesse essere considerato un “templato” per i recettori adenosinici, in virtù di:

minor peso molecolare;

sintesi più semplice;

maggior solubilità in acqua;

condizioni necessarie per migliorare la biodisponibilità e renderlo, così, un potenziale tool farmacologico (capitolo 7)

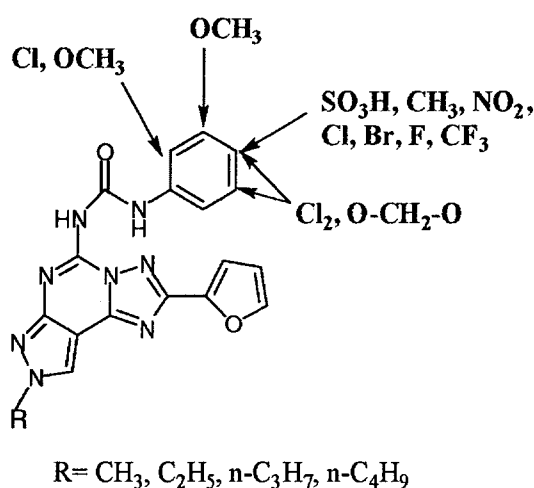
3. EFFETTO DEL SOSTITUENTE SUL FENILE DELLA CATENA ARILCARBAMOILICA

3. 1. INTRODUZIONE

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha riportato numerosi composti eterociclici quali antagonisti del recettore hA_3 ; in particolare una nuova serie di pirazolo-triazolo-pirimidine, portanti una funzione 4-metossi- o 3-clorofenilcarbamoilica in N5, ha evidenziato, nei confronti del sottotipo hA_3 , una affinità nel range sub-nanomolare ed una notevole selettività (Tabella 8).¹⁶⁰

Come precedentemente riportato, è necessario mantenere sostituenti con basso volume molecolare (per es. CH_3 , C_2H_5 , $n-C_3H_7$, $n-C_4H_9$) in N8, per garantire una buona interazione ligando-recettore.¹⁶¹

Infatti, il composto 75, che presenta contemporaneamente il metile in N8 ed il 4-OMe in para al fenile, può essere considerato l'antagonista hA_3 più potente e selettivo mai riportato fino ad oggi.¹⁴²



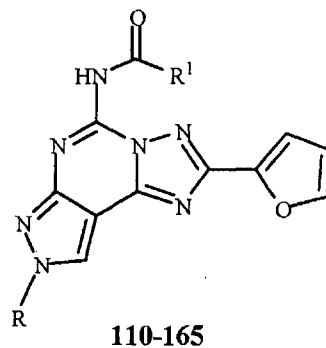
110-165

Figura 22. Sostituzioni in N5

Su questa base, si è valutato l'effetto sterico ed elettronico del sostituente e della sua relativa posizione (*orto*, *meta*, *para*) sull'anello fenilico in 5 (**Figura 22**), mantenendo piccoli gruppi alchilici in N8.

Inoltre, con l'intento di comprendere totalmente il ruolo della catena in N5 nel riconoscimento recettoriale, sono stati sintetizzati dei composti con il gruppo fenilacetico in N5, caratteristico di un antagonista hA₃ potente ma poco selettivo (**MRS 1220, 63**), in sostituzione al gruppo arilcarbamoilico, tipico di questa serie (**Tabella 9**).

Tabella 9. Struttura e parametri chimico-fisici dei composti sintetizzati (*Vedi Baraldi et al *J.Med.Chem.* 2001, 44, 2735-2742).



Composti	R	R ¹	p.f. (°C)	PM
110	CH ₃	Ph-NH	165-167	384.20
111	CH ₃	4-SO ₃ H-Ph-NH	255	450.08
112	CH ₃	3,4-Cl ₂ -Ph-NH	204	442.04
113	CH ₃	3,4-O-CH ₂ O--Ph-NH	118-120	418.11
114	CH ₃	4-NO ₂ -Ph-NH	180	419.10
115	CH ₃	4-CH ₃ -Ph-NH	195-197	388.13
116	CH ₃	4-Br-Ph-NH	> 300	453.26
117	CH ₃	4-F-Ph-NH	> 300	392.35
118	CH ₃	4-CF ₃ -Ph-NH	203	442.36
119	CH ₃	2-OMe-Ph-NH	> 300	404.39

Tabella 9. Struttura e parametri chimico-fisici dei composti sintetizzati (continua)

Composti	R	R ¹	p.f. (°C)	PM
120	CH ₃	3-OMe-Ph-NH	205	404.39
121	CH ₃	2-Cl-Ph-NH	> 300	408.80
122	CH ₃	4-Cl-Ph-NH	225	408.80
123	C ₂ H ₅ ^a	Ph-NH	180	388.13
124	C ₂ H ₅	4-SO ₃ H-Ph-NH	225	468.09
125	C ₂ H ₅	3,4-Cl ₂ -Ph-NH	185-188	456.06
126	C ₂ H ₅	3,4-O-CH ₂ O--Ph-NH	124-126	432.12
127	C ₂ H ₅	4-NO ₂ -Ph-NH	185	433.12
128	C ₂ H ₅	4-CH ₃ -Ph-NH	175-178	402.15
129	C ₂ H ₅	4-Br-Ph-NH	220	467.28
130	C ₂ H ₅	4-F-Ph-NH	200	406.38
131	C ₂ H ₅	4-CF ₃ -Ph-NH	180	456.39
132	C ₂ H ₅	2-OMe-Ph-NH	128	418.41
133	C ₂ H ₅	3-OMe-Ph-NH	178	418.41
134	C ₂ H ₅	2-Cl-Ph-NH	127	422.83
135	C ₂ H ₅	4-Cl-Ph-NH	220	422.83

Tabella 9. Struttura e parametri chimico-fisici dei composti sintetizzati (continua)

Composti	R	R¹	p.f. (°C)	PM
136	n-C ₃ H ₇ ^a	Ph-NH	155	402.15
137	n-C ₃ H ₇	4-SO ₃ H-Ph-NH	235	482.11
138	n-C ₃ H ₇	3,4-Cl ₂ -Ph-NH	208	470.07
139	n-C ₃ H ₇	3,4-O-CH ₂ O--Ph-NH	111-113	446.14
140	n-C ₃ H ₇	4-NO ₂ -Ph-NH	190	447.14
141	n-C ₃ H ₇	4-CH ₃ -Ph-NH	181-184	416.16
142	n-C ₃ H ₇	4-Br-Ph-NH	225	481.31
143	n-C ₃ H ₇	4-F-Ph-NH	193	420.40
144	n-C ₃ H ₇	4-CF ₃ -Ph-NH	202	470.41
145	n-C ₃ H ₇	2-OMe-Ph-NH	195	432.44
146	n-C ₃ H ₇	3-OMe-Ph-NH	175	432.44
147	n-C ₃ H ₇	2-Cl-Ph-NH	185	436.86
148	n-C ₃ H ₇	4-Cl-Ph-NH	216	436.86
149	n-C ₄ H ₉ ^a	Ph-NH	145	416.17
150	n-C ₄ H ₉	4-SO ₃ H-Ph-NH	240-241	496.12

Tabella 9. Struttura e parametri chimico-fisici dei composti sintetizzati (continua)

Composti	R	R¹	p.f. (°C)	PM
151	n-C ₄ H ₉	3,4-Cl ₂ -Ph-NH	205-206	484.09
152	n-C ₄ H ₉	3,4-O-CH ₂ O--Ph-NH	115-117	460.16
153	n-C ₄ H ₉	4-NO ₂ -Ph-NH	195	461.15
154	n-C ₄ H ₉	4-CH ₃ -Ph-NH	175-177	430.18
155	n-C ₄ H ₉	4-Br-Ph-NH	227	495.34
156	n-C ₄ H ₉	4-F-Ph-NH	207	434.43
157	n-C ₄ H ₉	4-CF ₃ -Ph-NH	221	484.44
158	n-C ₄ H ₉	2-OMe-Ph-NH	186	446.47
159	n-C ₄ H ₉	3-OMe-Ph-NH	185	446.47
160	n-C ₄ H ₉	2-Cl-Ph-NH	185	450.89
161	n-C ₄ H ₉	4-Cl-Ph-NH	210	450.89
162	CH ₃	Ph-CH ₂	198-200	373.12
163	C ₂ H ₅	Ph-CH ₂	106-108	387.14
164	n-C ₃ H ₇	Ph-CH ₂	101-103	401.16
165	n-C ₄ H ₉	Ph-CH ₂	101	415.17

3. 2. CHIMICA

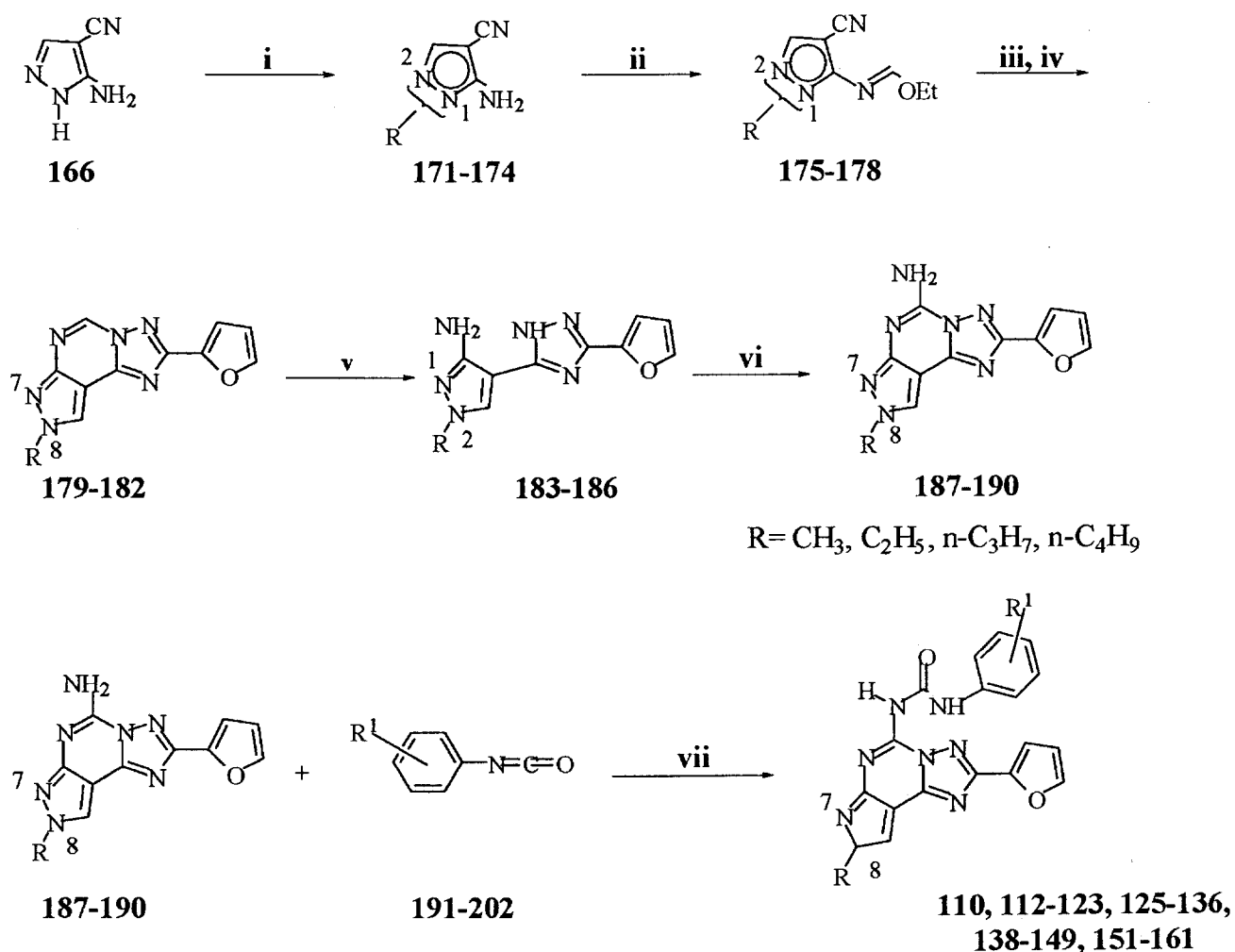
I composti sono stati sintetizzati seguendo la procedura, ampiamente conosciuta,¹⁶² che prevede l'alchilazione del 5-ammino-4-cianopirazolo con l'opportuno alogenuro alchilico, in presenza di NaH e DMF.

Si ottiene, così, una miscela inseparabile di due isomeri, in rapporto N1:N2 pari a 1:4. Per successivo riscaldamento, con trietilortoformiato, si ottengono i corrispondenti imminoeteri, i quali vengono successivamente fatti reagire con l'idrazide dell'acido furoico in 2-metossietanolo; segue, quindi, la fusione in Ph₂O, che consente di ottenere il nucleo delle pirazolo-triazolopirimidine; a questo punto vengono separati gli isomeri N7 (minor quantità) dagli N8 (composto predominante) mediante una flash cromatografia; il derivato N8-sostituito va quindi incontro all'idrolisi con HCl in diossano, a cui seguono la reazione con cianammide e il coupling finale con gli opportuni isocianati, a riflusso in THF per 12 ore (Schema 1).

I derivati con il gruppo solfonico sull'anello aromatico (111, 124, 137, 150) si ottengono per trattamento dei composti fenilcarbamoilici (110, 123, 136, 149) con acido clorosolfonico, a 0°. Seguono l'idrolisi con HCl 10% in diossano e purificazione mediante HPLC preparativa a fase inversa (Schema 2).

I derivati recanti la catena fenilacetica in N5 (strutturalmente correlati all'MRS1220) (162-165), si preparano mediante acilazione con fenilacetilcloruro in THF a riflusso, in presenza di trietilammina (Schema 3).

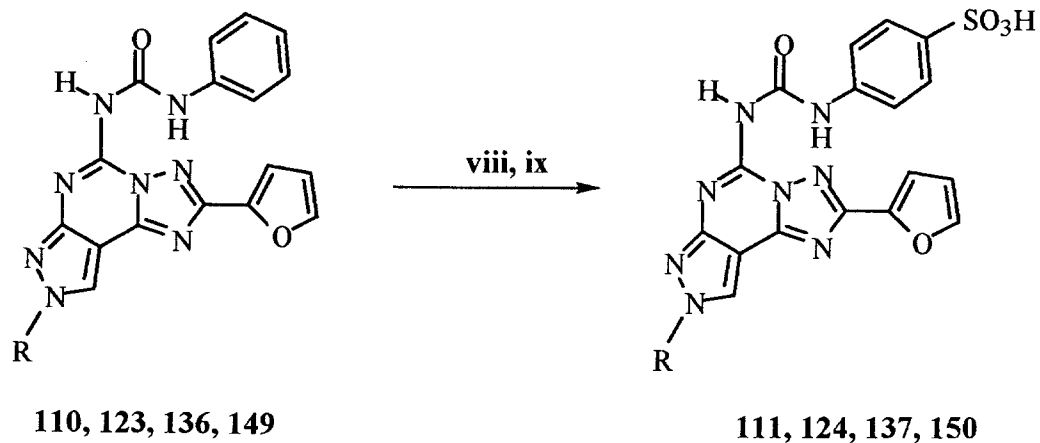
Schema 1



Reagenti: **i)** NaH, DMF, RX(167-170); **ii)** HC(OEt)₃, riflusso; **iii)** Idrazide dell'acido 2-furoico, MeO(CH₂)₂OH; **iv)** Ph₂O, 260°C, flash cromatografia; **v)** HCl, riflusso; **vi)** NH₂CN, 1-metil-2-pirrolidone, pTsOH, 140°C **vii)** THF, riflusso, 12 h

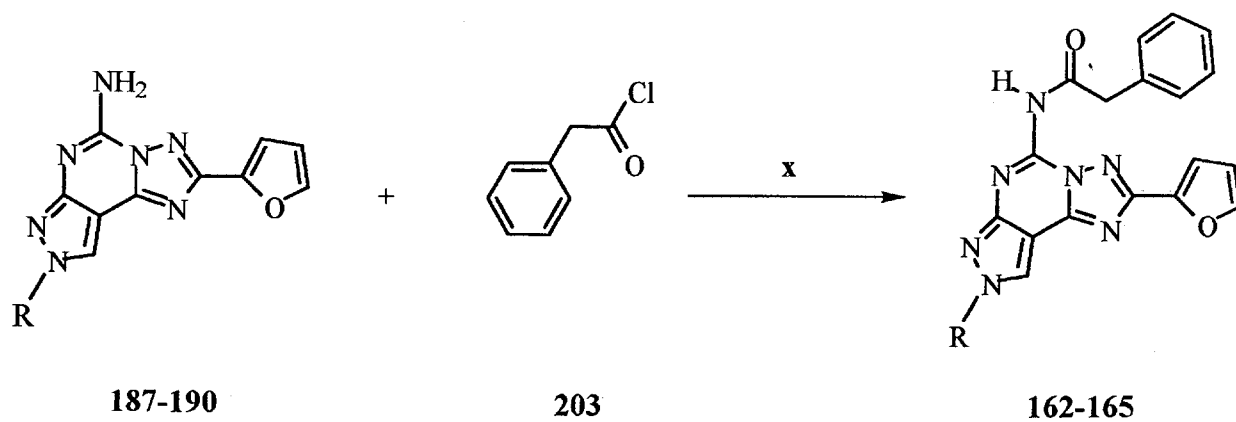
Schema 2

Schema 2



Reagenti: viii: acido clorosolfonico, 0 °C, 4h; **ix:** Diossano, 10% HCl, rt, 2 giorni, poi HPLC preparativa

Schema 3



Reagenti: x): THF anidro, Et₃N, riflusso, 18 ore

3. 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti sintetizzati (110-165) hanno evidenziato, nei confronti del sottotipo recettoriale hA₃, un'affinità nel range sub-nanomolare (Tabella 10), determinata mediante saggi di binding effettuati su recettori umani A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ espressi su cellule CHO (A₁, A_{2A} e A₃) e HEK-293 (A_{2B}).

[³H]-1,3-dipropil-8-ciclopentil xantina ([³H]DPCPX)¹⁶³ (A₁ e A_{2B}), [³H]-5-amino-7-(2-fenilettil)-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]-1,2,4triazolo[1,5-c]-pirimidina, ([³H]-SCH 58261) (A_{2A})¹⁶⁴ e [³H]-5-(4-metossifenilcarbamoil)ammino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina ([³H]-MRE3008-F20) (A₃)¹⁶⁵, sono stati impiegati come radioligandi nei saggi di binding.

Da un'analisi preliminare, è emerso che l'affinità sembra essere correlata più alla posizione piuttosto che alla natura del sostituente sull'anello aromatico. Il composto più affine e selettivo è quello che non presenta sostituzioni sull'anello (110, con hA₃ = 0.16 nM; hA₁/hA₃ = 3,713, hA_{2A}/hA₃ = 2,381, hA_{2B}/hA₃ = 1,388), ma anche piccoli sostituenti in *orto* e *para* sono ben tollerati. Infatti in *orto* è possibile introdurre, grazie ad una probabile cavità vuota nella regione di binding, piccoli gruppi, anche se con qualche eccezione: il 2-Cl non sembra compromettere l'affinità del composto, mentre il 2-OCH₃ è ottimale solo quando in N8 ho etile o propile (composto 81 hA₃ = 0.80 nM hA₁/hA₃ = 1,496, hA_{2A}/hA₃ = 175, hA_{2B}/hA₃ = 2,570) vs. composto 145 (hA₃ = 0.34 nM, hA₁/hA₃ = 735, hA_{2A}/hA₃ = 294, hA_{2B}/hA₃ = 485); quando si ha invece N8-metile o butile, il 4-OCH₃ evidenzia il miglior profilo (composto 75, hA₃ = 0.2 nM, hA₁/hA₃ = 5,485, hA_{2A}/hA₃ = 6,950, hA_{2B}/hA₃ = 1,305) vs. composto 119 (hA₃ = 0.7 nM hA₁/hA₃ = 643, hA_{2A}/hA₃ = 257, hA_{2B}/hA₃ = 319).

Dal momento che uno studio di QSAR classico¹⁶⁶ non ha permesso di ottenere una soddisfacente correlazione tra parametri elettronici (misurati tramite le costanti σ_p o σ_m),

Tabella 10. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (110-165).

Composti	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
110	594 (436-810)	381 (351-415)	222 (181-273)	0.16 (0.13-0.20)	3,713	2,381	1,388
111	> 10,000	594 (436-810)	> 10,000	25 (19-34)	> 400	24	> 400
112	392 (324-475)	143 (114-179)	116 (91-148)	3.4 (3.05-3.78)	115	42	34
113	1,015 (885-1,163)	680 (552-839)	142 (128-156)	0.24 (0.21-0.28)	4,229	2,833	592
114	1,115 (984-1,263)	695 (534-906)	180 (159-204)	0.43 (0.38-0.48)	2,593	1,616	419
115	731 (601-888)	110 (93-130)	302 (244-373)	0.31 (0.25-0.38)	2,358	355	974
116	600 (512-698)	100 (83-120)	181 (152-216)	0.46 (0.39-0.54)	1,304	217	393
117	700 (602-814)	120 (103-140)	226 (183-278)	0.34 (0.28-0.41)	2,059	353	665
118	750 (654-856)	140 (112-177)	286 (235-347)	0.74 (0.64-0.86)	1,014	189	386
119	450 (379-535)	180 (146-220)	223 (187-265)	0.70 (0.59-0.83)	643	257	319
120	500 (406-616)	160 (140-186)	251 (213-296)	0.80 (0.71-0.91)	625	200	313
121	400 (332-479)	200 (174-230)	101 (89-116)	0.91 (0.82-1.01)	440	220	111

Tabella 10. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Composti	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
122	430 (351-526)	180 (162-200)	128 (115-143)	0.29 (0.23-0.36)	1,483	621	122
123	326 (275-386)	40 (33-48)	88 (67-115)	0.18 (0.13-0.23)	1,811	222	123
124	> 10,000	249 (199-311)	> 10,000	40 (31-50)	> 250	6	124
125	526 (453-609)	352 (300-414)	40 (32-51)	3.0 (2.7-3.4)	175	117	125
126	802 (724-889)	576 (511-648)	48 (37-63)	0.27 (0.22-0.34)	2,970	2,133	178
127	1,134 (967-1,329)	614 (490-768)	226 (192-267)	0.65 (0.56-0.75)	1,745	945	348
128	262 (248-276)	30 (23-40)	132 (118-146)	0.14 (0.11-0.18)	1,871	214	943
129	500 (389-640)	40 (30-54)	296 (261-336)	0.37 (0.29-0.47)	1,351	108	800
130	602 (509-712)	60 (48-78)	246 (211-287)	0.86 (0.77-0.97)	700	70	286
131	450 (346-586)	53 (51-55)	235 (178-310)	0.97 (0.86-1.09)	464	57	242
132	300 (216-412)	133 (108-163)	196 (162-237)	0.56 (0.49-0.64)	536	238	350
133	400 (345-465)	140 (114-170)	215 (184-250)	0.86 (0.77-0.96)	465	163	250

Tabella 10. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Composti	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
134	348 (267-453)	150 (122-187)	97 (67-141)	0.30 (0.23-0.40)	1,160	500	323
135	400 (330-486)	160 (134-190)	85 (68-105)	0.20 (0.15-0.28)	2,000	800	425
136	176 (150-207)	62 (40-96)	241 (206-282)	0.15 (0.10-0.18)	1,173	413	1606
137	> 10,000	305 (240-388)	> 10,000	30 (22-41)	> 333	10	> 333
138	611 (552-676)	401 (362-445)	31 (25-40)	2.5 (2.0-3.1)	244	160	12
139	842 (738-961)	667 (543-820)	53 (40-69)	0.30 (0.22-0.40)	2,807	2,223	177
140	1,214 (1,033-1,425)	1,115 (984-1,263)	305 (240-388)	0.81 (0.63-1.04)	1,499	1,377	377
141	302 (237-384)	12 (8-18)	46 (34-62)	0.40 (0.31-0.50)	755	30	115
142	350 (290-418)	50 (40-62)	150 (124-180)	0.45 (0.37-0.56)	778	111	333
143	376 (294-480)	42 (34-50)	161 (140-186)	0.29 (0.21-0.40)	1,297	145	555
144	400 (330-478)	34 (24-48)	136 (115-161)	0.51 (0.42-0.62)	784	67	267
145	250 (180-345)	100 (73-138)	165 (125-218)	0.34 (0.27-0.43)	735	294	485

Tabella 10. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Composti	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
146	275 (198-382)	113 (96-133)	175 (149-204)	0.40 (0.32-0.50)	688	283	438
147	300 (245-370)	121 (103-142)	61 (49-77)	0.71 (0.61-0.83)	423	170	86
148	325 (265-400)	140 (123-162)	76 (56-103)	0.34 (0.24-0.48)	956	412	224
149	409 (358-468)	148 (102-215)	50 (43-58)	0.21 (0.12-0.37)	1,948	705	238
150	> 10,000	352 (300-414)	> 10,000	47 (39-55)	> 213	7.49	> 213
151	708 (598-838)	495 (402-608)	34 (26-45)	3.7 (3.2-4.3)	191	134	9.19
152	410 (314-536)	376 (332-426)	78 (57-105)	0.50 (0.40-0.62)	820	752	156
153	584 (511-667)	503 (442-571)	52 (45-60)	0.55 (0.46-0.64)	1,062	915	96
154	281 (210-376)	24 (18-33)	161 (127-203)	0.21 (0.16-0.28)	1,338	114	767
155	300 (222-400)	66 (47-93)	121 (88-165)	0.91 (0.82-1.02)	330	73	133
156	318 (253-401)	50 (36-70)	136 (107-172)	0.80 (0.70-0.92)	398	63	170
157	350 (264-463)	31 (25-40)	130 (105-170)	0.72 (0.61-0.84)	486	43	181

Tabella 10. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Composti	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
158	200 (156-258)	91 (71-111)	125 (116-134)	0.57 (0.46-0.70)	351	160	219
159	248 (184-333)	95 (78-114)	150 (124-180)	0.60 (0.53-0.68)	413	158	250
160	280 (245-319)	100 (83-120)	78 (65-94)	0.86 (0.76-0.98)	326	116	91
161	300 (240-368)	111 (91-137)	87 (76-98)	0.43 (0.37-0.50)	698	258	202
162	702 (624-790)	423 (379-471)	165 (139-156)	0.81 (0.69-0.97)	867	522	204
163	714 (589-866)	335 (289-437)	161 (132-196)	1.03 (0.79-1.34)	693	345	156
164	351 (269-458)	306 (255-366)	143 (118-173)	1.01 (0.65-1.58)	348	303	142
165	602 (525-691)	400 (312-515)	101 (89-116)	1.11 (0.74-1.67)	542	360	91

^a Spiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A₁ espresso in cellule CHO, (n=3-6). ^b Spiazzamento del legame specifico del composto [³H]-SCH58261 dal recettore umano A_{2A} espresso in cellule HEK-293. ^c Spiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A_{2B} espresso in cellule HEK-293, (n=3-6). ^d Spiazzamento del legame specifico del composto [³H]MRE3008-F20 dal recettore umano A₃ espresso in cellule HEK-293. I dati sono espressi come K_i ± SEM in nM (n=3-6), con il 95% di limite di confidenza.

fattori sterici (in termini di volumi molecolari) e lipofilici (tramite il logP), si è ricorsi ad uno studio di docking,¹⁵⁸ con l'obiettivo di valutare l'ipotetico sito di legame di questi nuovi antagonisti A₃ e, in particolare, di corroborare la correlazione tra le strutture e i relativi valori di binding.

Purtroppo, al momento si hanno scarse informazioni riguardanti l'interazione ligando/GPCR. Solo recentemente è stata pubblicata una risoluzione di 2.8 Å della struttura cristallografica della rodopsina bovina¹⁶⁷ che ha consentito, mediante omologia, di costruire un modello della regione transmembrana del recettore umano A₃.¹⁵⁸

E' stato impiegato il composto, non sostituito sull'anello aromatico (110), come riferimento negli studi di docking (Figura 23).

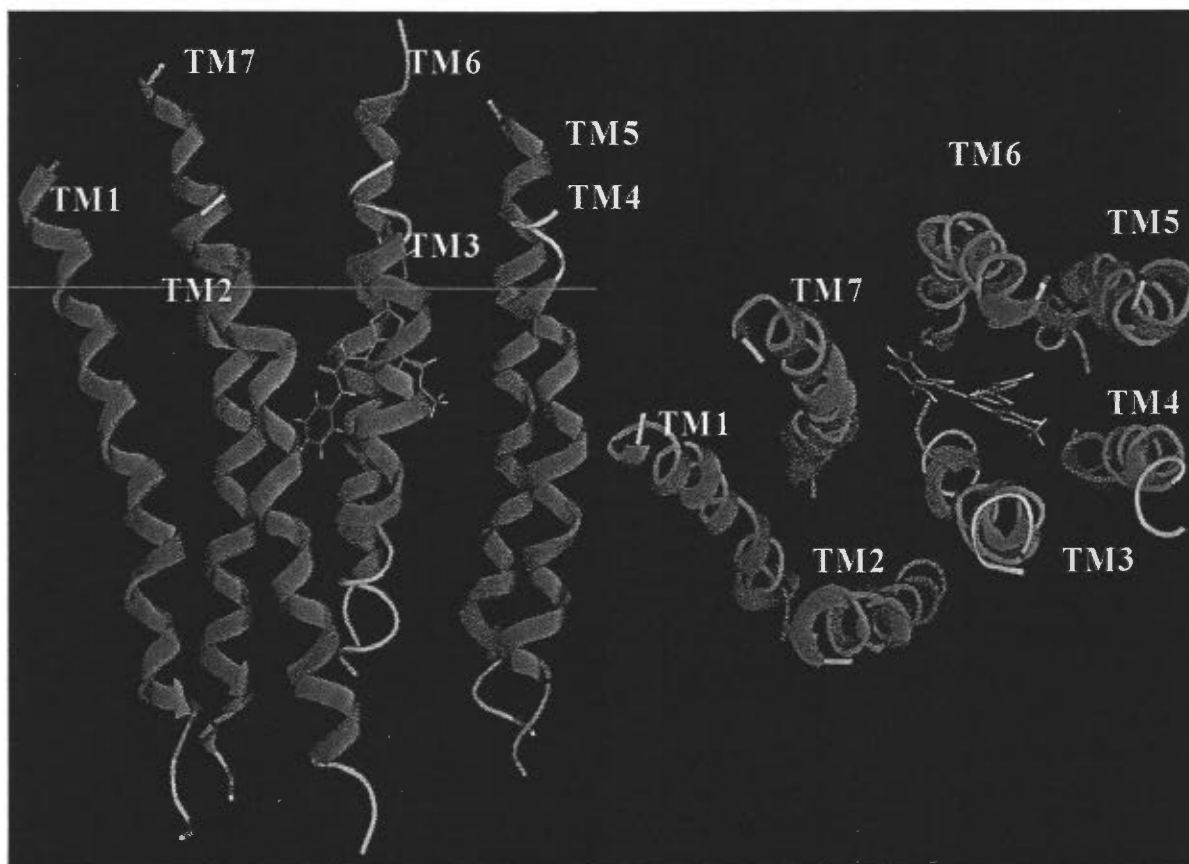


Figura 23. Modello della porzione transmembrana del recettore umano A₃. Si possono identificare la parte extracellulare (sulla destra) e quella perpendicolare agli assi dell'elica (sulla sinistra). Come riferimento si è utilizzato il composto 110.

Dopo l'allineamento di Monte Carlo, si è potuto identificare il sito di interazione, circondato dai domini TM 3, 5, 6, e 7, con il furano orientato verso la porzione extracellulare, disposizione molto simile all'antagonista non selettivo CGS 15943.¹⁶⁸

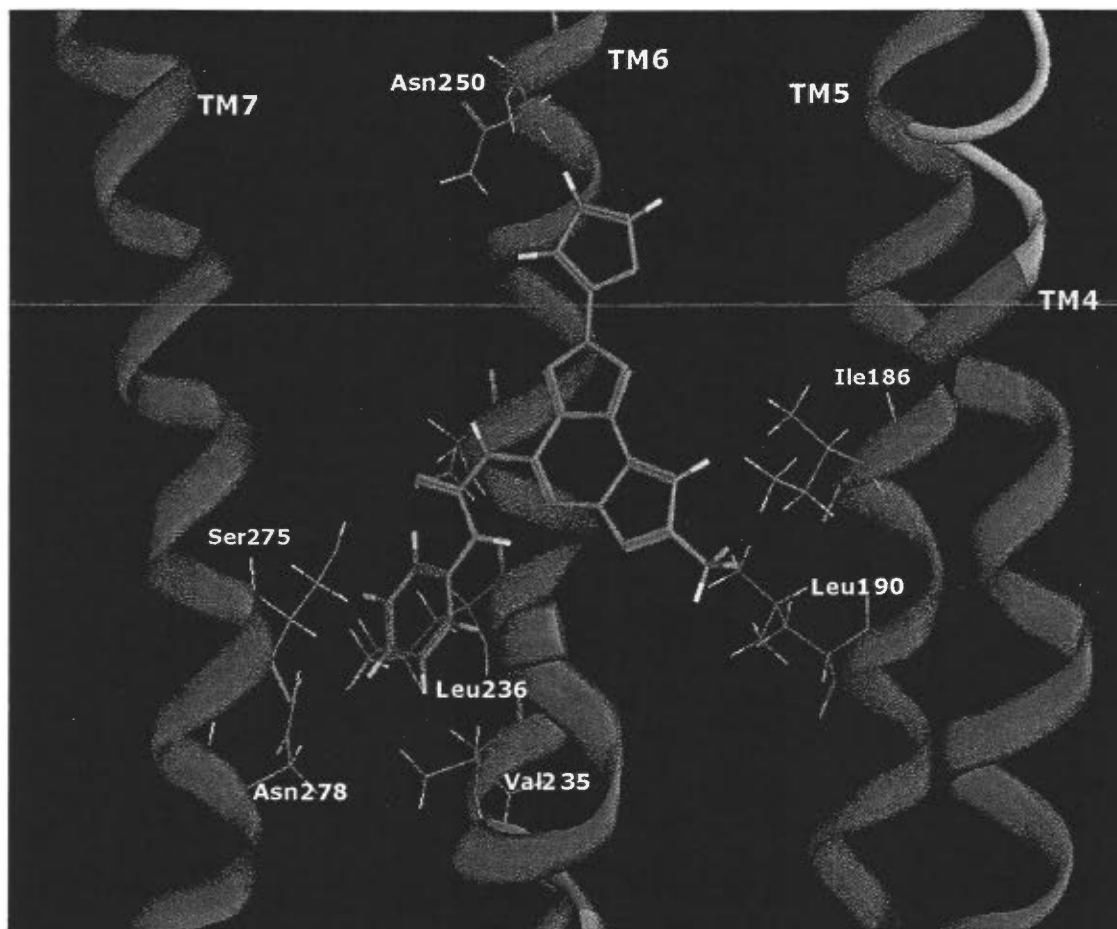


Figura 24. Ipotetico sito di binding a livello di domini TM 3, 5, 6 e 7, identificato tramite studi di docking . Si è utilizzato il composto non sostituito sull'anello aromatico (110) come riferimento.

In tale modello, la minima energia conformazionale del composto prevede la catena arilcarbamoilica in 5 circondata da 4 amminoacidi polari: Ser242 (TM6), Ser271 (TM7), His274 e Ser275 (TM7). Tale porzione sembra essere determinante nel riconoscimento

recettoriale degli antagonisti. In accordo con gli studi di mutagenesi condotti da Jacobson e collaboratori, risulta che il residuo di Ser281 per il recettore umano A_{2A}, corrispondente alla Ser275 in quello hA₃, sia essenziale sia per agonisti che antagonisti. Le forti interazioni tra il gruppo arilcarbamoilico e tali amminoacidi polari orienta l'anello aromatico tra i domini TM6 e TM7, come indicato in **Figura 24**; inoltre, si è visto che esiste una piccola tasca lipofila attorno al sostituente in *para*, delimitata da amminoacidi apolari, come Leu90 (TM3), Phe182 (TM5), Ile186 (TM5), e Leu190 (TM5). Questo potrebbe giustificare il fatto che sostituenti polari in tale posizione non siano ben tollerati. Così, quando è presente il gruppo -SO₃H in 4, si ottengono buoni risultati in termini di solubilità, ma si verifica una significativa riduzione di affinità (150-300 volte) nei confronti di hA₃. Inoltre c'è un controllo sterico, nel senso che gruppi più grandi di F, Cl, OCH₃ o CH₃ non risultano essere ben tollerati.

Un controllo sterico ancora più restrittivo viene esercitato in posizione *meta*, in cui l'H è l'unico che elide la forte repulsione tra i sostituenti.

Per quanto riguarda i derivati fenilacetici, tali composti (**162-165**) hanno evidenziato una riduzione di potenza di circa 6-8 volte rispetto ai corrispondenti analoghi arilcarbamoilici (**162**, con hA₃= 0.81 nM, rispetto a **110**, con hA₃= 0.16 nM; **163**, con hA₃= 1.03 nM, rispetto a **123**, con hA₃= 0.18 nM), consentendo di dedurre che il gruppo ureidico risulta essere meglio tollerato rispetto a quello fenilacetico ed è responsabile della potenza nei confronti del sottotipo recettoriale hA₃; si osserva esattamente il contrario nei confronti di A_{2B}, in cui sembra essere preferibile la catena fenilacetica (composto **149**, con hA_{2B}= 50 nM e hA₃= 0.21 nM; composto **165**, con hA_{2B}= 101 nM, hA₃= 1.11 nM). Il nostro modello teorico ha confermato i valori osservati, suggerendo che l'intorno idrofilico, creato dai residui di Ser243 (TM6) e Ser271 (TM7) potrebbe giustificare il miglior accomodamento dell' NH della catena arilcarbamoilica, rispetto al CH₂ dei composti fenilacetici.

Infine, per i composti N8-metilici (**110-122, 162**), è stato effettuato anche un saggio funzionale, che valuta l'inibizione della produzione di AMP ciclico, indotta dall'agonista IB-MECA a concentrazione nota, da parte dell'antagonista (**Tabella 11**). Questo ulteriore studio ha confermato la correlazione lineare tra affinità di legame e potenza e, quindi, l'antagonismo competitivo di questi composti, come suggerito dalla seguente equazione:

$$y = 0.88 (\pm 0.03)x + 0.97 (\pm 0.02) (r = 0.990)$$

Tabella 11. Saggio funzionale. Inibizione della produzione di cAMP, indotta da IB-MECA 100 nM su recettori hA₃, da parte dei composti recanti il sostituito N8-CH₃. I valori sono espressi come IC₅₀(nM). I valori sono espressi come media di almeno 3 prove; tra parentesi sono indicati i limiti di confidenza del 95%.

Composti	IC ₅₀ (nM)
112	26 (15-44)
113	3.2 (1.8-5.6)
114	5.5 (4.3-7.0)
115	4.6 (2.7-7.8)
116	4.2 (2.7-6.6)
117	3.0 (2.0-4.3)
118	6.6 (3.7-11.7)
119	5.6 (3.0-10.8)
120	7.8 (5.5-10.9)
121	8.2 (4.4-15.2)
122	2.4 (1.2-4.9)
162	6.4 (4.4-9.3)
110	2.0 (1.4-2.9)
111	190 (130-279)

3. 4. CONCLUSIONI

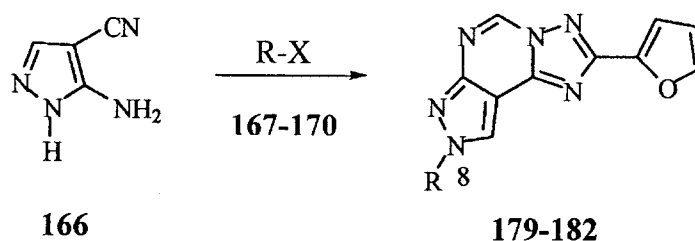
In conclusione, tale studio ha fornito informazioni utili riguardanti i requisiti strutturali necessari per il riconoscimento degli antagonisti da parte del recettore A₃. E' stato inoltre dimostrato che l'anello aromatico non sostituito conferisce un'affinità migliore rispetto ai derivati con sostituenti in *para* (per es. composto 110 hA₃ = 0.16 nM, hA₁/hA₃ = 3,713, hA_{2A}/hA₃ = 2,381, hA_{2B}/hA₃ = 1,388 vs. composto 75 hA₃ = 0.20 nM, hA₁/hA₃ = 5,485, hA_{2A}/hA₃ = 6,950, hA_{2B}/hA₃ = 1,305). In più, grazie a studi di modellistica molecolare, si può dedurre che i fattori sterici in tale posizione influenzano molto l'affinità verso i recettori umani A₃. Infatti, quando viene introdotto un gruppo solfonico in *para* si incrementa la solubilità in acqua, ma si assiste ad una concomitante riduzione di affinità di circa 150-300 volte, con conseguente perdita di selettività.

Infine, i composti sintetizzati hanno chiaramente indicato l'importanza di alcuni amminoacidi nel riconoscimento recettoriale, come Ile186 (TM5), Leu190 (TM5), Val235 (TM6), Leu237 (TM6), Ser243 (TM6), Asp250 (TM6), Ser271 (TM7), Ser275 (TM7) e Asp278 (TM7). Nel complesso, tale lavoro ha fornito nuovi spunti per migliorare l'interazione ligando-recettore.

3. 5. PARTE SPERIMENTALE

3. 5. 1. CHIMICA

Procedura generale per la preparazione dell'8-alkil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (179-182)



Una soluzione di **166** (5-ammino-4-cianopirazolo) (1.08 gr, 10 mmoli) in 40 ml di DMF anidra viene raffreddata a 0 °C e trattata con NaH (60% in olio, 12 mmoli) in varie porzioni in 10 minuti. Dopo 45 minuti, viene aggiunto l'appropriato alogenuro alchilico (**167-170**) (12 mmoli) e la miscela di reazione viene lasciata a 25 °C e agitata per 3-5 h (TLC: EtOAc 1:1). Terminata la reazione, si addiziona H₂O (80 ml), e si estrae con AcOEt (5 x 25 ml). Le fasi organiche sono riunite, anidificate (Na₂SO₄) filtrate e concentrate a pressione ridotta, a fornire il pirazolo alchilato (**171-174**) come una miscela inseparabile di isomeri N1 e N2 (rapporto circa 1:4). Tale miscela (**171-174**) viene successivamente trattata con trietilortoforniato (60 ml) e la soluzione viene portata a riflusso sotto argon per 8 h. Poi il solvente viene rimosso sotto vuoto e il residuo oleoso, costituito dalla miscela di immidati (**175-178**), viene sciolto in 2-metossietanolo (50 ml) e addizionato di idrazide dell'acido 2-furoico (13 mmoli). La miscela viene portata a riflusso per 5-10 h, e, dopo raffreddamento, il solvente viene rimosso a pressione ridotta. Il residuo viene quindi sciolto in difenilettere (50 ml) e la soluzione ottenuta viene scaldata a 260°C (utilizzando un Dean-Stark per l'eliminazione azeotropica dell'acqua prodotta durante la reazione). Dopo 1.5 h, la miscela viene versata in esano raffreddato a 0 °C (300 ml). Il precipitato viene filtrato e purificato

tramite flash cromatografia (EtOAc/ esano 1:1), in modo da separare il derivato N8 sostituito (179-182) dal corrispondente regioisomero N7.

8-Metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (179)

resa 45%; solido giallo; p.f. 155-156 °C (EtOAc-etero di petrolio); IR (KBr): 1615, 1510 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 4.1 (s, 1H); 6.32 (m, 1H); 7.25 (m, 1H); 8.06 (m, 1H); 8.86 (s, 1H); 9.38 (s, 1H).

8-Etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (180)

resa 50%; solido giallo pallido; p.f. 188-189 °C (EtOAc-light petroleum); IR (KBr): 1620, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 1.67 (t, 2H, $J = 7$); 4.53 (q, 2H, $J=7$); 6.59 (m, 1H); 7.23 (m, 1H); 7.64 (s, 1H); 8.34 (s, 1H); 9.10 (s, 1H).

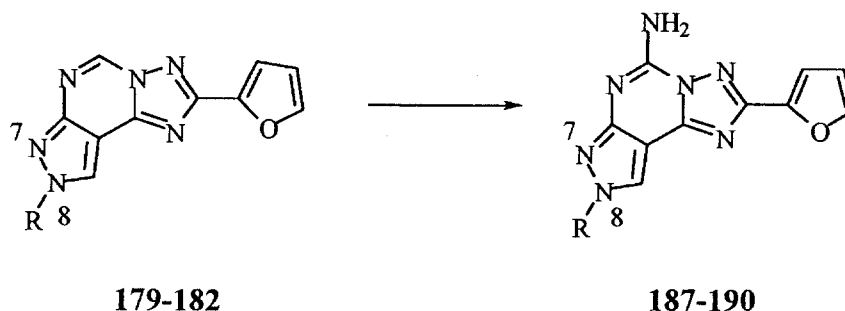
8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (181)

resa 59%; solido giallo pallido; p.f. 203 °C (EtOAc-light petroleum); IR (KBr): 1615, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 1.8 (t, 3H, $J = 7$); 3.40 (m, 2H); 3.70 (t, 2H); 6.72 (m, 1H); 7.2 (m, 1H); 7.96 (s, 1H); 8.61 (s, 1H).

8-n-Butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (182)

resa 50%; solido giallo pallido; p.f. 245-247 °C (EtOAc-etero di petrolio); IR (KBr): 1610, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.9 (m, 3H); 1.3 (m, 2H); 1.9 (m, 2H); 4.5 (t, 2H, $J=7.2$); 6.2 (m, 1H); 7.3 (m, 1H); 8.0 (m, 1H); 8.9 (s, 1H); 9.4 (s, 1H).

Procedura generale per la preparazione di 5-Ammino-8-alcil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (187-190)



Una soluzione della triazolo pirimidina (**179-182**) (10 mmoli) in HCl acquoso al 10% (50 ml) e diossano (10 ml), viene portata a riflusso per 3 h. Quindi la soluzione è raffreddata e neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO₃ a 0°C. Gli amminotriazoli ottenuti (**183-186**) vengono estratti con EtOAc (3 x 20 ml), le fasi organiche vengono riunite, anidificate con Na₂SO₄ ed evaporate sotto vuoto. L'ammina così ottenuta (**183-186**) viene disciolta in 1-metil-2-pirrolidone (40 ml), e alla soluzione vengono aggiunti cianammide (60 mmoli) e acido p-toluensolfonico (15 mmoli). La miscela ottenuta viene quindi riscaldata a 160°C per 6 h. Dopo 6 h viene aggiunta altra porzione di cianammide (60 mmoli) e si scalda per tutta la notte. La soluzione viene poi diluita con AcOEt (80 ml) e il precipitato (eccesso di cianammide) viene allontanato per filtrazione; la fase organica viene quindi concentrata, lavata con acqua (3 x 30 ml) per allontanare l'eccesso di 1-metil-2-pirrolidone, anidrificata (Na₂SO₄) e concentrata sotto vuoto. Il residuo viene quindi purificato mediante cromatografia (AcOEt/etere di petrolio 2:1) per dare il prodotto desiderato (**187-190**).

5-Ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (187)

resa 53%; solido giallo; p.f. 223 °C; IR (KBr): 3500-2950, 1680, 1645, 1610, 1560, 1455 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.12 (s, 3H); 6.70 (m, 1H); 6.99 (bs, 2H); 7.18 (m, 1H); 7.81 (s, 1H); 8.42 (s, 1H).

5-Ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (188)

resa 65%; solido giallo; p.f. 235 °C; IR (KBr): 3430-2950, 1680, 1655, 1620, 1550, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.46 (t, 2H, J = 7); 4.30 (d, 2H, J = 7); 6.72 (m, 1H); 7.18 (m, 1H); 7.93 (bs, 2H); 7.93 (s, 1H); 8.62 (s, 1H).

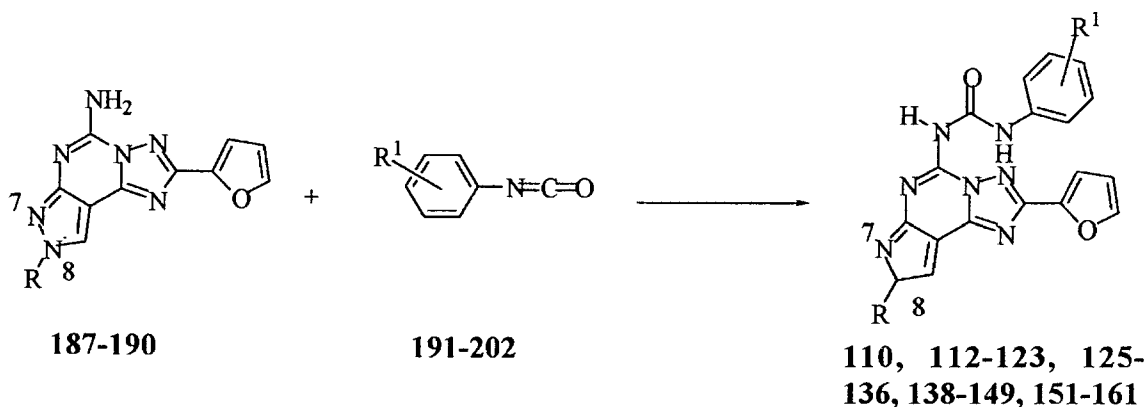
5-Ammino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (189)

resa 57%; solido giallo; p.f. 214 °C; IR (KBr): 3450-2980, 1680, 1650, 1620, 1550, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.8 (t, 3H, J = 7); 3.40 (m, 2H); 3.70 (t, 2H); 6.72 (m, 1H); 7.2 (m, 1H); 7.93 (bs, 2H); 7.96 (s, 1H); 8.61 (s, 1H).

5-Ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (190)

resa 47%; solido bianco; p.f. 241 °C; IR (KBr): 3500-2900, 1685, 1640, 1620, 1550, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.9 (t, 3H); 1.2 (m, 2H); 1.8 (m, 2H); 4.2 (t, 2H); 6.7 (m, 1H); 7.2 (m, 2H); 7.6 (s, 1H); 8.0 (s, 1H); 8.6 (s, 1H).

Procedure generali per la sintesi di 5-[[Fenilsostituito]ammino]carbonil]ammino-8-alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (110, 112-123, 125-136, 138-149, 151-161)



I composti amminici (187-190) (10 mmol) si sciolgono in THF (15 mL) e vengono aggiunti gli opportuni isocianati (191-202) (13 mmol). La miscela è portata a riflusso sotto argon per 18 ore. Il solvente viene poi allontanato a pressione ridotta e il residuo purificato mediante flash cromatografia (AcOEt:etere di petrolio 4:6) per dare i composti 110, 112-123, 125-136, 138-149, 151-161.

5-[[Fenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (110)

resa 90%, solido giallo; p.f. 165-167 °C; IR (KBr): 3255-2990, 1680, 1620, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.20 (s, 3H, N⁸-CH₃); 6.61 (dd, 2H, J=2, J = 4, 4-H Furano); 7.11-7.37 (m, 6H, C₆H₅ e 3-H Furano); 7.76 (d, 1H, J = 2, 5-H Furano); 8.15 (s, 1H, N⁸-CH); 8.67 (bs, 1H, CO-NH-Ph); 11.16 (bs, 1H, 5-NH-CO). Anal. (C₁₈H₁₄N₈O₂) C, H, N.

5-[[Fenil]ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (123)

resa 94%, solido giallo; p.f. 180 °C; IR (KBr): 3250-2985, 1675, 1610, 1510, 1460 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.67 (t, 3H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 4.47 (q, 2H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 6.62 (dd, 2H, $J=2$, $J=4$, 4-H Furano); 7.16-7.42 (m, 6H, C_6H_5 e 3-H Furano); 7.72 (d, 1H, $J=2$, 5-H Furano); 8.26 (s, 1H, $\text{N}^8\text{-CH}$); 8.61 (bs, 1H, CO-NH-Ph); 11.16 (bs, 1H, 5-NH-CO). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_2$) C, H, N.

5-[[Fenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (136)

resa 98%, solido giallo; p.f. 155 °C; IR (KBr): 3240-2985, 1674, 1615, 1510, 1470 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.00 (t, 3H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 2.02-2.13 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 4.36 (t, 2H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 6.62 (dd, 2H, $J=2$, $J=4$, 4-H Furano); 7.16-7.49 (m, 6H, C_6H_5 e 3-H Furano); 7.69 (d, 1H, $J=2$, 5-H Furano); 8.24 (s, 1H, $\text{N}^8\text{-CH}$); 8.61 (bs, 1H, CO-NH-Ph); 11.16 (bs, 1H, 5-NH-CO). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_2$) C, H, N.

5-[[Fenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (149)

resa 92%, solido bianco; p.f. 145 °C; IR (KBr): 3240-2980, 1675, 1610, 1500, 1470 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.96 (t, 3H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 1.30-1.41 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 1.98-2.06 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 4.39 (t, 2H, $J=7$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^8$); 6.62 (dd, 1H, $J=2$, $J=4$, 4-H Furano); 7.16-7.42 (m, 6H, C_6H_5 e 3-H Furano); 7.67 (d, 1H, $J=2$, 5-H Furano); 8.23 (s, 1H, $\text{N}^8\text{-CH}$); 8.62 (bs, 1H, CO-NH-Ph); 11.16 (bs, 1H, 5-NH-CO). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_2$) C, H, N.

5-[[3,4-Diclorofenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (112)

resa 94%, solido bianco; p.f. 204 °C; IR (KBr): 3245-2980, 1675, 1620, 1520, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.20 (s, 3H); 6.60 (dd, 1H, $J=2$, $J=4$); 7.22 (d, 1H, $J=4$); 7.35 (s, 1H);

7.47 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.63 (d, 1H, J=2); 7.88 (d, 1H, J=4); 8.21 (s, 1H); 8.61 (bs, 1H); 11.26 (bs, 1H). Anal. (C₁₈H₁₂N₈O₂Cl₂) C, H, N.

5-[[[(3,4-Metilendiossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (113)

resa 88%, solido bianco; p.f. 118-120 °C; IR (KBr): 3250-2990, 1678, 1615, 1520, 1450 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.21 (s, 3H); 6.02 (s, 2H); 6.61 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.20 (d, 1H, J=4); 7.33 (s, 1H); 7.41 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.71 (d, 1H, J=2); 7.80 (d, 1H, J=4); 8.22 (s, 1H); 8.73 (bs, 1H); 11.03 (bs, 1H). Anal. (C₁₉H₁₄N₈O₄) C, H, N.

5-[[[(4-Nitrofenil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (114)

resa 75%; solido giallo; p.f. 180 °C; IR (KBr): 3230-2890, 1668, 1625, 1600, 1535, 1500, 1350 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.24 (s, 3H); 6.61 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.26 (d, 1H, J=4); 7.87 (d, 2H, J=9); 7.95 (d, 1H, J=2); 8.21 (s, 1H); 8.33 (d, 2H, J=9); 8.87 (bs, 1H); 11.76 (bs, 1H). Anal. (C₁₈H₁₃N₉O₄) C, H, N.

5-[[[(4-Tolil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (115)

resa 85%; solido giallo chiaro; p.f. 195-197 °C; IR (KBr): 3245-2895, 1673, 1620, 1605, 1510 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 2.23 (s, 3H); 4.19 (s, 3H); 6.60 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.16 (d, 2H, J=9); 7.25 (d, 1H, J=4); 7.52 (d, 2H, J=9); 7.65 (d, 1H, J=2); 8.20 (s, 1H); 8.56 (bs, 1H); 11.04 (bs, 1H). Anal. (C₁₉H₁₆N₈O₂) C, H, N.

5-[[[(4-Bromofenil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (116)

resa 80%; solido bianco; p.f. >300 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1668, 1615, 1600, 1520 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.13 (s, 3H); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.30 (d, 1H, J=4); 7.55 (s, 4H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.78 (s, 1H); 9.82 (bs, 1H); 10.72 (bs, 1H). Anal. (C₁₈H₁₃N₈O₂Br) C, H, N.

5-[[[4-Fluorofenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (117)

resa 87%; solido bianco; p.f. >300 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1668, 1615, 1600, 1520 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.18 (s, 3H); 6.79 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.22 (d, 2H, J=9); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.62 (d, 2H, J=9); 8.01 (d, 1H, J=2); 8.80 (s, 1H); 9.78 (bs, 1H); 10.63 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}$) C, H, N.

5-[[[4-Trifluorometilfenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (118)

resa 91%; solido bianco; p.f. 203 °C; IR (KBr): 3240-2895, 1674, 1610, 1590, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.15 (s, 3H); 6.78 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.25 (d, 1H, J=4); 7.77 (s, 4H); 8.00 (d, 1H, J=2); 8.78 (s, 1H); 9.97 (bs, 1H); 10.91 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}_3$) C, H, N.

5-[[[2-Metossifenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (119)

resa 91%; solido bianco; p.f. >300 °C; IR (KBr): 3240-2895, 1674, 1610, 1590, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.01 (s, 3H); 4.15 (s, 3H); 6.75 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.97-7.10 (m, 3H); 7.32 (d, 1H, J=4); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.21 (d, 1H, J=7.5); 8.79 (s, 1H); 9.61 (bs, 1H); 11.52 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[3-Metossifenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (120)

resa 86%; solido bianco; p.f. 205 °C; IR (KBr): 3240-2890, 1670, 1615, 1595, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.77 (s, 3H); 4.13 (s, 3H); 6.70 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.75-7.77 (m, 1H); 7.02 (dd, 1H, J=2, J=6); 7.26 (d, 1H, J=4); 7.27-7.32 (m, 2H); 7.98 (d, 1H, J=2); 8.78 (s, 1H); 8.79 (s, 1H); 9.65 (bs, 1H); 10.62 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[2-Clorofenil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (121)

resa 97%; solido bianco; p.f. >300 °C; IR (KBr): 3245-2880, 1673, 1620, 1600, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.14 (s, 3H); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.19 (dd, 1H, J=2, J=8); 7.21-7.44 (m, 2H); 7.55 (dd, 1H, J=2, J=8); 8.00 (d, 1H, J=2); 8.34 (d, 1H, J=8); 8.80 (s, 1H); 9.95 (bs, 1H); 11.55 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[[(4-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (122)

resa 93%; solido bianco; p.f. 225 °C; IR (KBr): 3235-2890, 1668, 1610, 1600, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.14 (s, 3H); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.30 (d, 1H, J=4); 7.44 (d, 2H, J=8); 7.60 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.79 (s, 1H); 9.82 (bs, 1H); 10.72 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[[(3,4-Diclorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (125)

resa 86%, solido bianco; p.f. 185-188 °C; IR (KBr): 3240-2985, 1678, 1615, 1510, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.71 (t, 3H, J=7); 4.47 (q, 2H, J=7); 6.62 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.26 (d, 1H, J=4); 7.41 (s, 1H); 7.51 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.67 (d, 1H, J=2); 7.93 (d, 1H, J=4); 8.27 (s, 1H); 8.63 (bs, 1H); 11.31 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}_2$) C, H, N.

5-[[[(3,4-Metilendiossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (126)

resa 85%, solido bianco; p.f. 124-126 °C; IR (KBr): 3240-2975, 1675, 1600, 1510, 1460 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.67 (t, 3H, J=7); 4.41 (q, 2H, J=7); 5.98 (s, 2H); 6.62 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.26 (d, 1H, J=4); 7.37 (s, 1H); 7.43 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.79 (d, 1H, J=2); 7.87 (d, 1H, J=4); 8.21 (s, 1H); 8.55 (bs, 1H); 11.01 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[[(4-Nitrofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (127)

resa 70%; solido giallo chiaro; p.f. 185 °C; IR (KBr): 3240-2895, 1670, 1615, 1600, 1530, 1510, 1345 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.49 (t, 3H, J=7); 4.51 (q, 2H, J=7); 6.64 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.29 (d, 1H, J=4); 7.65 (d, 1H, J=2); 7.91 (d, 2H, J=9); 8.27 (d, 2H, J=9); 8.77 (s, 1H); 9.24 (bs, 1H); 11.54 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_9\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[[(4-Tolil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (128)

resa 80%; solido giallo chiaro; p.f. 175-178 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1670, 1615, 1600, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.66 (t, 3H, J=7); 2.34 (s, 3H); 4.45 (q, 2H, J=7); 6.61 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.17 (d, 2H, J=9); 7.21 (d, 1H, J=4); 7.58 (d, 2H, J=9); 7.65 (d, 1H, J=2); 8.25 (s, 1H); 8.60 (bs, 1H); 11.04 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_2$) C, H, N.

5-[[[(4-Bromofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (129)

resa 78%; solido giallo chiaro; p.f. 220 °C; IR (KBr): 3230-2880, 1675, 1620, 1600, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.50 (t, 3H, J=7); 4.42 (q, 2H, J=7); 6.75 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.29 (d, 1H, J=4); 7.46 (s, 4H); 7.98 (d, 1H, J=2); 8.86 (s, 1H); 9.80 (bs, 1H); 10.71 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_8\text{O}_2\text{Br}$) C, H, N.

5-[[[(4-Fluorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (130)

resa 92%; solido giallo chiaro; p.f. 200°C; IR (KBr): 3245-2895, 1675, 1610, 1600, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.49 (t, 3H, J=7); 4.42 (q, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.23 (d, 2H, J=9); 7.27 (d, 1H, J=4); 7.62 (d, 2H, J=9); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.70 (bs, 1H); 10.64 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}$) C, H, N.

5-[[[(4-Trifluorometilfenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (131)

resa 88%; solido giallo chiaro; p.f. 180 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1670, 1615, 1570, 1500 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.52 (t, 2H, J=7); 4.41 (q, 2H, J=7); 6.77 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.29 (d, 1H, J=4); 7.76 (s, 4H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.98 (bs, 1H); 10.87 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}_3$) C, H, N.

5-[[[(2-Metossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (132)

resa 97%; solido giallo chiaro; p.f. 128 °C; IR (KBr): 3243-2887, 1672, 1610, 1570, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.58 (t, 3H, J=7); 4.01 (s, 3H); 4.43 (q, 2H, J=7); 6.81 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.94-7.18 (m, 3H); 7.38 (d, 1H, J=4); 8.01 (d, 1H, J=2); 8.23 (d, 1H, J=7.5); 8.85 (s, 1H); 9.64 (bs, 1H); 11.73 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[(3-Metossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (133)

resa 89%; solido giallo chiaro; p.f. 178 °C; IR (KBr): 3245-2890, 1675, 1617, 1595, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.51 (t, 3H, J=7); 3.78 (s, 3H); 4.44 (q, 2H, J=7); 6.68 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.75-7.77 (m, 1H); 7.04 (dd, 1H, J=2, J=6); 7.26-7.32 (m, 2H); 7.98 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.71 (bs, 1H); 10.61 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[(2-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (134)

resa 93%; solido bianco; p.f. 127 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1670, 1618, 1600, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.51 (t, 3H, J=7); 4.45 (q, 2H, J=7); 6.77 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.18 (dd, 1H, J=2, J=8); 7.23-7.49 (m, 2H); 7.59 (dd, 1H, J=2, J=8); 8.09 (d, 1H, J=2); 8.33 (d, 1H, J=8); 8.87 (s, 1H); 9.97 (bs, 1H); 11.51 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[[(4-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (135)

resa 88%; solido bianco; p.f. 220 °C; IR (KBr): 3240-2890, 1671, 1620, 1605, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.51 (t, 3H, J=7); 4.43 (q, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.44 (d, 2H, J=8); 7.60 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.81 (bs, 1H); 10.71 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[3,4-Diclorofenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (138)

resa 83%, solido bianco; p.f. 208 °C; IR (KBr): 3237-2980, 1675, 1610, 1500, 1465 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.00 (t, 3H, J=7); 2.04-2.12 (m, 2H); 4.37 (t, 2H, J=7); 6.61 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.27 (d, 1H, J=4); 7.43 (s, 1H); 7.52 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.71 (d, 1H, J=2); 7.92 (d, 1H, J=4); 8.26 (s, 1H); 8.61 (bs, 1H); 11.41 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}_2$) C, H, N.

5-[[3,4-Metilendiossifenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (139)

resa 82%, solido bianco; p.f. 111-113 °C; IR (KBr): 3240-2985, 1676, 1600, 1515, 1470 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.03 (t, 3H, J=7); 2.09-2.13 (m, 2H); 4.40 (t, 2H, J=7); 6.02 (s, 2H); 6.63 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.35 (s, 1H); 7.41 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.71 (d, 1H, J=2); 7.80 (d, 1H, J=4); 8.24 (s, 1H); 8.68 (bs, 1H); 11.09 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[4-Nitrofenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (140)

resa 72%; solido giallo; p.f. 190 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1664, 1605, 1535, 1500, 1340 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.01 (t, 3H, J=7); 2.05-2.10 (m, 2H); 4.37 (t, 2H, J=7); 6.65 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.25 (d, 1H, J=4); 7.53 (d, 1H, J=2); 7.87 (d, 2H, J=9); 8.25 (d, 2H, J=9); 8.61 (s, 1H); 9.10 (bs, 1H); 11.74 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_9\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[4-Tolil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (141)

resa 83%; solido giallo chiaro; p.f. 181-184 °C; IR (KBr): 3245-2895, 1672, 1615, 1600, 1515 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 1.01 (t, 3H, J=7); 2.03-2.12 (m, 2H); 2.32 (s, 3H); 4.34 (t, 2H, J=7); 6.62 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.07 (d, 2H, J=9); 7.11 (d, 1H, J=4); 7.54 (d, 2H, J=9); 7.65 (d, 1H, J=2); 8.22 (s, 1H); 8.63 (bs, 1H); 11.02 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_2$) C, H, N.

5-[[[4-Bromofenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (142)

resa 76%; solido giallo chiaro; p.f. 225 °C; IR (KBr): 3240-2895, 1673, 1615, 1590, 1510 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.87 (t, 3H, J=7); 1.92-1.98 (m, 2H); 4.35 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.48 (s, 4H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.84 (bs, 1H); 10.79 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_2\text{Br}$) C, H, N.

5-[[[4-Fluorofenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (143)

resa 90%; solido giallo chiaro; p.f. 193 °C; IR (KBr): 3235-2890, 1673, 1610, 1600, 1515 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.99 (t, 3H, J=7); 1.94-2.01 (m, 2H); 4.18 (t, 2H, J=7); 6.78 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.19 (d, 2H, J=9); 7.24 (d, 1H, J=4); 7.60 (d, 2H, J=9); 7.98 (d, 1H, J=2); 8.79 (s, 1H); 10.15 (bs, 1H); 10.78 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}$) C, H, N.

5-[[[4-Trifluorometilfenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (144)

resa 78%; solido giallo chiaro; p.f. 202 °C; IR (KBr): 3245-2895, 1670, 1615, 1570, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.95 (t, 3H, J=7); 1.90-2.01 (m, 2H); 4.40 (t, 2H, J=7); 6.79 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.31 (d, 1H, J=4); 7.76 (s, 4H); 8.01 (d, 1H, J=2); 8.87 (s, 1H); 9.95 (bs, 1H); 10.83 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_2\text{F}_3$) C, H, N.

5-[[[2-Metossifenil]ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (145)

resa 95%; solido bianco; p.f. 195 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1675, 1605, 1575, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.90 (t, 3H, J=7); 1.91-2.02 (m, 2H); 4.02 (s, 3H); 4.37 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.97-7.11 (m, 3H); 7.31 (d, 1H, J=4); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.22 (d, 1H, J=7.5); 8.86 (s, 1H); 9.62 (bs, 1H); 11.64 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[3-Metossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (146)

resa 85%; solido giallo chiaro; p.f. 175 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1674, 1613, 1600, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.87 (t, 3H, J=7); 1.88-1.98 (m, 2H); 3.77 (s, 3H); 4.35 (q, 2H, J=7); 6.69 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.76-6.89 (m, 1H); 7.02 (dd, 1H, J=2, J=6); 7.28-7.33 (m, 2H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.71 (bs, 1H); 10.59 (bs, 1H).). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_3$) C, H, N.

5-[[[2-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (147)

resa 99%; solido bianco; p.f. 185 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1665, 1610, 1600, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.88 (t, 3H, J=7); 1.87-1.98 (m, 2H); 4.36 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.16 (dd, 1H, J=2, J=8); 7.20-7.51 (m, 2H); 7.60 (dd, 1H, J=2, J=8); 8.00 (d, 1H, J=2); 8.31 (d, 1H, J=8); 8.86 (s, 1H); 10.01 (bs, 1H); 11.50 (bs, 1H).). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[[4-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (148)

resa 84%; solido giallo chiaro; p.f. 216 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1673, 1610, 1600, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.87 (t, 3H, J=7); 1.86-1.98 (m, 2H); 4.35 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.29 (d, 1H, J=4); 7.41 (d, 2H, J=8); 7.55 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.79 (bs, 1H); 10.70 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}$) C, H, N.

5-[[[3,4-Diclorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (151)

resa 80%, solido bianco; p.f. 205-206 °C; IR (KBr): 3239-2975, 1673, 1600, 1510, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.93 (t, 3H, J=7); 1.24-1.31 (m, 2H); 1.89-2.02 (m, 2H); 4.40 (t, 2H, J=7); 6.70 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.29 (d, 1H, J=4); 7.47 (s, 1H); 7.62 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.81 (d, 1H, J=2); 7.91 (d, 1H, J=4); 8.86 (s, 1H); 9.98 (bs, 1H); 10.84 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_2\text{Cl}_2$) C, H, N.

5-[[[(3,4-Metilendiossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (152)

resa 85%, solido bianco; p.f. 115-117 °C; IR (KBr): 3245-2990, 1672, 1605, 1515, 1475 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.83 (t, 3H, J=7); 1.25-1.41 (m, 2H); 1.97-2.04 (m, 2H); 4.38 (t, 2H, J=7); 5.97 (s, 2H); 6.60 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.23 (d, 1H, J=4); 7.31 (s, 1H); 7.42 (dd, 1H, J=4); 7.65 (d, 1H, J=2); 7.78 (d, 1H, J=4); 8.22 (s, 1H); 8.58 (bs, 1H); 10.99 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[[(4-Nitrofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (153)

resa 73%; solido giallo; p.f. 195 °C; IR (KBr): 3250-2895, 1670, 1600, 1535, 1500, 1345 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.99 (t, 3H, J=7); 1.24-1.37 (m, 2H); 1.98-2.09 (m, 2H); 4.39 (t, 2H, J=7); 6.62 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.25 (d, 1H, J=4); 7.48 (d, 1H, J=2); 7.86 (d, 2H, J=9); 8.26 (d, 2H, J=9); 8.74 (s, 1H); 10.05 (bs, 1H); 11.77 (bs, 1H). Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_9\text{O}_4$) C, H, N.

5-[[[(4-Tolil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (154)

resa 86%; solido giallo chiaro; p.f. 175-177 °C; IR (KBr): 3240-2885, 1675, 1605, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.98 (t, 3H, J=7); 1.25-1.37 (m, 2H); 2.01-2.12 (m, 2H); 2.34 (s, 3H); 4.35 (t, 2H, J=7); 6.61 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.15 (d, 2H, J=9); 7.22 (d, 1H, J=4); 7.55 (d, 2H,

J=9); 7.65 (d, 1H, J=2); 8.22 (s, 1H); 8.57 (bs, 1H); 11.03 (bs, 1H). Anal. (C₂₂H₂₂N₈O₂) C, H, N.

5-[[[(4-Bromofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (155)

resa 71%; solido bianco; p.f. 227 °C; IR (KBr): 3235-2885, 1675, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.95-2.01 (m, 2H); 4.43 (t, 2H, J=7); 6.75 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.43 (s, 4H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.85 (bs, 1H); 10.77 (bs, 1H). Anal. (C₂₁H₁₉N₈O₂Br) C, H, N.

5-[[[(4-Fluorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (156)

resa 93%; solido bianco; p.f. 207 °C; IR (KBr): 3245-2885, 1675, 1600, 1505 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.22-1.33 (m, 2H); 1.86-1.93 (m, 2H); 4.39 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.16 (d, 2H, J=9); 7.23 (d, 1H, J=4); 7.58 (d, 2H, J=9); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.72 (bs, 1H); 10.63 (bs, 1H). Anal. (C₂₁H₁₉N₈O₂F) C, H, N.

5-[[[(4-Trifluorometilfenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (157)

resa 72%; solido bianco; p.f. 221 °C; IR (KBr): 3230-2885, 1677, 1625, 1570, 1505 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.18-1.28 (m, 2H); 1.81-1.90 (m, 2H); 4.39 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.30 (d, 1H, J=4); 7.76 (s, 4H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.93 (bs, 1H); 10.85 (bs, 1H). Anal. (C₂₂H₁₉N₈O₂F₃) C, H, N.

5-[[[(2-Metossifenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (158)

resa 97%; solido bianco; p.f. 186 °C; IR (KBr): 3230-2880, 1670, 1615, 1575, 1510 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.93 (t, 3H, J=7); 1.23-1.32 (m, 2H); 1.80-1.93 (m, 2H); 4.02 (s, 3H); 4.41 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.94-7.08 (m, 3H); 7.31 (d, 1H, J=4); 7.99 (d, 1H,

J=2); 8.22 (d, 1H, J=7.5); 8.86 (s, 1H); 9.62 (bs, 1H); 11.24 (bs, 1H). Anal. (C₂₂H₂₂N₈O₃) C, H, N.

5-[[[(3-Metossifenil)amino]carbonyl]amino-8-n-butyl-2-(2-furyl)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (159)

resa 88%; solido giallo chiaro; p.f. 185 °C; IR (KBr): 3243-2885, 1672, 1605, 1515 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.22-1.33 (m, 2H); 1.86-1.98 (m, 2H); 3.77 (s, 3H); 4.39 (q, 2H, J=7); 6.66 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.75-6.82 (m, 1H); 7.03 (dd, 1H, J=2, J=6); 7.25-7.33 (m, 2H); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.84 (s, 1H); 9.71 (bs, 1H); 10.59 (bs, 1H). Anal. (C₂₂H₂₂N₈O₃) C, H, N.

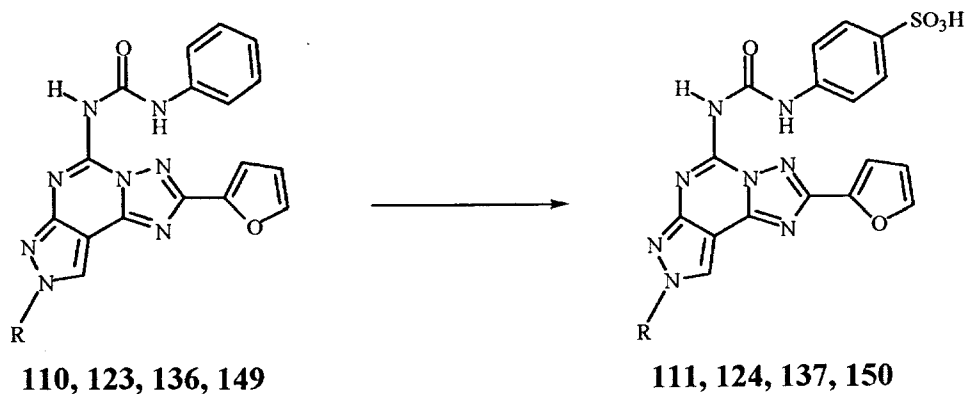
5-[[[(2-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butyl-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (160)

resa 93%; solido bianco; p.f. 185 °C; IR (KBr): 3238-2890, 1673, 1605, 1515 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.90 (t, 3H, J=7); 1.23-1.34 (m, 2H); 1.76-1.97 (m, 2H); 4.40 (t, 2H); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.15 (dd, 1H, J=2, J=8); 7.21-7.54 (m, 2H); 7.60 (dd, 1H, J=2, J=8); 8.00 (d, 1H, J=2); 8.32 (d, 1H, J=8); 8.87 (s, 1H); 9.97 (bs, 1H); 11.50 (bs, 1H). Anal. (C₂₁H₁₉N₈O₂Cl) C, H, N.

5-[[[(4-Clorofenil)ammino]carbonil]ammino-8-n-butyl-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (161)

resa 81%; solido bianco; p.f. 210 °C; IR (KBr): 3230-2880, 1675, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.18-1.31 (m, 2H); 1.89-2.05 (m, 2H); 4.39 (t, 2H, J=7); 6.76 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.42 (d, 2H, J=8); 7.58 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.85 (s, 1H); 9.81 (bs, 1H); 10.75 (bs, 1H). Anal. (C₂₁H₁₉N₈O₂Cl) C, H, N.

Procedure generali per la sintesi di derivati dell'acido 4-[3-(2-Furan-2-il-8-alchil-8H-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-benzenesolfonico (111, 124, 137, 150)



I derivati arilcarbamoilici(110, 123, 136, 149) (0.35 mmol) vengono addizionati in piccole porzioni, nell'arco di 20 minuti, ad una soluzione raffreddata a 0°C di acido clorosolfonico (2 mL). Si agita per 4 ore, mantenendo la temperatura a 0°C, quindi si aggiunge lentamente acqua (15 mL) sempre alla medesima temperatura. Si filtra il precipitato bianco (derivato clorosolfonico), si scioglie in diossano (2 mL) e si tratta con HCl al 10%; si lascia la soluzione a temperatura ambiente per 2 giorni. Si elimina quindi il solvente a pressione ridotta e si purifica il derivato, mediante HPLC preparativa, in 25 min ad una velocità di flusso pari a 30 mL/min (colonna in fase inversa; gradiente di eluizione 0-60% del solvente B), per dare i composti desiderati (111, 124, 137, 150) come solidi.

Acido 4-[3-(2-Furan-2-il-8-metil-8H-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-benzenesolfonico (111)

resa 65%; solido bianco; p.f. 255 °C; IR (KBr): 3550-2800, 1675, 1610, 1515, 1350, 1155 cm⁻¹;

¹H NMR (D₂O) δ: 4.55 (s, 3H); 6.67 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.81 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.09 (d, 2H, J=8); 8.53 (s, 1H). Anal. (C₁₈H₁₄N₈O₅S) C, H, N.

Acido 4-[3-(2-Furan-2-il-8-etil-8*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-benzenesolfonico (124)

resa 58%; solido bianco; p.f. 225 °C; IR (KBr): 3520-2830, 1670, 1615, 1515, 1347, 1150 cm⁻¹; ¹H NMR (D₂O) δ: 1.83 (t, 3H, J=7); 4.58 (q, 2H, J=7); 6.69 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.28 (d, 1H, J=4); 7.89 (d, 2H, J=8); 8.01 (d, 1H, J=2); 8.15 (d, 2H, J=8); 8.46 (s, 1H). Anal. (C₁₉H₁₆N₈O₅S) C, H, N.

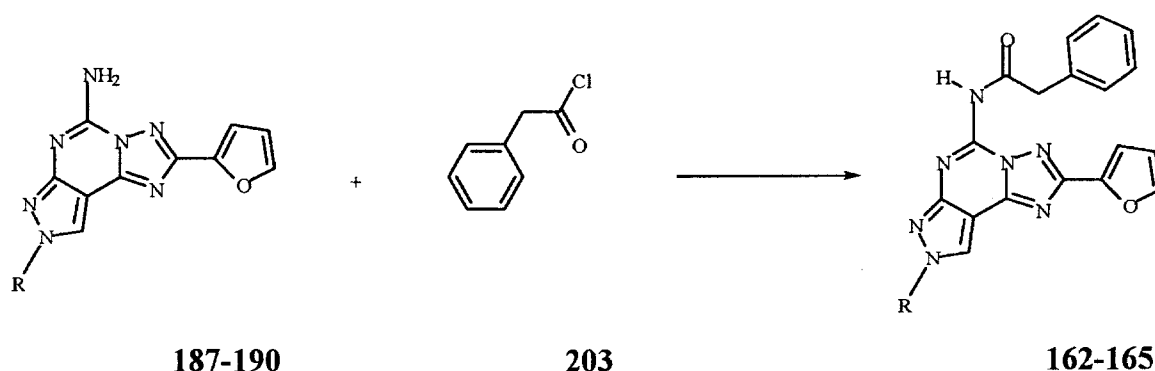
Acido 4-[3-(2-Furan-2-il-8-propil-8*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-benzenesolfonico (137)

resa 62%; solido bianco; p.f. 235 °C; IR (KBr): 3530-2880, 1674, 1625, 1510, 1351, 1155 cm⁻¹; ¹H NMR (D₂O) δ: 0.90 (t, 3H, J=7); 1.66-1.93 (m, 2H); 4.18 (q, 2H, J=7); 6.64 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.19 (d, 1H, J=4); 7.95 (d, 2H, J=8); 8.02 (d, 1H, J=2); 8.12 (d, 2H, J=8); 8.27 (s, 1H). Anal. (C₂₀H₁₈N₈O₅S) C, H, N.

Acido 4-[3-(2-Furan-2-il-8-butil-8*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-benzenesolfonico (150)

resa 57%; solido bianco; p.f. 240-241 °C; IR (KBr): 3550-2900, 1672, 1618, 1510, 1348, 1153 cm⁻¹; ¹H NMR (D₂O) δ: 0.91 (t, 3H, J=7); 1.27-1.34 (m, 2H); 1.73-1.90 (m, 2H); 4.20 (q, 2H, J=7); 6.60 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.21 (d, 1H, J=4); 7.92 (d, 2H, J=8); 7.99 (d, 1H, J=2); 8.25 (d, 2H, J=8); 8.27 (s, 1H). Anal. (C₂₁H₂₀N₈O₅S) C, H, N.

Procedure generali per la preparazione di 5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-alcil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (162-165)



I composti amminici (**187-190**) (10 mmol) vengono disciolti in THF distillato di fresco (15 mL) e si aggiungono fenilacetilcloruro (**203**) (13 mmol) e trietilammina (13 mmol). Si lascia a riflusso sotto argon per 18 ore. Si allontana il solvente a pressione ridotta, si riprende con AcOEt (30 ml) e si lava due volte con acqua (15 mL). Le fasi organiche vengono anidificate su Na₂SO₄ e concentrate. Il residuo viene purificato tramite flash cromatografia (AcOEt-Etere di petrolio 4:6) per dare i composti come solidi.

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (162)

resa 85%; solido giallo; p.f. 198-200 °C; IR (KBr): 3255-2930, 1673, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 4.12 (s, 3H); 4.48 (s, 2H); 6.60 (m, 1H); 7.15-7.17 (m, 1H); 7.26-7.39 (m, 5H); 7.64 (s, 1H); 8.22 (s, 1H); 9.11 (bs, 1H). Anal. (C₁₉H₁₅N₇O₂) C, H, N.

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (163)

resa 78%; solido giallo scuro; p.f. 106-108 °C; IR (KBr): 3245-2950, 1675, 1615, 1600, 1530 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 1.3 (t, 3H, J = 7); 4.15 (t, 2H, J = 7); 4.40 (s, 2H); 6.62 (m, 1H); 7.18-7.20 (m, 1H); 7.25-7.33 (m, 5H); 7.66 (s, 1H); 8.25 (s, 1H); 9.21 (bs, 1H). Anal. (C₂₀H₁₇N₇O₂) C, H, N.

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (164)

resa 78%; solido giallo; p.f. 101-103 °C; IR (KBr): 3250-2955, 1680, 1620, 1600, 1530 cm⁻¹;

¹H NMR (DMSO d₆) δ: 0.87 (t, 3H, J=7); 1.88-1.98 (m, 2H); 4.35 (t, 2H, J = 7); 4.45 (s, 2H); 6.60 (m, 1H); 7.16-7.19 (m, 1H); 7.25-7.33 (m, 5H); 7.69 (s, 1H); 8.20 (s, 1H); 9.19 (bs, 1H).

Anal. (C₂₁H₁₉N₇O₂) C, H, N.

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (165)

resa 78%; solido giallo; p.f. 101 °C; IR (KBr): 3250-2900, 1678, 1615, 1525 cm⁻¹; ¹H NMR

(DMSO d₆) δ: 0.92 (t, 3H, J=7); 1.21-1.34 (m, 2H); 1.88-2.02 (m, 2H); 4.38 (t, 2H, J = 7); 4.51 (s, 2H); 6.58 (m, 1H); 7.15-7.17 (m, 1H); 7.24-7.38 (m, 5H); 7.64 (s, 1H); 8.23 (s, 1H);

9.18 (bs, 1H). Anal. (C₂₂H₂₁N₇O₂) C, H, N.

4. ANTAGONISTI PER IL RECETTORE hA₃ SOLUBILI IN ACQUA

4.1. INTRODUZIONE

Uno dei principali limiti delle pirazolo-triazolo-pirimidine è rappresentato dalla loro scarsa solubilità in acqua; infatti, il composto privo di sostituenti sull'anello aromatico (110), e con il gruppo ottimale in N8, pur dimostrando buona affinità e selettività verso il sottotipo hA₃, risulta essere praticamente insolubile in acqua (R_m pari a 4.06); questo, ovviamente, ne ostacola fortemente l'impiego come tool farmacologico.

Al fine di superare tale limite, si è pensato di fissare il metile in N8 e di introdurre dei gruppi polari in posizione *para* nell'anello aromatico, oppure di ricorrere alla sostituzione bioisosterica del fenile col nucleo piridinico (204-209). Nel primo caso, è stato precedentemente riportato che, quando è presente il gruppo -SO₃H in 4 (111), si ottengono buoni risultati in termini di solubilità, ma si verifica una significativa riduzione di affinità (150-300 volte) nei confronti di hA₃ (Tabella 12). Invece nel secondo caso (Tabella 13), la presenza di un centro basico aumenta di per sé la solubilità del composto (204, 206, 208), e inoltre, mediante il corrispondente cloridrato (205, 207, 209), si può ulteriormente incrementare l'affinità per i solventi polari.

Tabella 12. Affinità di binding sui recettori hA₁, hA_{2A}, hA_{2B} e hA₃ e solubilità dei composti

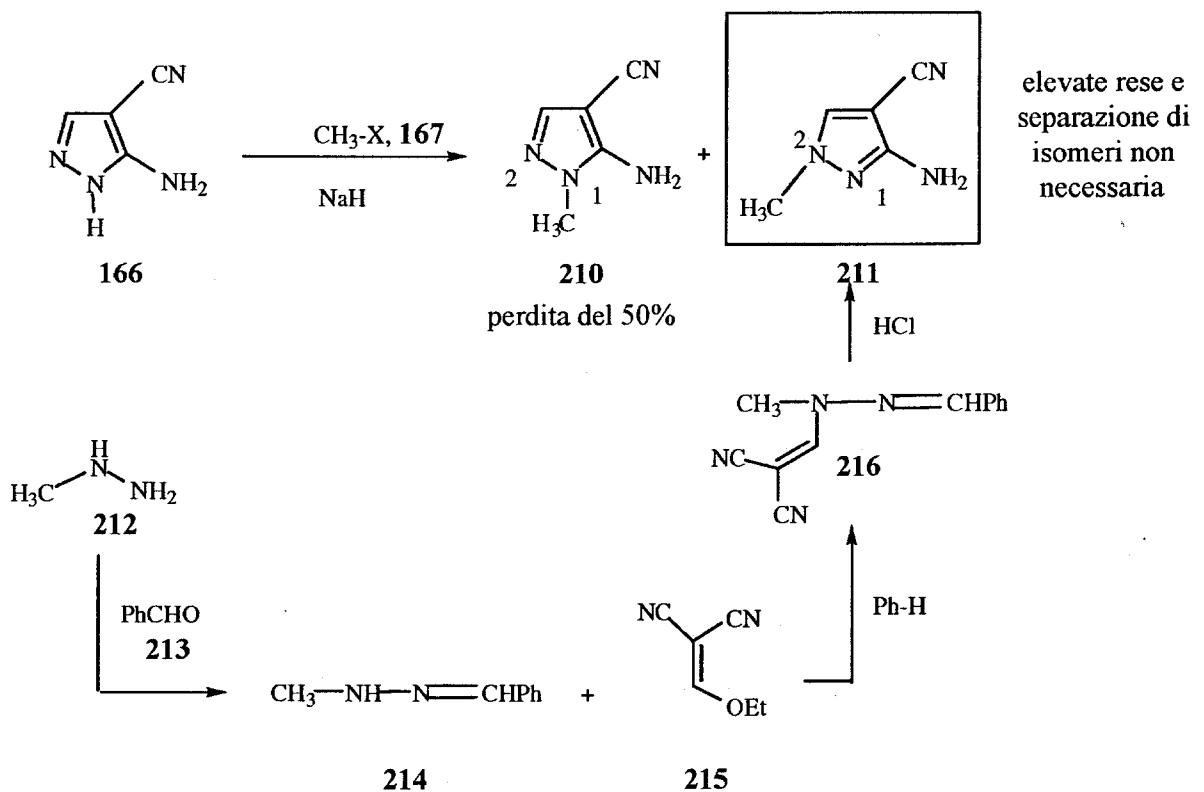
Composti	R _m (0) ^a	hA ₁ (K _i , nM) ^b	hA _{2A} (K _i , nM) ^c	hA _{2B} (K _i , nM) ^d	hA ₃ (K _i , nM) ^e	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
110	3.06 ± 0.06	250 ± 23	60 ± 10	200 ± 16	0.04 ± 0.009	6,250	1,500	5,000
111	2.29 ± 0.05	350 ± 22	100 ± 12	250 ± 24	0.01 ± 0.005	35,000	10,000	25,000

^aI valori di R_m dei composti (110,111) sono stati determinati con una fase mobile a differenti concentrazioni di MeOH/H₂O. I valori di R_m sono stati estrapolati alla concentrazione teorica del solvente organico pari allo 0% (R_m(0)). ^bSpiazzamento del legame specifico di [³H]-DPCPX dai recettori umani A₁ espressi su cellule CHO (n=3-6). ^cSpiazzamento del legame specifico di [³H]-ZM 241385 dai recettori umani A_{2A} espressi in cellule HEK-293. ^dSpiazzamento del legame specifico di [³H]-DPCPX dai recettori umani A_{2B} espressi in cellule HEK-293 (n=3-6). ^eSpiazzamento del legame specifico di [³H]MRE3008-F20 dai recettori umani A₃ espressi in cellule HEK-293. I dati sono espressi come K_i ± SEM in nM (n=3-6).

4. 2. CHIMICA

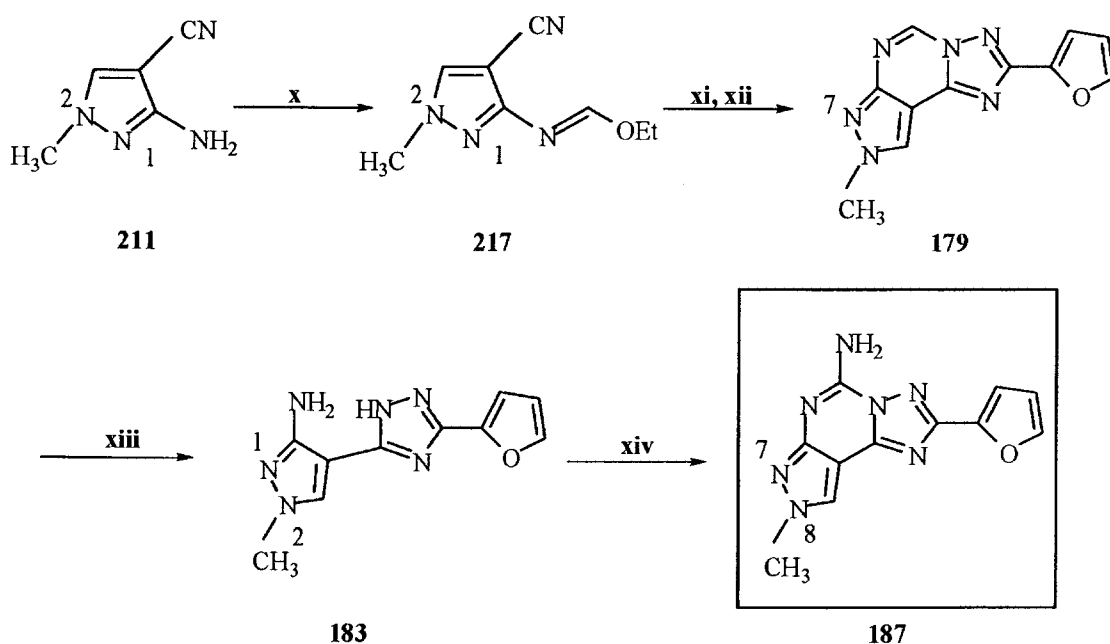
Come visto nel precedente capitolo, la classica alchilazione del 5-ammino-4-cianopirazolo, con l'opportuno alogenuro alchilico, comporta una miscela di due isomeri in rapporto N1:N2 pari a 1:4 in favore del composto di interesse; purtroppo, nel caso dell'alchilazione con il metilioduro, tale rapporto è di 1:1, con conseguente perdita del 50% di prodotto; risulta perciò più conveniente ricorrere ad un'altra procedura, che prevede la protezione della metilidrazina (212) di partenza con benzaldeide (213), trattamento con etossimetilenemalononitrile (214) a cui segue l'idrolisi in HCl, in modo da ottenere solamente il 2-derivato in buona resa e senza la necessità di una separazione cromatografica (Schema 4).¹⁷

Schema 4



Le reazioni successive riprendono, invece, la metodica tradizionale, per cui, per successivo riscaldamento con trietilortofornato, reazione con idrazide dell'acido 2-furoico in 2-metossietanolo, ciclizzazione termica con difenil etero, idrolisi ed infine reazione con cianammide, si ottiene il nucleo delle pirazolo-triazolo-pirimidine (**Schema 5**).

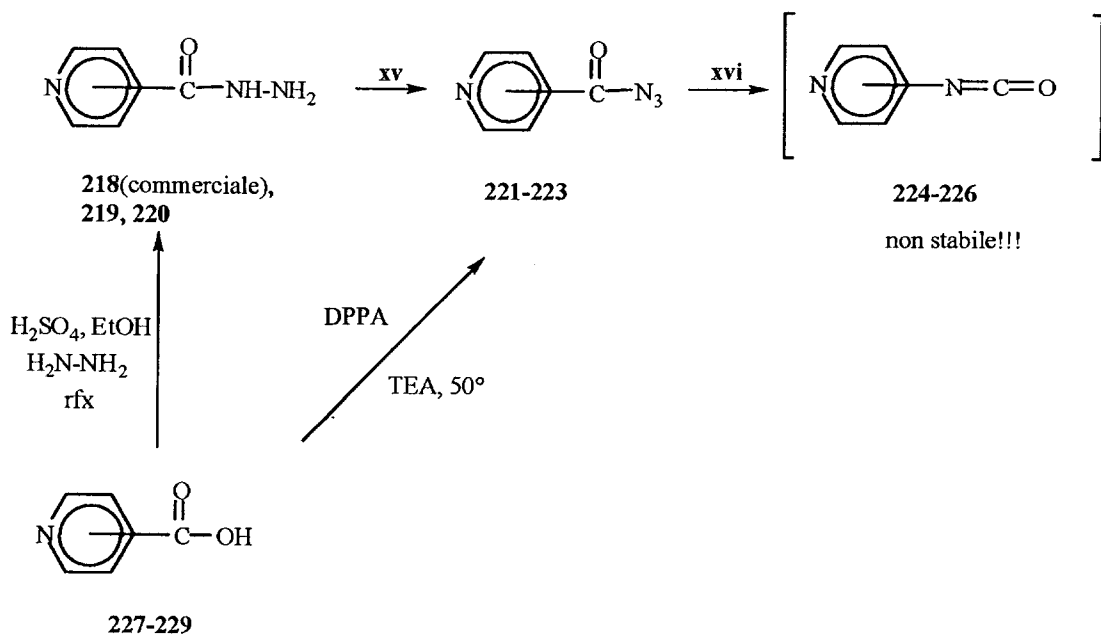
Schema 5



Reagenti: **x)** $HC(OEt)_3$, refluxo; **xi)** idrazide dell'acido 2-furoico, $MeO(CH_2)_2OH$; **xii)** Ph_2O , $260^\circ C$; **xiii)** HCl , refluxo; **xiv)** NH_2CN , 1-metil-2-pirrolidone, $pTsOH$, $140^\circ C$

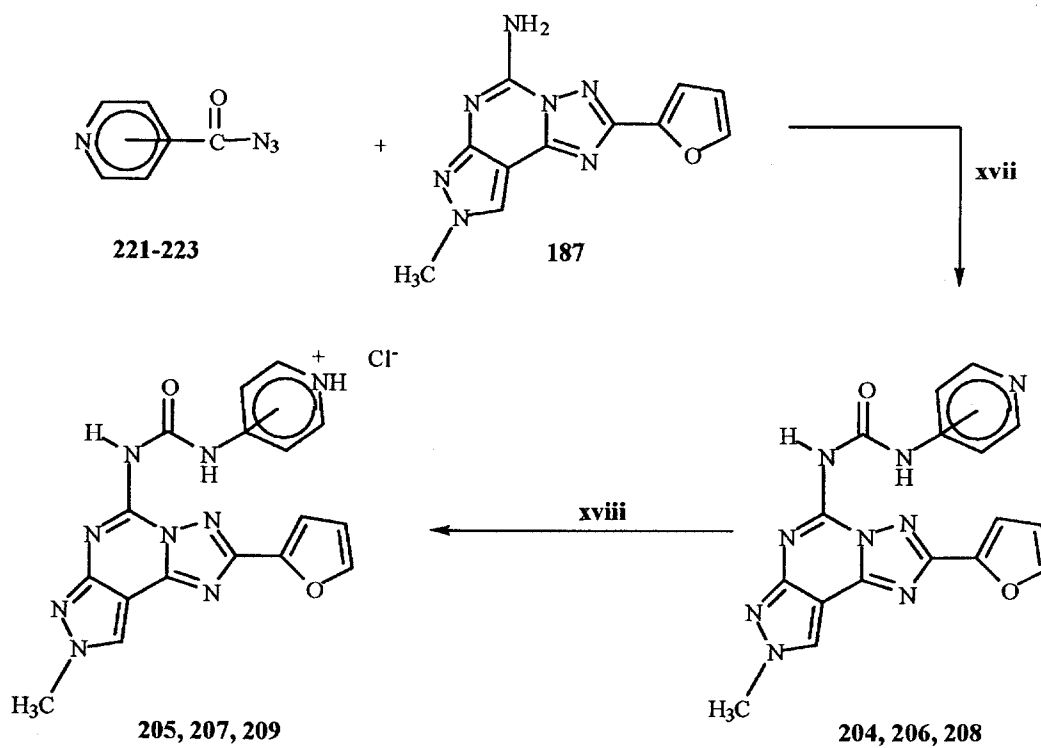
La maggior difficoltà è stata riscontrata nella sintesi del piridil isocianato **224-226** (**Schema 6**), che non può essere ottenuto mediante la classica reazione della corrispondente ammina con fosgene. Si è perciò ricorsi alla isonicotinoilidrazide **218** (disponibile commercialmente) o ai derivati **219**, **220**, i quali, mediante reazione con nitrito di sodio in condizioni acide, consentono di ottenere l'acilazide **221-223**. Quest'ultima va incontro al riarrangiamento di Curtius in seguito a riscaldamento per 2 ore in benzene anidro.^{169, 170}

Schema 6



Reagenti: xv): NaNO_2 , HCl acq, 0°C , 1h; xvi): benzene, riflusso, 2 ore

Schema 7



Reagenti: xvii): THF riflusso overnight; xviii): HCl/MeOH , 0°C , 30 min

Un metodo alternativo prevede di partire dal corrispondente acido **227-229** che, per reazione con difenilfosforilazide (DPPA) in trietilammina a 50°C, dà l'acilazide, anche se tale procedura non risulta necessaria.

Tuttavia, visto l'estrema instabilità dell'isocianato, si sono ottenute migliori rese facendo reagire direttamente l'acilazide (**221-223**) con il sistema tricyclico (**187**) in tetraidrofurano a riflusso (Schema 7), in modo da generare *in situ* l'opportuno isocianato. Il composto (**204, 206, 208**) viene purificato mediante flash cromatografia; è possibile, infine, migliorare ulteriormente il profilo di solubilità ricorrendo ai corrispondenti sali (**205, 207, 209**), facilmente ottenibili per trattamento con metanolo saturato con acido cloridrico gassoso.

4. 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

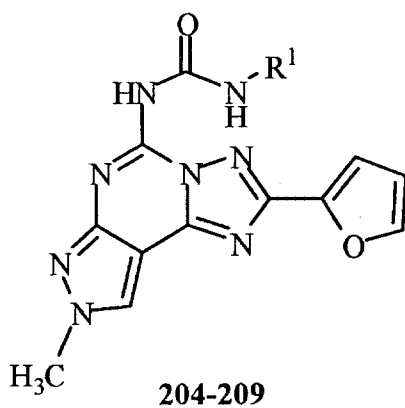
I composti sintetizzati (204-209) sono stati saggiati su recettori A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ clonati espressi in cellule CHO (A₁, A_{2A}, A₃) e HEK-293 (A_{2B}) utilizzando come radioligandi rispettivamente [³H]-1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina ([³H]-DPCPX)¹⁶³ (A₁ e A_{2B}), [³H]-4-[2-[[7-ammino-2-(2-furil)-[1,2,4]-triazolo-[2,3-a]-[1,3,5]-triazin-5-il]ammino]etil]fenolo ([³H]-ZM241385)^{9 5} (A_{2A}), e [³H]-5-(4-metossifenilcarbamoil)ammino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]-pirimidina ([³H]-MRE3008-F20)¹⁶⁵ (A₃).

I risultati sono riassunti in **Tabella 14**.

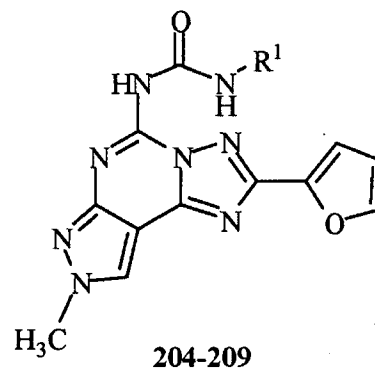
Tutti i composti (204-209) hanno dimostrato buona solubilità in acqua fino ad una concentrazione massima di 15 mM, evidenziando selettività e affinità (nel range 0.01-0.5 nM) verso il recettore hA₃, paragonabili al derivato privo di sostituenti sull'anello aromatico (110, hA₃= 0.16 nM). Non si è notata una cospicua differenza di affinità fra il composto e il corrispondente cloridrato quando il sostituyente è 2-piridile- o 3-piridile-; questo è facilmente comprensibile, dal momento che in genere si lavora in ambiente tamponato. Sorprendentemente, quando il sostituyente è 4-piridile i valori sono diversi, e questo può essere giustificato alla luce del fatto che siamo al limite di sensibilità del saggio di *binding* impiegato; infatti, il composto 4-piridile- e il corrispondente cloridrato, oltre alla buona solubilità, presentano anche dei valori di affinità verso hA₃ nel range picomolare (204, hA₃ = 0.04 nM, hA₁/ hA₃ = 6,250, hA_{2A}/ hA₃ = 1,500, hA_{2B}/ hA₃ = 5,000; 205, hA₃ = 0.01 nM, hA₁/ hA₃ = 35,000 hA_{2A}/ hA₃ = 10,000, hA_{2B}/ hA₃ = 25,000).

Questi risultati non solo rappresentano il primo esempio di elevata potenza, selettività e solubilità in acqua di antagonisti del recettore hA₃, ma suggeriscono anche una forte implicazione dell'azoto della piridina nel riconoscimento recettoriale. Il composto più potente è stato testato anche sul modello recettoriale di ratto: i valori di K_i rilevati sono 226 ± 50 nM

Tabella 13. Struttura e parametri chimico-fisici dei composti sintetizzati (204-209).



Composto	R ¹	p.f.(°C)	PM
204	4-piridil	269-272	375
205	4-piridil•HCl	223-225 dec	376
206	3-piridil	175 dec	375
207	3-piridil•HCl	207 dec	376
208	2-piridil	183	375
209	2-piridil•HCl	215 dec	376

Tabella 14 . Affinità di binding verso i recettori umani A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ e solubilità in acqua dei composti sintetizzati.(204-209).

Composto	R ¹	hA ₁ (K _i , nM) ^a	hA _{2A} (K _i , nM) ^b	hA _{2B} (K _i , nM) ^c	hA ₃ (K _i , nM) ^d	hA ₁ /hA ₃	hA _{2A} /hA ₃	hA _{2B} /hA ₃
204	4-piridil	250 ± 23	60 ± 10	200 ± 16	0.04 ± 0.009	6,250	1,500	5,000
205	4-piridil•HCl	350 ± 22	100 ± 12	250 ± 24	0.01 ± 0.005	35,000	10,000	25,000
206	3-piridil	220 ± 18	123 ± 13	175 ± 15	0.43 ± 0.11	512	28C6	407
207	3-piridil•HCl	240 ± 19	150 ± 12	200 ± 16	0.55 ± 0.08	436	273	364
208	2-piridil	200 ± 18	135 ± 30	190 ± 19	0.34 ± 0.10	588	397	559
209	2-piridil•HCl	260 ± 18	180 ± 19	220 ± 20	0.50 ± 0.13	520	360	440

^aSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A₁ espresso in cellule CHO, (n=3-6). ^bSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-ZM 241385 dal recettore umano A_{2A} espresso in cellule HEK-293. ^cSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A_{2B} espresso in cellule HEK-293, (n=3-6). ^dSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]MRE3008-F20 dal recettore umano A₃ espresso in cellule HEK-293. I dati sono espressi come K_i ± SEM in nM (n=3-6)

per A₁, 97.6±26.2 nM per A_{2A} e > 1 μM per A₃; i dati appena riportati confermano la bassa omologia di sequenza amminoacidica (74%) del recettore A₃ fra le diverse specie.¹⁸

Allo scopo di comprendere l'influenza di questa sostituzione nell'interazione con il recettore, è stato fatto uno studio di modellistica molecolare al fine di indagare l'ipotetica modalità di legame di questi nuovi antagonisti hA₃. Utilizzando come template la struttura cristallina della rodopsina,¹⁶⁷ è stato costruito un modello della regione transmembrana del recettore hA₃ più dettagliato rispetto a quello precedentemente proposto.¹⁷¹

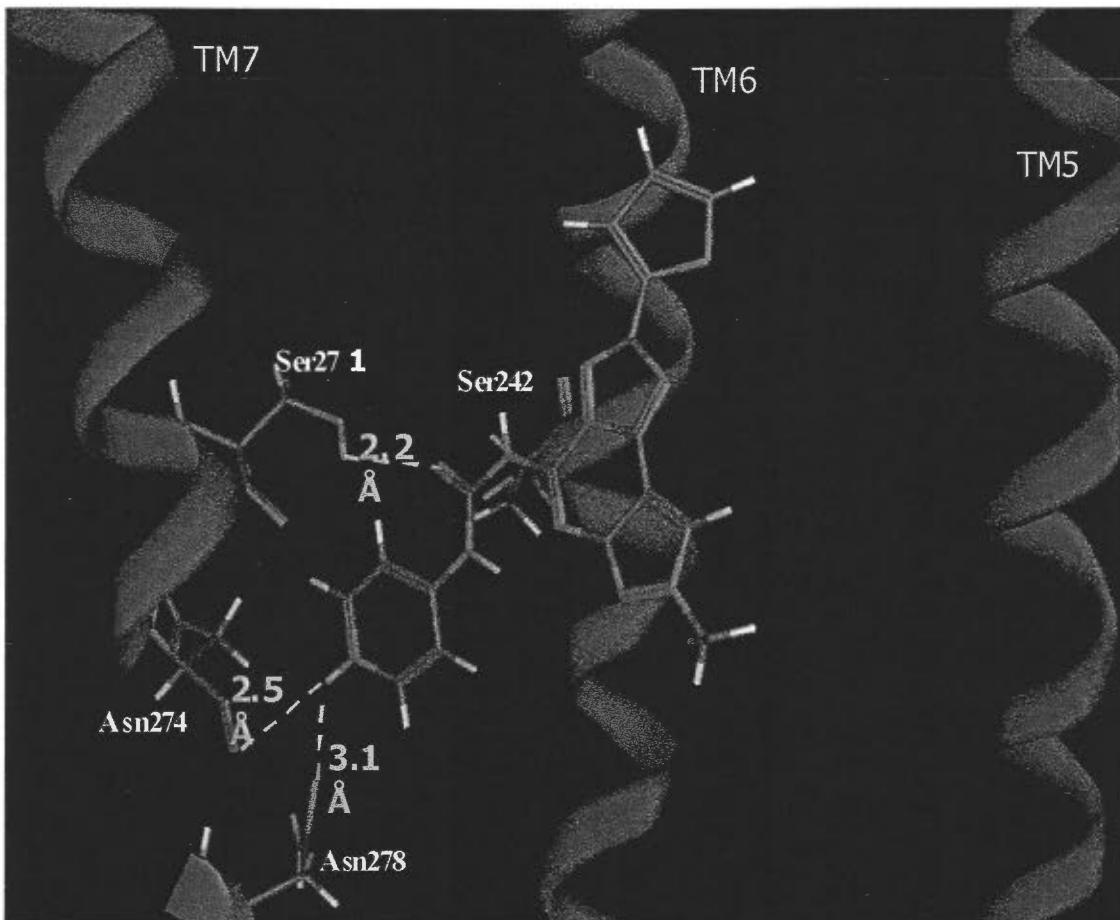


Figura 25. Configurazione del complesso recettore hA₃-(205). Sono evidenziate le porzioni coinvolte nell'interazione.

Come è illustrato in **Figura 25**, e come precedentemente riportato, l'ipotetico sito di legame del composto (**205**) si trova in prossimità dei TM3, 5, 6 e 7 con l'anello furanico rivolto verso l'ambiente extracellulare.¹⁵⁸

Come per le altre pirazolo-triazolo-pirimidine, la più bassa energia conformazionale del composto (**205**) si ha quando il sostituito carbamoilico, in posizione 5 della struttura pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinica, si trova in prossimità di 4 amminoacidi polari: Ser242 (TM6), Ser271 (TM7), His274 e Ser275 (TM7). Questa regione sembra essere molto critica per il riconoscimento della struttura dell'antagonista. Inoltre, pare ci siano forti interazioni di tipo elettrostatico tra il protone piridinico del composto (**204**) e l'ossigeno carbonilico dell' Asn274 ($N^+H \cdots OC$ distanza= 2.5 Å) e dell'Asn278 ($N^+H \cdots OC$ distanza= 3.1 Å) entrambi posizionati su TM7. Queste interazioni elettrostatiche potrebbero essere responsabili dell'aumento di affinità dimostrato dal composto (**205**). I due residui di asparagina sopra citati, sono largamente conservati in molti GPCRs. Tuttavia questo modello, basato sui domini transmembrana del recettore, non è in grado di giustificare l'aumento di selettività che le molecole dimostrano verso il sottotipo A₃. Tale osservazione spiegherebbe anche perché i composti (**207**) e (**209**) mostrano affinità inferiore rispetto a (**205**) e prossima rispetto al composto non sostituito sull'anello aromatico (**110**), probabilmente a causa della distanza non ottimale dai due residui di Asparagina; infatti le distanze fra NH e C=O sarebbero superiori, rendendo tale interazione elettrostatica meno forte.

Jacobson e i suoi collaboratori hanno visto che sono molteplici le regioni del recettore coinvolte nel riconoscimento del ligando, e fra queste vi è anche un segmento del secondo *loop* extracellulare.¹⁷² Sono tuttora in corso studi per descrivere meglio il ruolo del dominio extracellulare nel processo di riconoscimento da parte del recettore.

Allo scopo di confermare le eccezionali proprietà di questi derivati, è stata valutata l'inibizione della produzione di cAMP, da parte del composto CI-IB-MECA, in membrane di

cellule CHO stabilizzate e transfettate con il recettore umano A_3 . Il composto (205) ha riportato un valore di IC_{50} di 0.7 nM (Figura 26), indicando una potenza superiore, di ben tre volte, rispetto al derivato con l'anello fenilico non sostituito.¹⁷³

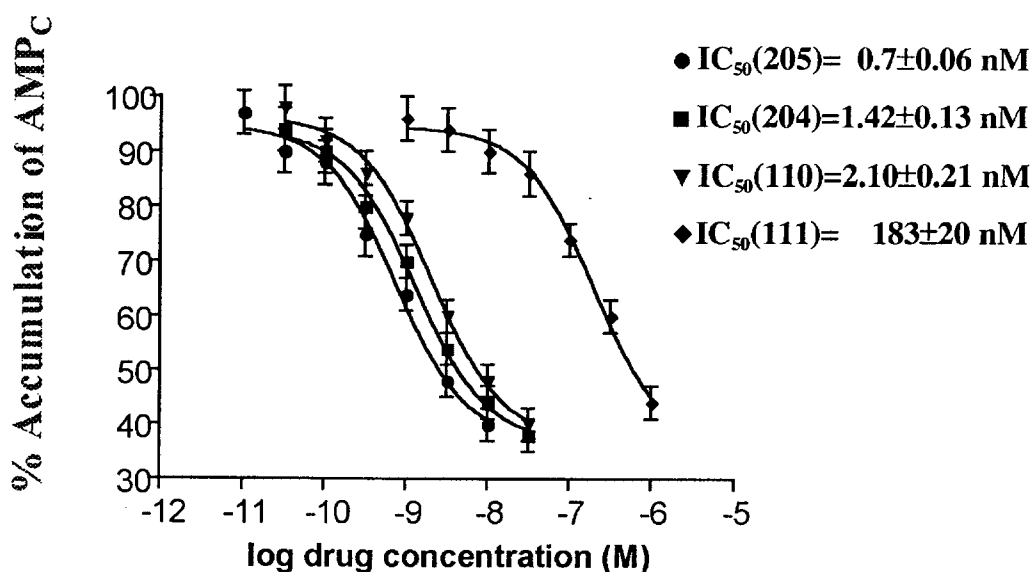
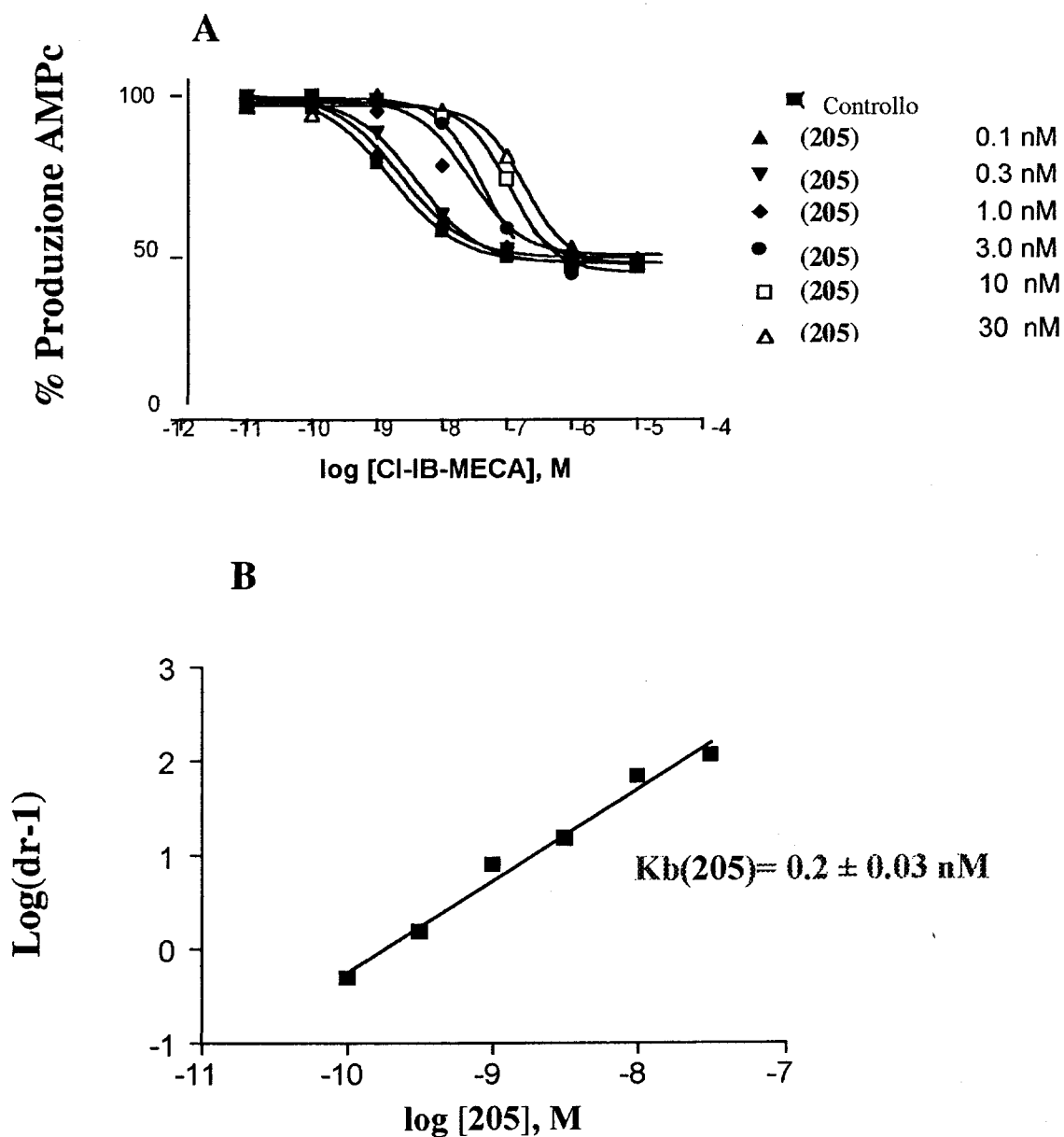


Figura 26. Saggio funzionale. Inibizione della produzione di AMPc, indotta da Cl-IB-MECA 100 nM su recettori hA_3 , da parte dei composti sintetizzati. I valori sono espressi come IC_{50} (nM).

Questo risultato conferma la correlazione, appena dimostrata nei saggi funzionali, tra l'affinità di legame e la potenza.

E' stata inoltre fatta un'accurata analisi degli effetti dell'antagonismo del composto (205) sull'inibizione del cAMP forscolina-stimolato indotto da Cl-IB-MECA: è stato calcolato un valore di K_B pari a 0.20 ± 0.03 nM (Figura 27) che dimostra che il composto (205) è il più potente antagonista hA_3 mai riportato.¹⁷⁴

Figura 27. (A) Effetto del composto 205 sulla produzione di AMPc indotta da Cl-IB-MECA nel recettore hA_3 espresso in cellule CHO. (B) Analisi di Schild dei dati.



4.4. CONCLUSIONI

Lo studio riportato in questa dissertazione ha permesso di ottenere il primo antagonista del recettore hA₃ potente, selettivo e soprattutto solubile in acqua. Questo derivato presenta un sostituente basico quale 4-piridilcarbamoil- in posizione N⁵ del nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico. Il corrispondente sale cloridrato (**205**) ha un valore di K_i di 0.01 nM verso il recettore umano A₃ ed una selettività, rispetto agli altri sottotipi recettoriali, che va da 10,000 a 35,000 e, nello studio funzionale, una IC₅₀ di 0.7 nM e un valore di K_B= 0.2 nM. Questo aumento di affinità rispetto al derivato arilcarbammato può essere attribuito ad una forte interazione elettrostatica tra l'azoto quaternario del composto (**205**) e gli atomi di ossigeno carbonilici degli amminoacidi Asn274 e Asn278, entrambi situati nel TM7.

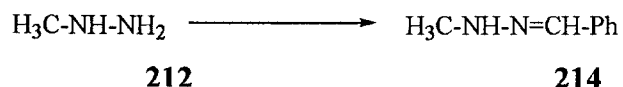
Gli studi successivi saranno rivolti alla sintesi di derivati non protonabili, al fine di confermare che la protonazione del sostituente piridile avviene effettivamente all'interno del sito di *binding*.

Al momento, data la sua potenza, selettività e solubilità in acqua, questo composto (**205**) è il candidato ideale per lo studio farmacologico e clinico del sottotipo recettoriale adenosinico hA₃.¹⁷³

4. 5. PARTE SPERIMENTALE

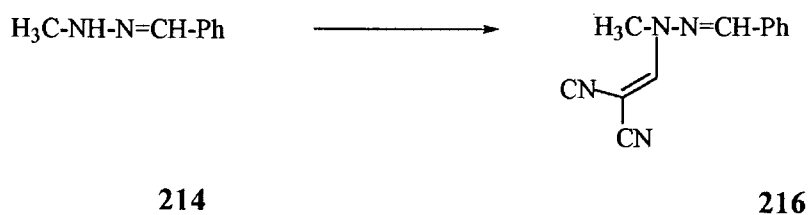
4. 5. 1. CHIMICA

Procedura per la preparazione della N¹-metil-N²-benzilidenidrazina (214)



A 6.9 gr (0.15 moli) di metilidrazina (**212**) vengono aggiunti 25 ml di etanolo e 15.9 gr (0.15 moli) di benzaldeide (**213**), e la miscela viene agitata per tre ore in un bagno termostato. L'etanolo viene rimosso a pressione ridotta e la soluzione residua estratta con etere. La soluzione eterea viene anidrificata e l'etere rimosso. Il residuo oleoso viene distillato alla pressione di 20 mmHg. Si ottiene un olio giallo pallido con p.e. 129-133 °C.

Procedura per ottenere il β -N²-benziliden-N¹-metilidrazina- α -ciano-acrilonitrile (216)



A 13,4 gr (0.1 moli) di N¹-metil-N²-benzilidenidrazina (**214**) in 20 ml di benzene si aggiunge una soluzione di 12.2 gr (0.115 moli) di etossimetilenmalondinitrile (**215**) in 30 ml di benzene e si pone a riflusso per un'ora. Poi si lascia raffreddare e si filtra. Il filtrato viene cristallizzato in etanolo e si ottengono 17 gr (0.081 moli) di prodotto (**216**).

Procedura per ottenere N²-metil-cianamminopirazolo (211)

Si sospendono 10 gr (0.048 moli) di β -N²-benziliden-N¹-metildrazina- α -ciano-acrilonitrile (216) in 30 ml di etanolo bollente e 4.5 ml di acido cloridrico concentrato e si mette a caldo e a riflusso per 30 minuti. Poi si tira a secco e il solido ottenuto viene trattato con etere etilico (30 ml) e si scalda per altri 10 minuti; successivamente si raffredda e si filtra. Il solido viene ripreso con 8 ml di NaOH 5N e la fase acquosa così ottenuta viene estratta per 5 o 6 volte con cloroformio. Le fasi organiche vengono poi riunite, anidificate (Na₂SO₄) e concentrate a dare il prodotto desiderato che si presenta come un solido giallo (211).

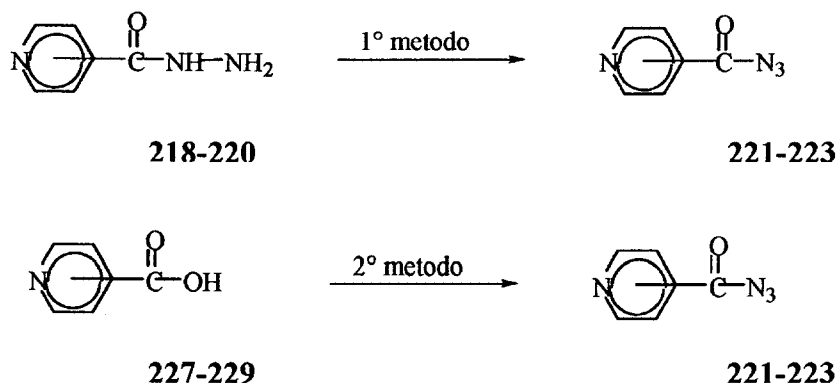
Resa 78%; solido giallo p.f. 118°C (AcOEt-etere di petrolio); IR (KBr): 3300-2950, 2110, 1610, 1530cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ : 3.80 (s, 3H); 7.30 (s, 1H); 5.2 (bs, 2H).

Procedura generale per la preparazione dell'idrazide dell'acido piridincarbossilico (218, 219, 220)



Ad una soluzione di 28.24 gr (3.5 mmoli) di acido piridincarbossilico (227-229) in 87.77 ml di etanolo vengono aggiunti lentamente 38.12 ml di H_2SO_4 ; si pone poi sotto agitazione a refluxo per tutta la notte. Si ottiene, in questo modo, l'estere etilico. Poi si raffredda versando su ghiaccio tritato (152.5 gr) e si alcalinizza con NH_3 . Si estrae con etere (5 x 50 ml) e la soluzione eterea viene anidrificata e tirata a secco. Si procede poi con l'aggiunta di etanolo e un'uguale quantità di moli di idrazina e si mette a refluxo per 4-5 ore. Infine si lascia raffreddare e si tira a secco e il residuo freddo viene cristallizzato con etere: si ottiene così il prodotto desiderato (218-220). Nel caso dell'acido 4-piridilcarbossilico (227) tali operazioni non sono state eseguite poiché l'idrazide corrispondente (218) è commerciale.

Procedura generale per la preparazione dell'acilazide dell'acido piridincarbossilico (221-223)



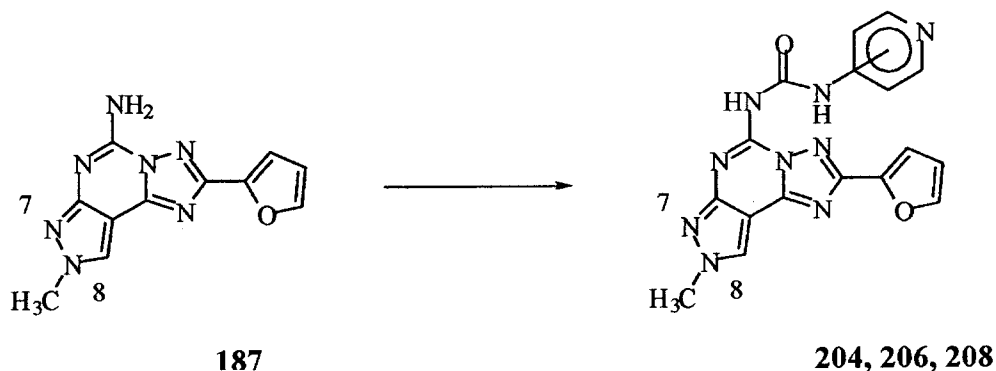
1°metodo: A 10 gr (7.3 mmoli) di idrazide dell'acido piridincarbossilico (227-229) si aggiungono 24.53 ml di HCl al 21.65%, si pone sotto agitazione e si raffredda a 0°C. Mantenendo la temperatura fra 0 e 5 °C si aggiunge goccia a goccia nell'arco di 30 minuti una soluzione preparata con 10.15 gr di NaNO_2 in 22.06 ml di acqua. Terminata l'aggiunta si lascia agitare altri 30 minuti sempre mantenendo la temperatura a 0°C. Si estrae quindi con etere etilico (3 x 50 ml) e l'estratto etero viene lavato con una soluzione acquosa di Na_2CO_3 finchè le acque di lavaggio risultano alcaline; a questo punto si lava con acqua e poi la fase etera viene anidrificata in CaCl_2 . Si distilla l'etere a 30°C senza creare il vuoto e si lascia cristallizzare il residuo oleoso, per qualche giorno, in un essiccatore; si ottiene così il prodotto desiderato (221-223).

2°metodo: Una soluzione costituita da 30 ml di dimetilformammide (DMF), 0.04 moli di acido piridincarbossilico (227-229) e 0.04 moli di trietilammina, viene posta sotto agitazione e raffreddata; si aggiunge una soluzione di 0.04 moli di difenilfosforilazide (DPPA) e 5 ml di DMF. Finita l'aggiunta si porta a 35 °C e si continua ad agitare per un'ora. Trascorsa l'ora, si versa in una miscela di etere e ghiaccio e si procede con un'estrazione in etere. La soluzione

eterea viene lavata con una soluzione di NaHCO_3 al 10% e poi anidrificata con Na_2SO_4 . Si evapora infine l'etere, senza creare il vuoto, e si ottiene così il prodotto desiderato (221-223).

La caratterizzazione dell'acilazide è stata fatta mediante spettroscopia IR: picco caratteristico a 2350 cm^{-1} .

Procedura generale per la preparazione delle 5-[[piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (204, 206, 208)



La 5-ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (**187**) (0.5 gr = 1.95 mmoli) viene sciolta in diossano, successivamente si aggiunge l'acilazide (**221-223**) (1.45 gr = 9.75 mmoli = 5 eq) e si scalda a refluxo per 4 ore, finché la TLC (AcOEt/metanolo) rivela la scomparsa del prodotto di partenza. Il solvente viene in seguito rimosso a pressione ridotta e il residuo viene purificato mediante alcune flash cromatografie, almeno 3 (a gradiente da AcOEt/metanolo 9:1 a AcOEt/metanolo 7:3), su gel di silice pretrattato con ammoniaca gassosa, per dare il prodotto desiderato (**204, 206, 208**).

5-[[4-piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (204**)**

resa 50%; solido giallo pallido; p.f. 269-272 °C (dec) (metanolo-dietilere); IR (KBr): 3240-2950, 1668, 1625, 1610, 1510, 1450 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 4.09 (s, 3H); 6.72 (dd, 1H, $J=2, J=4$); 7.22 (d, 1H, $J=4$); 7.50 (d, 2H, $J=9$); 7.93 (d, 1H, $J=2$); 8.43 (d, 2H, $J=9$); 8.70 (s, 1H); 10.18 (bs, 1H); 10.91 (bs, 1H). ES-MS: (MH^+) 376.5.

5-[[3-piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (206**)**

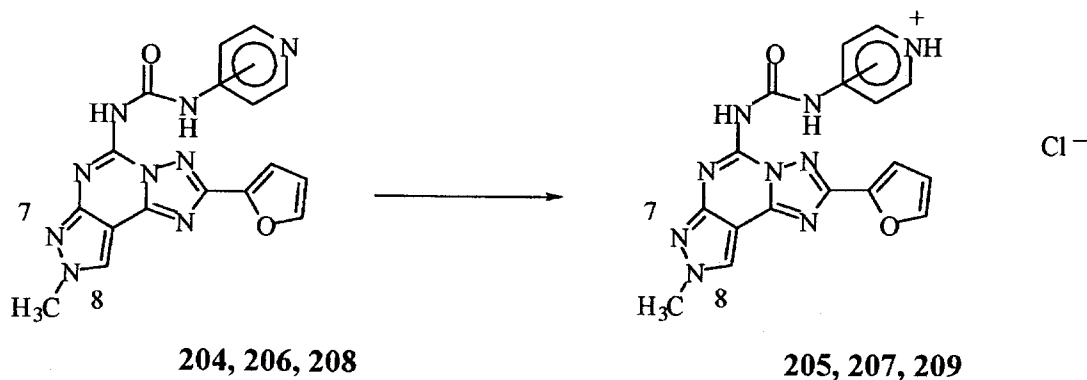
resa 58%; solido giallo pallido; p.f. 183 °C (dec) (metanolo-dietilere); IR (KBr): 3245-

2960,1670,1620,1610,1520,1455 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 4.09 (s,3H);6.72(dd, 1H, J=2, J=4);7.22 (d, 1H, J=4);7.28-7.36 (m, 1H);7.94 (d, 1H, J=2);7.95-8.01 (m, 1H);8.25(d, 1H, J=4);8.72 (d, 1H,J=2);8.78 (s, 1H);9.98(bs, 1H);10.60(bs, 1H). ES-MS: (MH^+) 376.5

5-[(2-piridil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (208)

resa 50%; solido giallo pallido; p.f. 175 °C (dec) (metanolo-dietiletere); IR (KBr): 3244-2955,1669,1630,1620,1515,1455 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 4.10 (s,3H);6.73 (dd, 1H, J=2, J=4);7.13-7.16 (m, 1H);7.27 (d, 1H, J=4);7.48-7.62 (m, 1H);7.79-7.85 (m, 1H);7.93(d, 1H, J=2);8.40(d, 1H, J=2);8.74 (s, 1H);10.01 (bs, 1H);10.98 (bs, 1H). ES-MS: (MH^+) 376.5.

Procedura generale per la preparazione delle 5-[[piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cloridrato (205, 207, 209)



Il composto (204, 206, 208) (50 mg, 0.13 mmoli) viene disciolto in metanolo (1 ml) e si aggiunge una soluzione di metanolo saturata con HCl gassoso (2 ml) a 0°C. Si continua ad agitare alla stessa temperatura per 30 minuti; poi il solvente viene rimosso a pressione ridotta per dare il corrispondente sale (205, 207, 209).

5-[[4-piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cloridrato (205)

Resa quantitativa; solido bianco p.f. 223-225 °C (dec) (metanolo-etero etilico); IR (KBr): 3420-2910, 1667, 1620, 1610, 1510, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (D_2O) δ : 3.64 (s, 3H); 6.20 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 6.62 (d, 1H, $J = 4$); 7.25 (d, 2H, $J = 9$); 7.64 (d, 1H, $J = 2$); 7.93 (d, 2H, $J = 9$); 8.27 (s, 1H).

5-[[3-piridil]ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cloridrato (207)

Resa quantitativa; solido bianco p.f. 215 °C (dec) (metanolo-etero etilico); IR (KBr): 3425-2915, 1670, 1630, 1615, 1520, 1460 cm^{-1} ; ^1H NMR (D_2O) δ : 3.55 (s, 3H); 6.14 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 6.48 (d, 1H, $J = 4$); 7.14 (s, 1H); 7.63-7.68 (m, 1H); 7.80 (d, 1H, $J = 2$); 7.85-8.01 (m, 1H); 8.22 (d, 1H, $J = 4$); 8.85 (s, 1H).

5-[[[(2-piridil)ammino]carbonil]ammino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cloridrato (209)

Resa quantitativa; solido giallo pallido p.f. 207 °C (dec) (metanolo-etero etilico); IR (KBr): 3430-2970, 1665, 1625, 1610, 1505, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.60 (s, 3H); 6.21 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.67-6.72 (m, 1H); 6.85 (d, 1H, J=4); 7.01-7.08 (m, 1H); 7.28-7.32 (m, 1H); 7.48 (d, 1H, J=2); 8.01 (d, 1H, J=2); 8.34 (s, 1H).

5. MODELLO Co.M.F.A

5.1. INTRODUZIONE

5.1. a. MODELLISTICA MOLECOLARE

Il metodo QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship, relazioni quantitative struttura attività) cerca di stabilire una correlazione tra proprietà chimico fisiche e attività biologica.

Inizialmente il metodo fu sviluppato da *C. Hansch*, il quale propose che l'azione biologica di una sostanza dipendesse dalla combinazione di due processi:

- l'attraversamento delle membrane biologiche (lipofilia della molecola), descritta dal $\log P$ (P = coeff. di ripartizione ottanolo/acqua);
- l'interazione con il recettore, attribuito ai requisiti elettronici e strutturali della molecola, descritti dalla costante σ .

L'equazione risulta essere:

$$\log 1/c = a + b \log P + c \sigma.$$

Col passare degli anni e con l'affinamento della tecnica, si sono introdotti molti altri descrittori, in grado di migliorare i risultati ottenuti fino a quel momento. Nonostante l'introduzione di questi nuovi parametri, il metodo ha dimostrato molti limiti, che sono stati parzialmente risolti con l'ideazione dei metodi 3D-QSAR, tra cui il più comune e utilizzato è la tecnica Co.M.F.A (Comparative Molecular Field Analysis, analisi comparativa dei campi molecolari). Ad oggi il CoMFA, assieme ad altri approcci di QSAR tridimensionale, rappresenta uno dei principali strumenti di "Drug Design", soprattutto a livello industriale, e specialmente nei casi in cui non è nota la struttura del bersaglio d'azione.

Questo metodo consente di correlare l'attività di una molecola alla sua struttura tridimensionale, utilizzando un set di composti ad attività nota; il fine è quello di ottenere un modello in grado di predire l'attività di nuovi, interessanti derivati; affinché il modello risulti

effettivamente predittivo, è necessario che il data set di partenza presenti alcuni requisiti: il numero di molecole deve essere il più grande possibile; la varietà strutturale deve essere sufficientemente ampia da coprire un ampio spettro di attività, sebbene alcune caratteristiche strutturali comuni siano spesso indispensabili. Inoltre, il data set deve possibilmente essere equilibrato, nel senso di possedere un'uniforme distribuzione nella popolazione di molecole ad attività alta, bassa ed intermedia.

Il primo passo per lo sviluppo di un modello CoMFA è la costruzione grafica in 3D del data set di molecole e la scelta della conformazione per ogni molecola.

Il successivo step è uno dei più delicati, ed è rappresentato dal corretto allineamento delle molecole, mediante l'individuazione di un conformero comune a tutte le strutture considerate.

Non sempre è possibile ottenere un conformero soddisfacente; in questo caso, si valutano le posizioni nello spazio dei sostituenti che sembrano interagire in modo significativo col recettore.

A questo punto, i composti vengono inseriti uno ad uno in una griglia tridimensionale, nella quale la molecola in esame viene a contatto con due sonde chimiche, una di tipo elettrostatico (in genere carica puntiforme +1) e una con caratteristiche idrofobiche (in genere un carbonio ibridizzato sp^3). Viene quindi calcolata l'energia d'interazione della molecola con queste sonde in ogni punto della griglia, generando così due matrici tridimensionali di potenziali d'interazioni, che vengono detti campi d'interazione molecolare, o MIF (Molecular Interaction Field).

Questa procedura viene ripetuta per tutte le molecole del data set, generando così un numero decisamente elevato di variabili che corrispondono ai potenziali d'interazione; è opportuno, a questo punto, ridurre tale numero (nell'ordine di 10^5), allo scopo di semplificare il modello senza, comunque, perdere informazioni importanti. Questo viene ottenuto ricorrendo a tecniche chemiometriche come il PLS (Partial Least-Squares Projections): si tratta di un'operazione statistica con la quale, per mezzo del calcolo del minor numero possibile di

quelle che vengono dette variabili latenti (o componenti principali, ossia delle variabili che racchiudono in sé l'informazione di migliaia di variabili originali) si determina una correlazione tra MIF e attività biologica. La qualità di questa regressione può essere misurata dal coefficiente di correlazione (r^2), tra dato (attività sperimentale) e valore ipotizzato d'attività.

Inoltre, basandosi sul rapporto tra attività calcolata e attività sperimentale, si è in grado di predire l'attività di una molecola, una volta che ne venga fornita la struttura.

Per verificare l'attendibilità del modello ottenuto, si può ricorrere a due diverse tecniche, dette validazione interna o esterna.

Nella *validazione interna*, allontanando una molecola alla volta (Leave One Out), oppure un gruppo casuale di esse (Random Group), e successivamente, ricostruendo il modello, quest'ultimo deve essere in grado di predire l'attività della/e molecola/e tolta/e (si calcola la capacità del modello di predire se stesso).

Nella *validazione esterna*, per mezzo del modello QSAR, si predice l'attività di una o più nuove molecole, date le loro strutture tridimensionali. Quindi sintetizzando nuovi composti con caratteristiche diverse, il modello deve essere in grado di predire l'attività biologica delle nuove molecole.

5. 1. b. MODELLO Co.M.F.A

Il modello CoMFA è stato costruito sulla base di un data set composto da 109 molecole, di struttura base pirazolo-triazolo-pirimidinica e triazolo-chinazolinica, evidenziate nella seguente figura (**Figura 28**).

Le molecole sono state costruite utilizzando una comune conformazione del nucleo strutturale di base, precedentemente calcolata da una simulazione di Docking Molecolare, su un modello d'omologia del recettore adenosinico hA₃ (**Figura 29**).¹⁵⁸

Le cariche parziali sono state calcolate su base quantomeccanica semiempirica PM3. Sono stati calcolati due diversi modelli, che presentavano il gruppo amminico rispettivamente in forma carica e neutra; la scelta finale è caduta sul modello presentante il gruppo amminico neutro, poiché portava a valori statistici migliori.

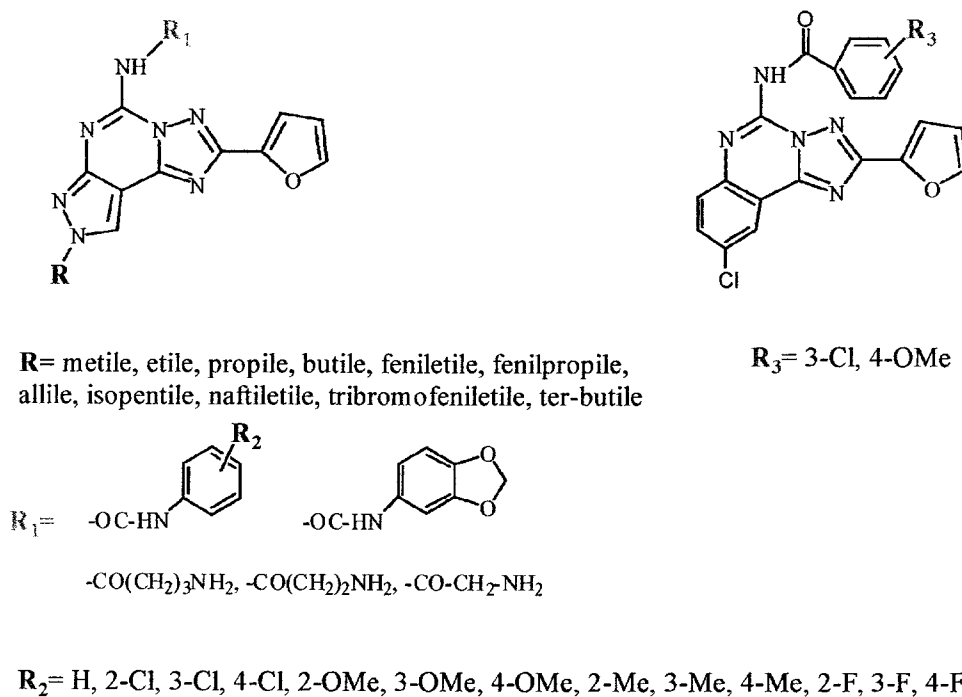


Figura 28. Composti del data set

Dopo la sintesi di vari composti derivanti da sostituzioni in N⁵ e N⁸, si è potuto definire la funzione svolta dai diversi gruppi, in termini d'affinità e selettività (**Figura 30**).

Quindi, la progettazione di questi nuovi composti (**Tabella 15**), è stata pensata in maniera da poter riuscire a coprire un range d'affinità molto ampio, in quanto, per valutare se un modello CoMFA é valido, quest'ultimo deve essere in grado di predire l'affinità di molecole sia con requisiti di alta e basa affinità.

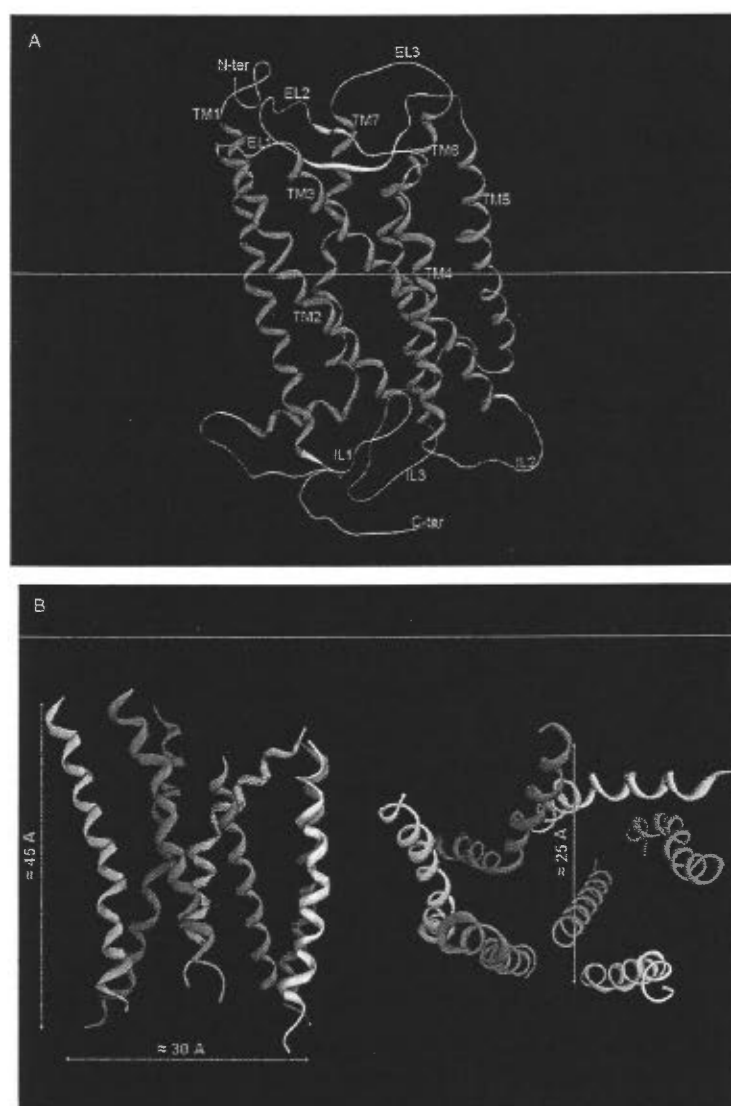


Figura 29. A) profilo della topologia del recettore umano A₃ ottenuto per omologia mediante modellismo molecolare. B) profilo del recettore umano A₃ a livello dei domini transmembrana visti dalla parte extracellulare (destra) e perpendicolare (sinistra) rispetto ai domini.

Per raggiungere questo scopo, si sono utilizzati buoni sostituenti come il metile in N⁸ e il 4-tolil-carbamoile in N⁵, e sostituenti come il *n*-ottile in N⁸ e *n*-pentil-carbamoile in N⁵, che non sono sostituenti ottimali per l'interazione con il recettore hA₃. Per poter ottenere una classe di composti abbastanza varia, oltre ai sostituenti menzionati, si sono introdotti dei sostituenti ad attività intermedia, che hanno reso possibile la sintesi di composti aventi i requisiti adatti per poter permettere una buona validazione del modello CoMFA creato in precedenza.

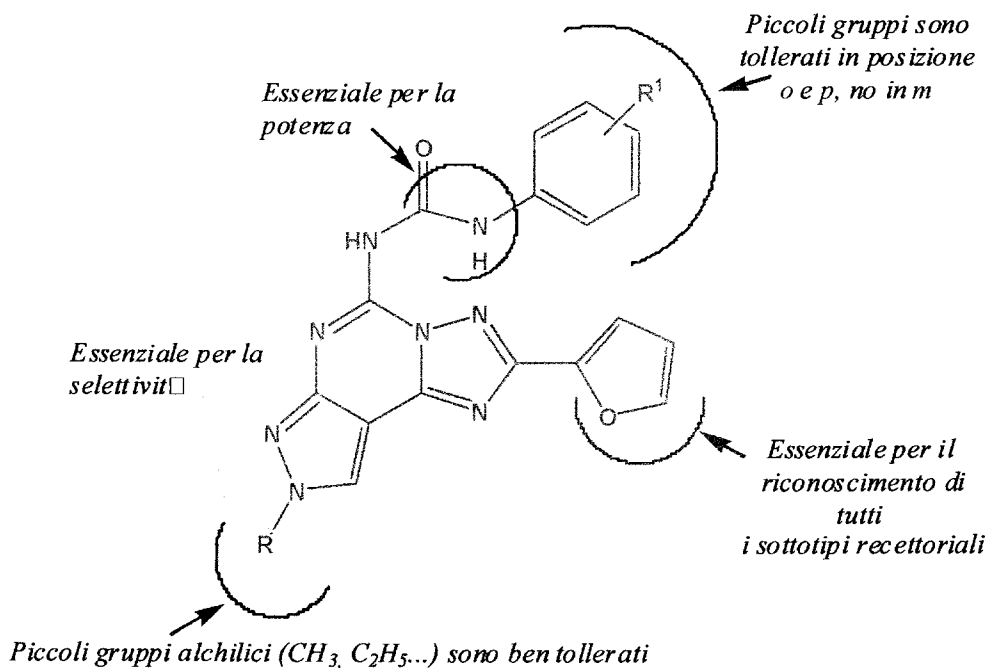
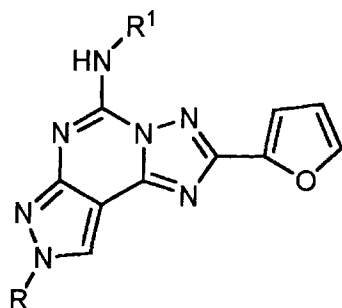


Figura 30. Profilo di SAR delle pirazolo-triazolo-pirimidine come antagonisti hA₃.

Tabella 15. Struttura e parametri chimico fisici dei composti sintetizzati (230-246).

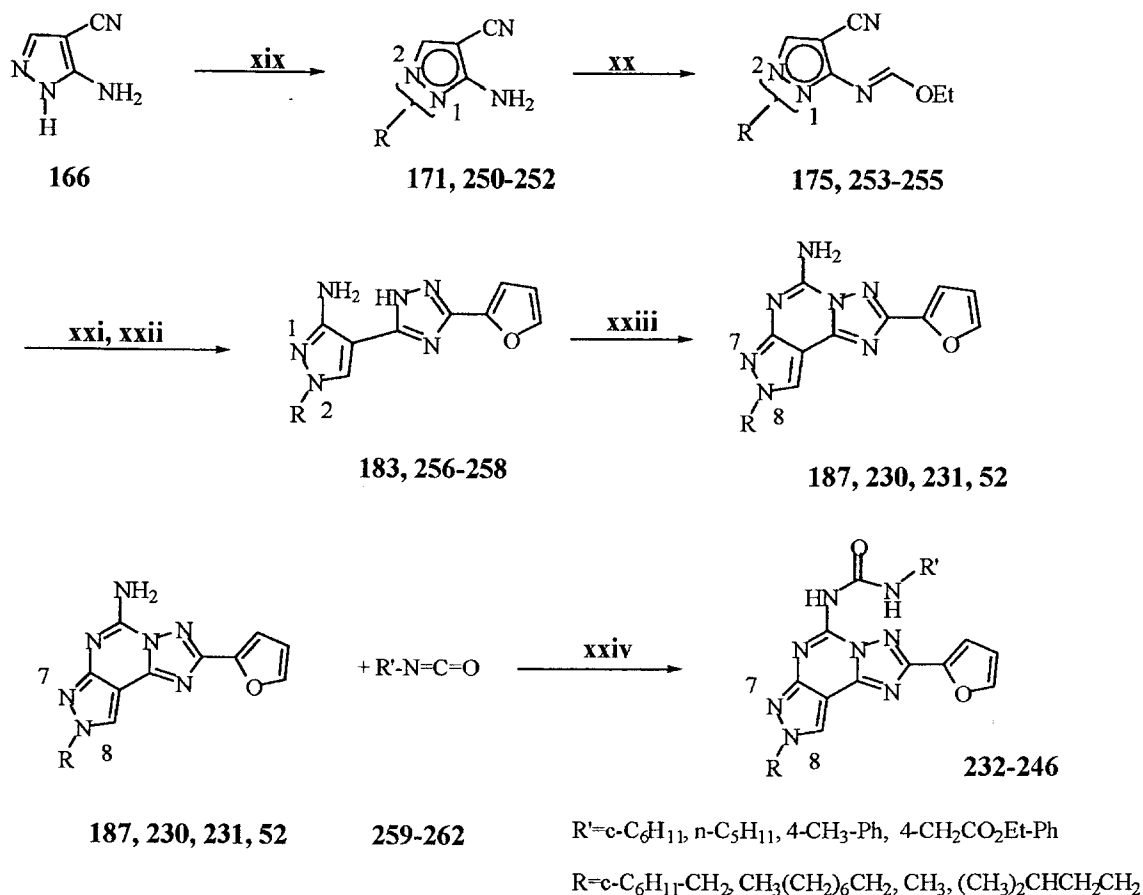


COMPOSTO	R	R ¹	pf (°C)	PM
230	n-C ₈ H ₁₇	H	135	353.20
231	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	H	195	337.17
232	CH ₃	CONH-cC ₆ H ₁₁	208-210	380.17
233	CH ₃	CONH-nC ₅ H ₁₁	185-188	368.17
234	CH ₃	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	222-224	461.17
235	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-cC ₆ H ₁₁	165	436.23
236	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-nC ₅ H ₁₁	178-180	424.23
237	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	163	516.22
238	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-Ph-4-CH ₃	223-228	440.20
239	n-C ₈ H ₁₇	CONH-cC ₆ H ₁₁	123-125	478.28
240	n-C ₈ H ₁₇	CONH-nC ₅ H ₁₁	125	466.28
241	n-C ₈ H ₁₇	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	150-154	558.27
242	n-C ₈ H ₁₇	CONH-Ph-4-CH ₃	226-228	486.25
243	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-cC ₆ H ₁₁	130	462.25
244	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-nC ₅ H ₁₁	170	450.25
245	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	185	542.24
246	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-Ph-4-CH ₃	206-210	470.22

5. 2. CHIMICA

I composti (187, 230, 231, 52) sono stati sintetizzati secondo il metodo già descritto precedentemente (capitolo 3) e riassunto nello Schema 8.

Schema 8



Reagenti: **xix**) NaH, DMF, RX (**167, 247-249**); **xx**) HC(OEt)₃, refluxo; **xxi**) Idrazide dell'acido 2-furoico, MeO(CH₂)₂OH; **xxii**) Ph₂O, 260°C; **xxiii**) NH₂CN, 1-metil-2-pirrolidone, pTsOH, 140°C, flash cromatografia; **xxiv**) Diossano, rfx per 18 ore

L'alchilazione del 5-ammino-4-ciano-pirazolo (**166**), con l'appropriato alogenuro alchilico, in presenza di NaH e DMF, porta ad una miscela inseparabile di due regioisomeri (**171, 250-252**) in rapporto N¹: N² pari a 1:4.^{92, 162}

Questa risulta essere una miscela inseparabile, e viene usata nei passaggi successivi senza essere purificata; si fa reagire il pirazolo alchilato con trietilortoformiato.

Per successivo riscaldamento, al pirazolo (175, 253-255) viene aggiunta l'idrazide dell'acido furoico in 2-metossietanolo; è stato possibile ottenere direttamente l'amminotriazolo (183, 256-258) mediante trattamento in difenilettere a 260 °C; successivamente, senza idrolizzare il sistema triciclico in HCl, il derivato viene convertito nel corrispondente 5-amminico, tramite la reazione con cianammide in presenza di acido p-toluensolfonico. Infine, mediante flash cromatografia, vengono separati i 2 regioisomeri N⁷ (minor quantità) e N⁸ (prodotto predominante) (187, 230, 231, 52). Quest'ultimo è il composto di base per le reazioni successive.

I derivati finali (232-246), vengono preparati tramite la reazione dei composti (187, 230, 231, 52) con i corrispettivi isocianati (259-262) in diossano a refluxo.

Quando l'isocianato non si trova in commercio, viene preparato dalla corrispondente ammina, per reazione con difosgene in diossano a refluxo per cinque ore. La formazione dell'isocianato viene verificata mediante IR (picco a 2250 cm⁻¹).

5.3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Come già detto, si è costruito il modello CoMFA sulla base di 109 molecole, la cui sovrapposizione (**Figura 31**) è stata effettuata sulla base del loro nucleo strutturale comune, mentre i campi molecolari sono stati calcolati con il metodo tradizionale che fa uso delle sonde di tipo elettrostatico e sterico.

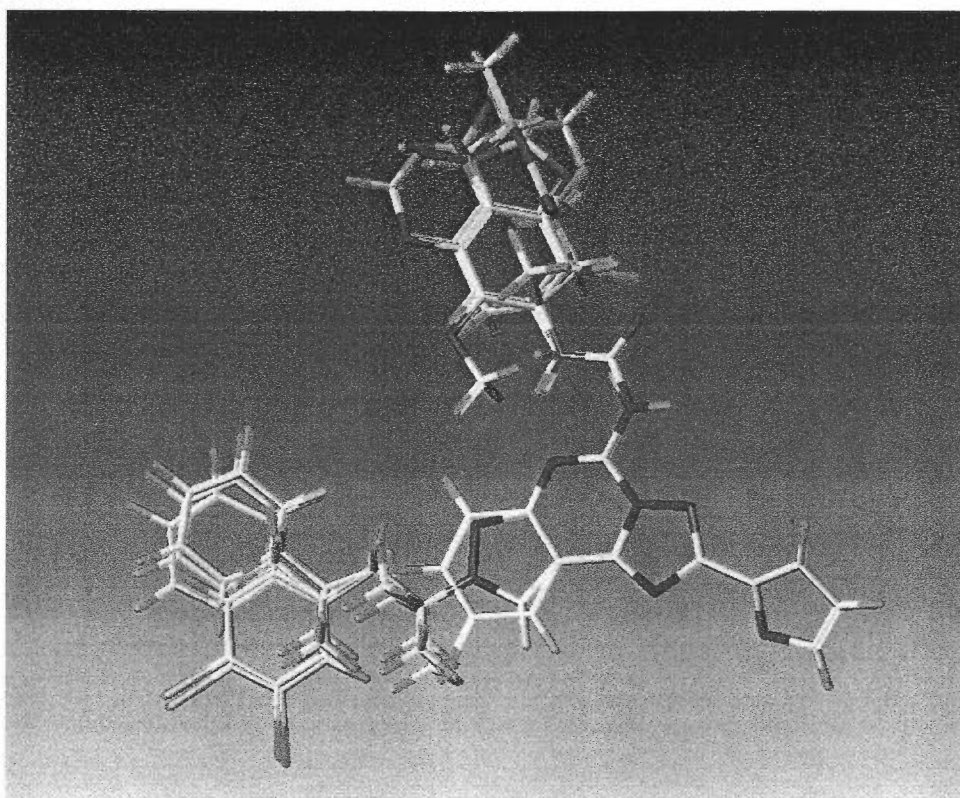


Figura 31. Supermolecola, derivata dalla sovrapposizione delle 109 molecole.

Il modello statistico è stato calcolato su sei componenti principali e presenta un coefficiente di correlazione $r^2 = 0.922$.

La validazione interna ha confermato la solidità del modello, portando ad un coefficiente di correlazione cross-validato $q^2 = 0.840$ con il metodo *Leave One Out*, mentre per quanto riguarda il metodo *Random Group* il coefficiente di correlazione q^2 è risultato di 0.802 (Figura 32).

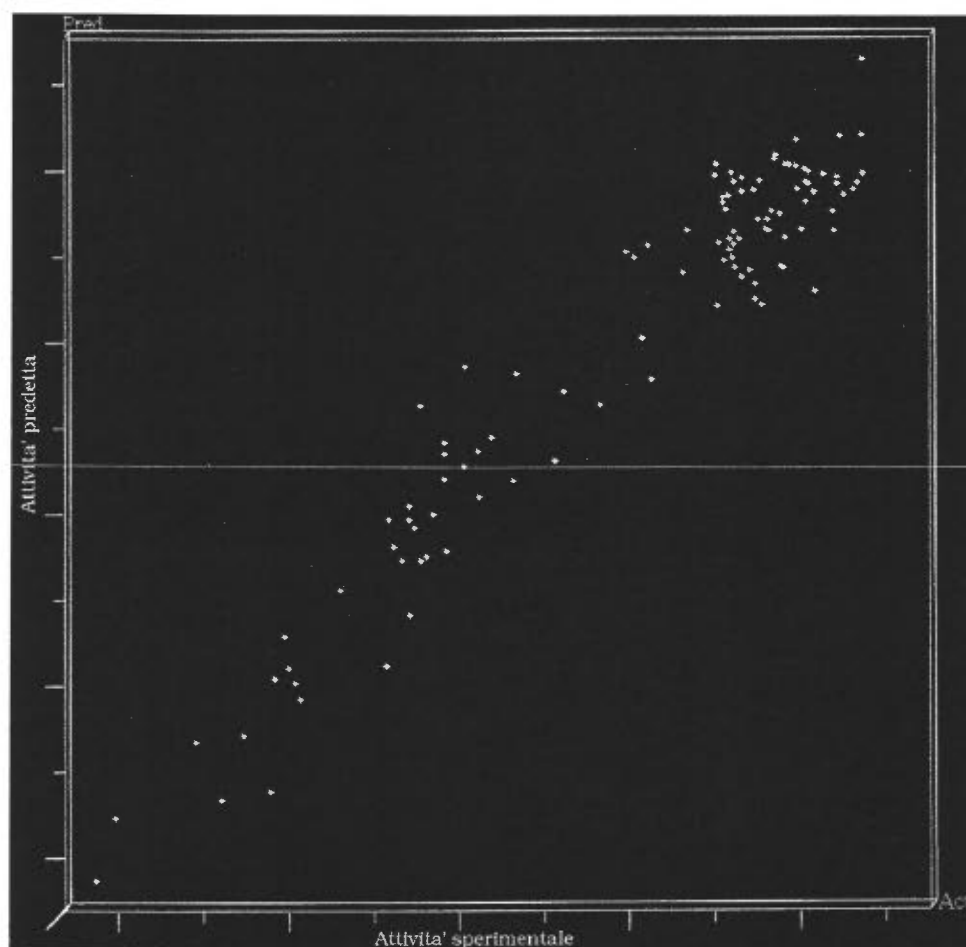


Figura 32. Rappresentazione grafica delle attività predetta e calcolata.

Nelle Figure 33-35, sono riportate le regioni dei campi molecolari, importanti per la definizione dell'attività dei composti del data set, come calcolate dal modello CoMFA. Le interazioni elettrostatiche sono rappresentate in blu e rosso, mentre quelle steriche in verde e

giallo; le interazioni che portano ad un aumento d'affinità sono riportate in blu e verde, mentre i campi, evidenziati in rosso e giallo, indicano zone di diminuzione di affinità nei confronti del recettore hA_3 .

L'interpretazione dei campi molecolari permette di trarre alcune interessanti deduzioni.

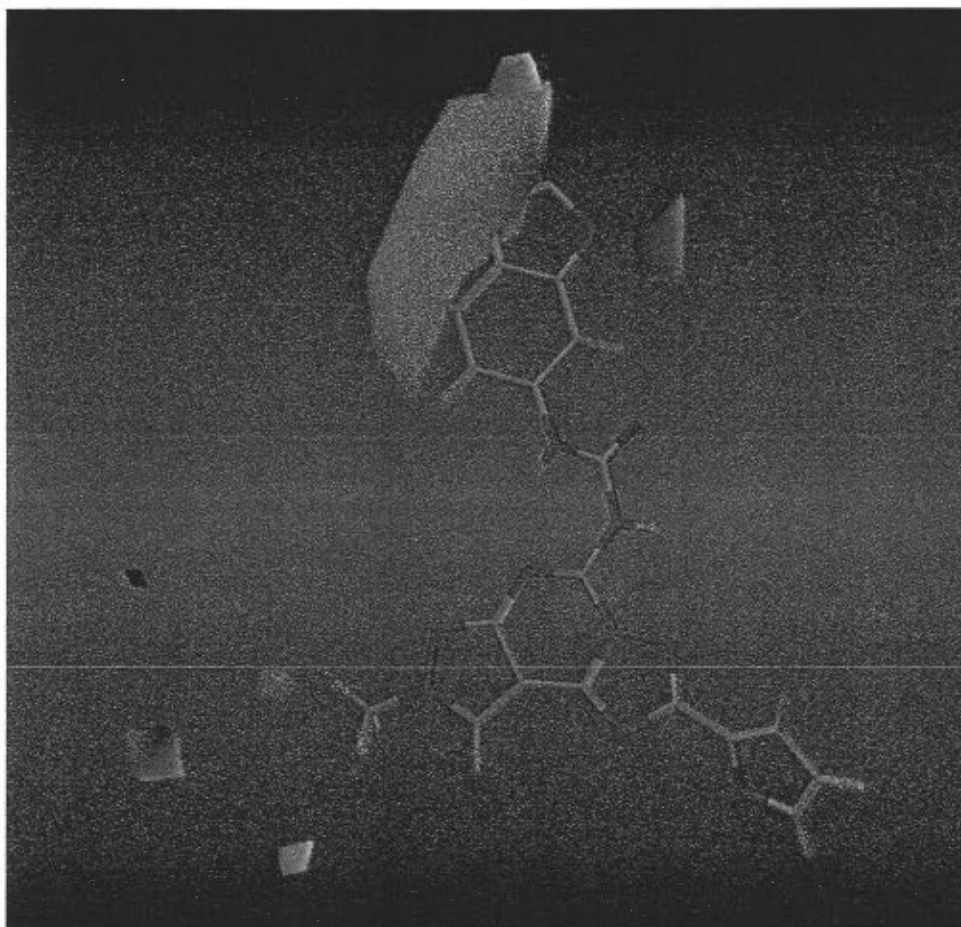


Figura 33. Rappresentazione dei campi molecolari, generati dall'interazioni con una sonda di tipo sterico

L'ingombro sterico dei sostituenti in posizione N^8 non sembra importante ai fini dell'affinità per il recettore. L'inserimento di catene voluminose non produce alcun incremento d'affinità del composto, né particolare diminuzione. La presenza di una piccola zona "gialla" indica una probabile diminuzione di affinità nel caso di sostituenti particolarmente lunghi. Per

quanto riguarda le interazioni elettrostatiche, a livello del sostituente in N⁸, la presenza di un gruppo polare porterebbe a composti a bassa affinità, come indicato dal voluminoso campo d'interazione molecolare di colore rosso (Figura 33), sicuramente dovuto all'interazione di questa parte della molecola con una tasca lipofila del recettore.

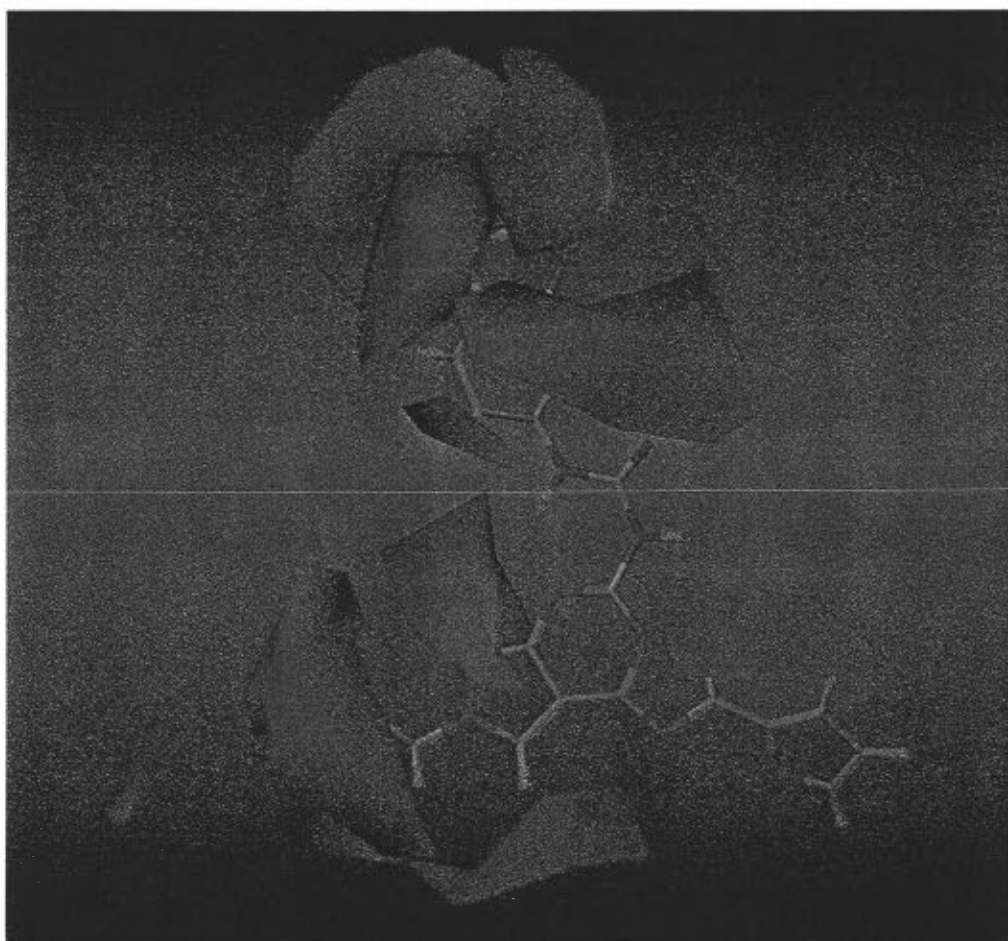


Figura 34. Rappresentazione dei campi molecolari, generati da interazione con una sonda elettrostatica

Per quanto riguarda il sostituente in N⁵, l'ingombro sterico (Figura 34) risulta essere molto importante. Il CoMFA indica chiaramente la necessità della presenza di un sostituente voluminoso in questa zona della molecola per ottenere un aumento dell'affinità per il recettore. Il campo molecolare è posizionato a circa 5-6 Å dal secondo azoto ureidico,

perfettamente compatibile con un sostituente di tipo arilico, oppure una catena alifatica di 4-5 atomi di carbonio. Accanto a questa zona idrofobica si presenta una tasca polare che rende favorevole l'introduzione di sostituenti polari che comunque inducano un ridotto ingombro sterico.

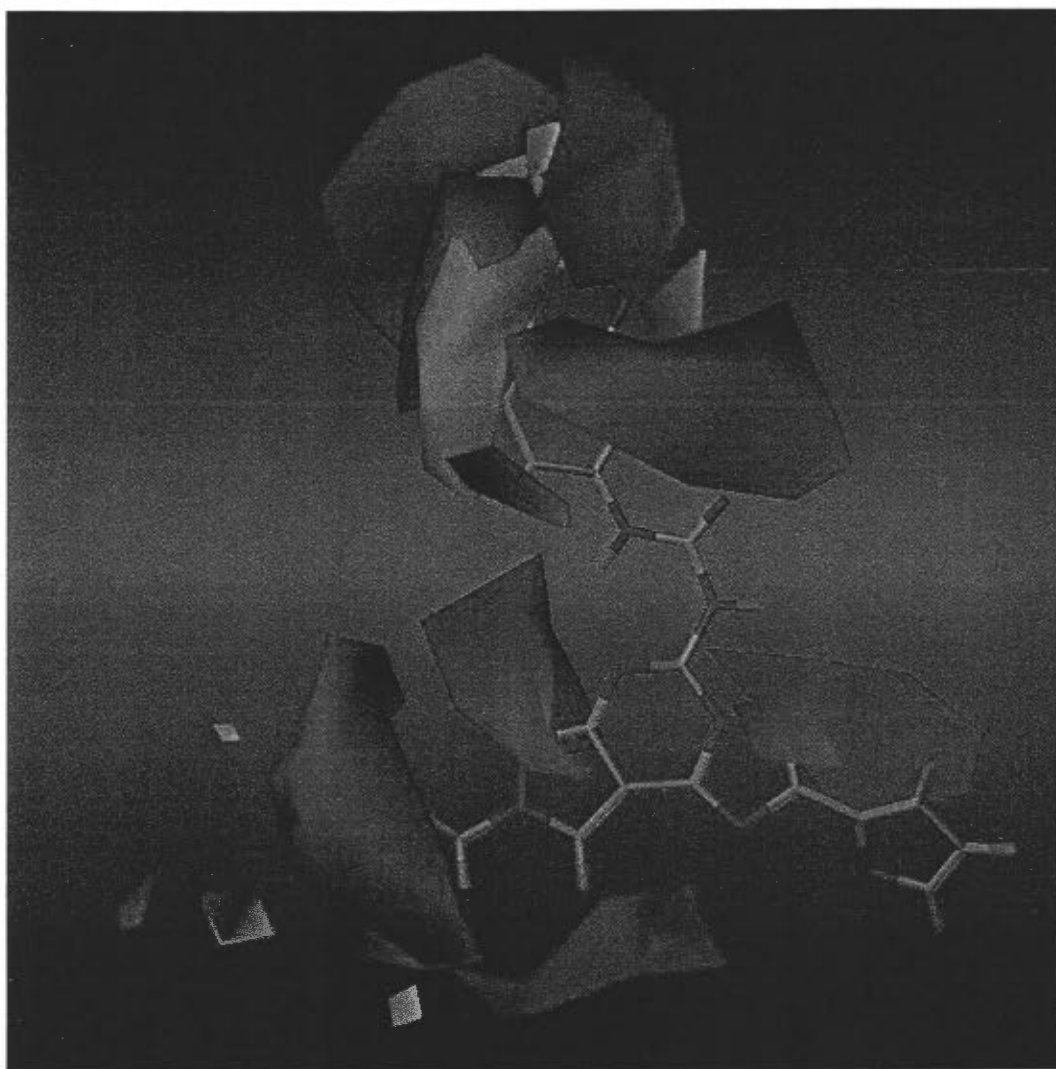
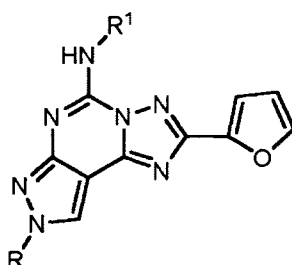


Figura 35. Campi molecolari generati dall'interazione della molecola, con una sonda di tipo sterico e una idrofobica.

La **Tabella 16** riporta i valori di attività sperimentali e predetti dal modello CoMFA per le 17 nuove molecole. Dal confronto tra i valori sperimentali e calcolati, risulta evidente che il

modello CoMFA creato è in grado di predire con estrema precisione l'affinità dei composti testati.

Tabella 16. Valori d'affinità sperimentali e calcolati dei composti sintetizzati (230-246).



Composti	R	R ¹	K _i hA ₃ osservato. (nM)	K _i hA ₃ calcolato. (nM)
230	n-C ₈ H ₁₇	H	2050 (1570-2680)	3288.50
231	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	H	1720 (1320-2240)	1380.40
232	CH ₃	CONH-cC ₆ H ₁₁	1.01 (0.89-1.16)	0.93
233	CH ₃	CONH-nC ₃ H ₁₁	1.95 (1.39-2.72)	0.33
234	CH ₃	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	0.82 (0.59-1.15)	0.45
235	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-cC ₆ H ₁₁	20.53 (17.65-28.76)	20.70
236	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-nC ₃ H ₁₁	8.09 (7.46-8.78)	7.39
237	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	11.89 (8.72-16.20)	9.95
238	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CONH-Ph-4-CH ₃	7.41 (5.56-9.86)	7.28
239	n-C ₈ H ₁₇	CONH-cC ₆ H ₁₁	16.29 (13.74-19.30)	17.06
240	n-C ₈ H ₁₇	CONH-nC ₃ H ₁₁	7.83 (4.89-12.53)	6.10
241	n-C ₈ H ₁₇	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	9.97 (8.29-11.98)	8.20
242	n-C ₈ H ₁₇	CONH-Ph-4-CH ₃	4.48 (3.65-5.50)	3.09
243	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-cC ₆ H ₁₁	6.70 (5.30-8.46)	7.21
244	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-nC ₃ H ₁₁	3.98 (3.16-5.01)	2.58
245	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-Ph-4-CH ₂ CO ₂ Et	6.95 (5.34-9.06)	3.48
246	CH ₂ -cC ₆ H ₁₁	CONH-Ph-4-CH ₃	5.94 (4.36-8.10)	2.54

Dall'analisi dei valori d'affinità riportati nella tabella, si può facilmente concludere che il composto **234**, che presenta il metile in posizione N⁸ ed un fenile para-sostituito con un gruppo polare (che rispecchia, dunque, in maniera particolarmente fedele, i suggerimenti che si possono ottenere dall'analisi dei campi molecolari calcolati dal modello CoMFA), risulta il composto più attivo della serie. Facendo un attento paragone sui valori d'affinità riportati dai composti, si è potuto notare che il valore ottenuto non è influenzato dall'azione di un solo sostituente, ma dalla combinazione di entrambi. Come indicato dal CoMFA, l'aumento dell'ingombro sterico in posizione N⁸ comporta una riduzione dell'attività molto significativa, solamente con sostituenti lunghi (n-ottile, **233-242**) o che presentino ramificazioni (isopentile, **235-238**), mentre la presenza di gruppi voluminosi adiacenti all'anello tricyclico non sembra influenzare di molto l'affinità per il recettore. Queste caratteristiche subiscono un'ulteriore modificazione con l'inserimento dei sostituenti in N⁵. I due composti non sostituiti (**230**, **231**) risultano completamente inattivi, dimostrando l'importanza del sostituente, mentre l'introduzione di gruppi contenenti una porzione arilica o *n*-pentilica portano un aumento d'affinità; infine, gruppi come il cicloesile abbassano la potenza dei composti.

5. 4. CONCLUSIONI

Lo svolgimento di questo lavoro ha portato ulteriori chiarimenti riguardanti l'interazione del nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico con il recettore hA₃.

Tramite la validazione del modello CoMFA, costruito precedentemente dal dott. Stefano Moro dell'Università di Padova e dal dott. Paolo Braiuca, si sono potuti chiarire i risultati ottenuti dai precedenti studi, attribuendo ad ogni sostituente caratteristiche ottimali per l'interazione con questo sottotipo recettoriale.

Infatti, per quanto riguarda il sostituente in N⁸, sembrano preferibili catene alifatiche di piccole dimensioni, mentre per il sostituente in N⁵, il miglior gruppo risulta essere quello che presenta, oltre alla porzione ureidica, un gruppo arilico sostituito in *para* con un piccolo gruppo polare.

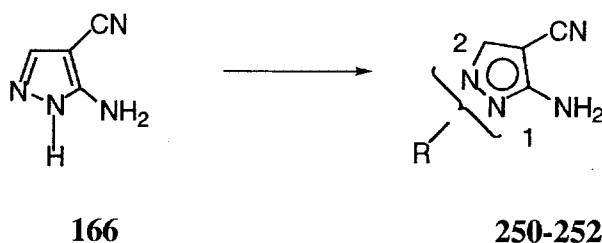
Queste nuove informazioni potranno essere usate in futuro per la progettazione e, quindi, la sintesi, di nuove classi di antagonisti per il recettore hA₃; inoltre, tramite ulteriori studi di docking (docking del modello CoMFA nel recettore hA₃), sarà possibile definire, in maggiore dettaglio, i residui amminoacidici che intervengono nell'interazione tra recettore e ligando.

5. 5. PARTE SPERIMENTALE

5. 5. 1. CHIMICA

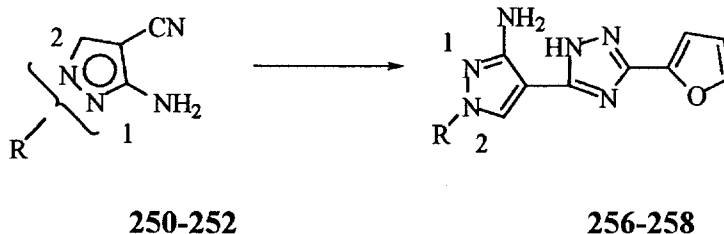
Procedura generale per la preparazione del 5-ammino-8-(n-octil/ cicloesilmetil/ isopentil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (52, 230, 231)

Una soluzione di 5-ammino-4-cianopirazolo (**166**) (10 mmoli) in 40 ml di DMF anidra, viene raffreddata a 0 °C e trattata con NaH (60% in olio, 12 mmoli) in varie porzioni in 10 minuti. Dopo 45 minuti, è aggiunto l'appropriato alogenuro (**247-249**) (12 mmoli) e la miscela di reazione è lasciata a 25 °C sotto agitazione per 3-5 h (TLC: AcOEt/etere di petrolio 1:1). Terminata la reazione, si aggiunge H₂O (80 ml), e si estrae con AcOEt (5 x 25 ml). Le fasi organiche sono riunite, anidrificate (Na₂SO₄) filtrate e concentrate a pressione ridotta, a fornire il pirazolo alchilato (**250-252**) come una miscela inseparabile di isomeri N¹ e N² (rapporto circa 1:4).

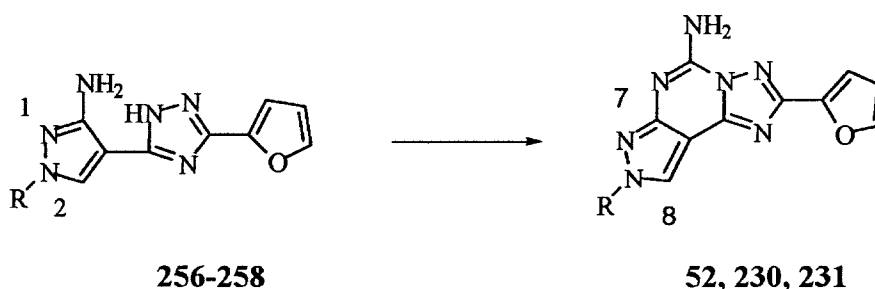


Tale miscela, (**250-252**), viene fatta reagire con trietilortoformiato per dare il corrispondente imminoetere (253-255), poi viene disciolta in difenilettere (50 ml), e fatta reagire con l'idrazide dell'acido-2-furoico (13 mmoli); la soluzione ottenuta viene scaldata a 260°C (utilizzando un Dean-Stark per l'eliminazione azeotropica dell'acqua prodotta durante la reazione). Dopo 2.5 ore, la miscela viene versata in esano raffreddato a 0 °C (300 ml). Il precipitato grezzo, del pirazolo triazolo (**256-258**), viene filtrato e utilizzato nel successivo step, senza nessuna purificazione.

Il residuo grezzo è dissolto in N-metilpirrolidone (40 ml), cianammide (60 mmoli) e acido p-toluensolfonico (15 mmoli). La miscela risultante è scaldata a 160 °C per 4 ore. In seguito, viene fatta un'ulteriore aggiunta di cianammide (60 mmoli), e la soluzione viene riscaldata ulteriormente per tutta la notte.



La soluzione viene poi diluita con AcOEt (80 ml) e il precipitato (eccesso di cianammide) viene allontanato per filtrazione; la fase organica viene poi concentrata e lavata con acqua (3 x 30 ml) per allontanare l'eccesso di 1-metil-2-pirrolidone; viene anidrificata (Na_2SO_4) e concentrata sotto vuoto. Il residuo viene quindi purificato mediante flash cromatografia (AcOEt/etere di petrolio 3:7) per dare il prodotto desiderato (52, 230, 231).



5-Ammino-8-(isopentil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (52)

resa 60%; solido bianco; p.f. 120°C; IR (KBr): 3500-2850, 1670, 1650, 1615, 1560, 1455 cm^{-1}

^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.96 (d, 6H, $J=6.4$); 1.59 (m, 1H); 1.86 (m, 2H); 4.32 (t, 2H, $J=6.4$); 6.58 (m, 1H); 6.72 (bs, 2H); 7.21 (d, 1H, $J=4.2$); 7.63 (d, 1H, $J=1.2$); 8.10 (s, 1H)

5-Amino-8-*n*-octil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (230)

resa 45%; solido marrone chiaro; p.f. 135 °C; IR (KBr): 3430-2950, 1680, 1655, 1620, 1550, 1450 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.78 (t, 2H, $J = 7$); 1.01-1.25 (m, 10H); 1.62-1.99 (m, 2H); 4.22 (t, 2H, $J = 7$); 6.67 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.14 (d, 1H, $J = 4$); 7.57 (bs, 2H); 7.88 (d, 1H, $J = 2$); 8.58 (s, 1H).

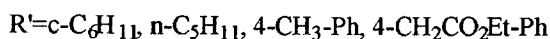
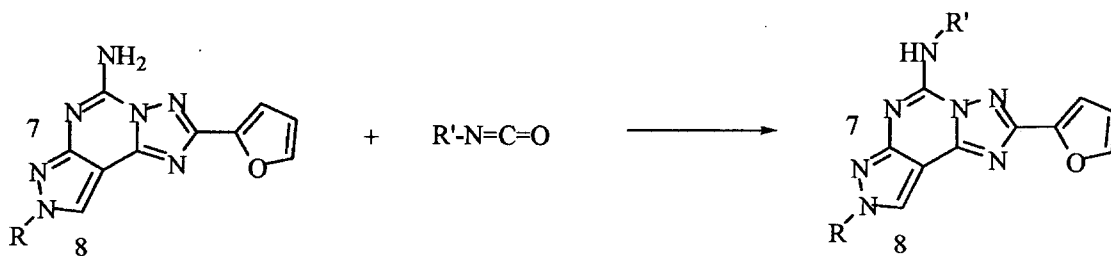
5-Amino-8-cicloiesilmetil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (231)

resa 38%; solido marrone chiaro; p.f. 195 °C; IR (KBr): 3445-2960, 1675, 1650, 1615, 1555, 1450 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 0.89-1.08 (m, 4H); 1.43-1.49 (m, 4H); 1.71-1.89 (m, 1H); 4.08 (d, 2H, $J = 6$); 6.68 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.14 (d, 1H, $J = 4$); 7.58 (bs, 2H); 7.89 (d, 1H, $J = 2$); 8.54 (s, 1H).

Procedura generale per la preparazione del 5-[[*(alchil/aril)ammino*]carbonil]ammino-8-(*ar*)alchil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (232-246)

Il composto ottenuto (187, 230, 231, 52) (10 mmoli) è disciolto in diossano distillato di fresco (15 ml) e l'appropriato isocianato (259-262) viene aggiunto. La miscela è portata a riflusso sotto argon per 18 ore.

Il solvente viene rimosso tramite distillazione a pressione ridotta, e il residuo purificato mediante flash cromatografia (AcOEt/etere di petrolio 7:3). Si ottengono i composti desiderati (232-246).



187, 52, 230, 231

259-262

232-246

5-[[Cicloesil]amino]carbonil]amino-8-metil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (232)

resa 90%; solido bianco; p.f. 208-210 °C; IR (KBr): 3245-2950, 1675, 1615, 1600, 1520 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.01-1.95 (m, 10H); 3.26-3.29 (m, 1H); 4.06 (s, 3H); 6.68 (dd, 1H, $J = 2$, $J = 4$); 7.25 (d, 1H, $J = 4$); 7.94 (d, 1H, $J = 2$); 8.72 (s, 1H); 8.73 (bs, 1H); 9.01 (bs, 1H).

5-[[*n*-Pentil]amino]carbonil]amino-8-metil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (233)

resa 82%; solido bianco; p.f. 185-188 °C; IR (KBr): 3240-2970, 1670, 1620, 1600, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 7$); 1.10-1.51 (m, 6H); 3.26-3.29 (m, 1H); 4.09 (s, 3H); 6.72 (dd, 1H, $J = 2$, $J = 4$); 7.26 (d, 1H, $J = 4$); 7.96 (d, 1H, $J = 2$); 8.72 (s, 1H); 8.73 (bs, 1H); 8.98 (bs, 1H).

4-[3-(2-Furan-2-il-8-metil-8H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidin-5-il)-ureido]-fenilacetato di etile (234)

resa 82%; solido grigio pallido; p.f. 222-224 °C; IR (KBr): 3250-2960, 1725, 1675, 1615, 1600, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.23 (t, 3H, $J = 7$); 3.62 (s, 2H); 4.16 (q, 2H, $J = 7$); 6.72 (dd, 1H, $J = 2$, $J = 4$); 7.17 (d, 2H, $J = 9$); 7.26 (d, 1H, $J = 4$); 7.71 (d, 2H, $J = 7$); 7.76 (d, 1H, $J = 2$); 8.15 (s, 1H); 8.56 (bs, 1H); 11.13 (bs, 1H).

5-[[Cicloesil]amino]carbonil]amino-8-isopentil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (235)

resa 87%; solido bianco; p.f. 165 °C; IR (KBr): 3250-2970, 1673, 1610, 1600, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.88 (d, 6H, $J = 6$); 1.15-1.99 (m, 13H); 3.61-3.63 (m, 1H); 4.21 (t, 2H, $J = 7$); 6.65 (dd, 1H, $J = 2$, $J = 4$); 7.23 (d, 1H, $J = 4$); 7.97 (d, 1H, $J = 2$); 8.64 (bs, 1H); 8.81 (s, 1H); 9.00 (bs, 1H).

5-[[(*n*-Pentil)amino]carbonil]amino-8-isopentil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-*e*] 1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (236)

resa 87%; solido bianco; p.f. 178-180 °C; IR (KBr): 3245-2955, 1675, 1625, 1600, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.79-0.99 (m, 9H); 1.11-1.59 (m, 11H); 1.64-1.81(m, 2H); 4.35 (t, 2H, $J = 7$); 6.68 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.25 (d, 1H, $J = 4$); 7.94 (d, 1H, $J = 2$); 8.63 (bs, 1H); 8.81 (s, 1H); 9.02 (bs, 1H).

4-[3-(2-Furan-2-il-8-isopentil-8H-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-fenilacetato di etile (237)

resa 68%; solido marrone chiaro; p.f. 163 °C; IR (KBr): 3230-2950, 1723, 1670, 1625, 1600, 1500 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.96 (d, 6H, $J = 6$); 1.23 (t, 3H, $J = 7$); 1.25-1.28 (m, 1H); 3.59 (s, 1H); 4.19 (t, 2H, $J = 7$); 4.39 (q, 2H, $J = 7$); 6.61 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.17 (d, 2H, $J = 9$); 7.30 (d, 1H, $J = 4$); 7.61 (d, 2H, $J = 7$); 7.65 (d, 1H, $J = 2$); 8.21 (s, 1H); 8.57 (bs, 1H); 11.12 (bs, 1H).

5-[[4-Tolil]amino]carbonil]amino-8-isopentil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (238)

resa 81%; solido giallo chiaro; p.f. 223-228 °C; IR (KBr): 3235-2945, 1672, 1620, 1600, 1505 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.96 (d, 6H, $J = 6$); 1.16-1.22 (m, 1H); 1.89-1.92 (m, 2H); 2.32 (s, 3H); 4.39 (t, 2H, $J = 7$); 6.59 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.14 (d, 2H, $J = 9$); 7.25 (d, 1H, $J = 4$); 7.54 (d, 2H, $J = 9$); 7.64 (d, 1H, $J = 2$); 8.21 (s, 1H); 8.56 (bs, 1H); 11.01 (bs, 1H).

5-[[Cicloesil]amino]carbonil]amino-8-*n*-octil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidina (239)

resa 80%; solido bianco p.f. 123-125 °C; IR (KBr): 3235-2945, 1665, 1615, 1560 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.80 (t, 3H, $J = 7$); 1.01-2.00 (m, 22H); 3.59-3.62 (m, 1H); 4.32 (t, 2H, $J = 7$); 6.72 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.25 (d, 1H, $J = 4$); 7.95 (d, 1H, $J = 2$); 8.68 (bs, 1H); 8.78 (s, 1H); 8.99 (bs, 1H).

**5-[[(*n*-Pentil)amino]carbonil]amino-8-*n*-octil-2-(2-furil)pirazolo[4,3-
e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidina (240)**

resa 78%; solido bianco; p.f. 125 °C; IR (KBr): 3250-2970, 1663, 1610, 1545 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.78-0.84 (m, 6H); 1.04-1.32 (m, 16H); 1.42-1.50 (m, 2H); 1.79-1.98 (m, 2H); 4.38 (t, 2H, J = 7); 6.69 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.22 (d, 1H, J = 4); 7.93 (d, 1H, J = 2); 8.65 (bs, 1H); 8.77 (s, 1H); 9.01 (bs, 1H). Anal. (C₂₄H₃₄N₈O₂) C, H, N.

**4-[3-(2-Furan-2-il-8-*n*-octil-8H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidin-5-il)-
ureido]-fenilacetato di etile (241)**

resa 87%; solido bianco; p.f. 150-154 °C; IR (KBr): 3240-2950, 1730, 1665, 1615, 1600, 1530 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.86 (t, 3H, J = 7); 1.09-1.31 (m, 13H); 1.97-2.11 (m, 2H); 3.56 (s, 1H); 4.15 (q, 2H, J = 7); 4.36 (t, 2H, J = 7); 6.62 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.19 (d, 2H, J = 9); 7.23 (d, 1H, J = 4); 7.62 (d, 2H, J = 7); 7.64 (d, 1H, J = 2); 8.21 (s, 1H); 8.57 (bs, 1H); 11.13 (bs, 1H).

**5-[[4-Tolil)amino]carbonil]amino-8-*n*-octil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-
c]pirimidina (242)**

resa 77%; solido bianco; p.f. 226-228 °C; IR (KBr): 3230-2940, 1675, 1615, 1580 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.84 (t, 3H, J = 7); 1.09-1.21 (m, 10H); 1.95-2.05 (m, 2H); 2.31 (s, 3H); 4.36 (t, 2H, J = 7); 6.60 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.15 (d, 2H, J = 9); 7.23 (d, 1H, J = 4); 7.55 (d, 2H, J = 9); 7.64 (d, 1H, J = 2); 8.20 (s, 1H); 8.56 (bs, 1H); 11.02 (bs, 1H).

**5-[[Cicloesil)amino]carbonil]amino-8-cicloesilmetil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-e] 1,2,4-
triazolo[1,5-c] pirimidina (243)**

resa 74%; solido bianco; p.f. 130 °C; IR (KBr): 3245-2935, 1672, 1610, 1560 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.93-2.01 (m, 21H); 3.48-3.56 (m, 1H); 4.19 (d, 2H, J = 6); 6.78 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.22 (d, 1H, J = 4); 7.98 (d, 1H, J = 2); 8.63 (bs, 1H); 8.76 (s, 1H); 8.98 (bs, 1H).

5-[[(*n*-Pentil)amino]carbonil]amino-8-*n*-octil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-*e*] 1,2,4-triazolo[1,5-*c*] pirimidina (244)

resa 83%; solido bianco; p.f. 170 °C; IR (KBr): 3245-2965, 1665, 1615, 1550 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.82-1.97 (m, 22H); 4.11 (d, 2H, J = 6); 6.72 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.25 (d, 1H, J = 4); 7.94 (d, 1H, J = 2); 8.73 (bs, 1H); 8.75 (s, 1H); 8.97 (bs, 1H).

4-[3-(2-Furan-2-il-8-cicloesilmetil-8H-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-il)-ureido]-fenilaceato di etile (245)

resa 69%; solido bianco; p.f. 185 °C; IR (KBr): 3255-2966, 1725, 1670, 1625, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.20 (t, 3H, J = 7); 1.41-1.92 (m, 11H); 3.59 (s, 1H); 4.12 (d, 2H, J = 6); 4.16 (q, 2H, J = 7); 6.61 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.21 (d, 2H, J = 9); 7.24 (d, 1H, J = 4); 7.61 (d, 2H, J = 7); 7.63 (d, 1H, J = 2); 8.17 (s, 1H); 8.59 (bs, 1H); 11.15 (bs, 1H).

5-[[4-(4-Tolil)amino]carbonil]amino-8-cicloesilmetil-2-(2-furil) pirazolo[4,3-*e*] 1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina (246)

resa 87%; solido bianco; p.f. 206-210 °C; IR (KBr): 3250-2955, 1673, 1620, 1570 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.93-1.21(m, 6H); 1.42-1.78 (m, 4H); 1.97-2.12 (m, 1H); 2.29 (s, 3H); 4.15 (d, 2H, J = 6); 6.59 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.18 (d, 2H, J = 9); 7.24 (d, 1H, J = 4); 7.51 (d, 2H, J = 9); 7.64 (d, 1H, J = 2); 8.16 (s, 1H); 8.56 (bs, 1H); 11.00 (bs, 1H).

6. EFFETTO DEL SOSTITUENTE IN N5 SUI RECETTORI hA_{2B} E hA_3

6.1. INTRODUZIONE

Grazie ai numerosi antagonisti a struttura pirazolo-triazolo-pirimidinica, è emerso un profilo SAR piuttosto dettagliato riguardante il sottotipo recettoriale umano A_3 (hA_3).

L'osservazione più interessante è che la sostituzione della catena fenilcarbamoilica con una catena fenilacetica (classica sostituzione bioisosterica di $-NH-$ con $-CH_2$) a parità di sostituzione in N8 (es. composto **162**), provoca una significativa riduzione di affinità verso hA_3 (circa 5 volte) e una ritenzione o un leggero aumento di affinità verso il recettore umano A_{2B} (hA_{2B}).

Più complesso risulta il discorso riguardante le pirazolo-triazolo-pirimidine come possibili antagonisti A_{2B} selettivi.

In un random screening di prodotti precedentemente sintetizzati è stato possibile estrapolare un profilo di SAR come sintetizzato in **Figura 36**.

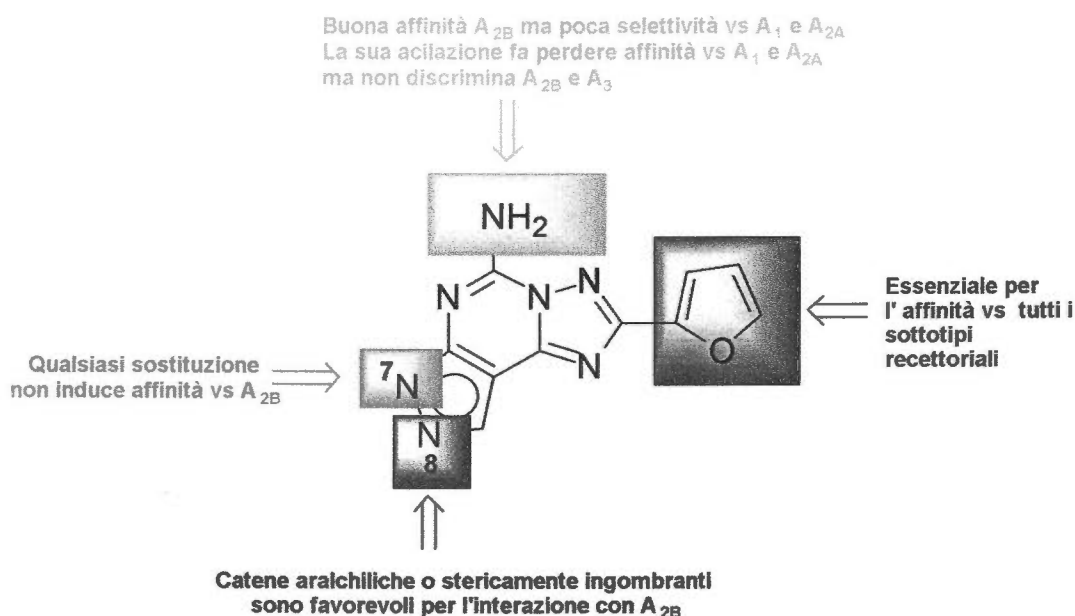
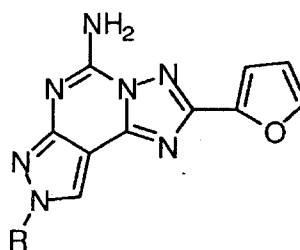


Figura 36. Profilo di SAR di pirazolo-triazolo-pirimidine come A_{2B} antagonisti

In pratica si è osservato che catene ingombranti stericamente (es. isopentile (52), feniletile (53), fenilpropile (97)) in posizione N8 sono favorevoli per l'affinità verso gli hA_{2B} . Al contrario la presenza del sostituente in N7 porta ad una totale inattività ($>10 \mu\text{M}$).¹²³

Per quanto riguarda la sostituzione del gruppo amminico, questa sembrerebbe indurre perdita di affinità verso hA_{2B} , mentre il gruppo amminico libero genera composti con buona affinità verso tali recettori (Figura 37).



R= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 52

$hA_1 = 2 \text{ nM}$
 $hA_{2A} = 0.80 \text{ nM}$
 $hA_{2B} = 9.58 \text{ nM}$
 $hA_3 = 958 \text{ nM}$

R= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, 53

$hA_1 = 1 \text{ nM}$
 $hA_{2A} = 0.31 \text{ nM}$
 $hA_{2B} = 5 \text{ nM}$
 $hA_3 = 2,030 \text{ nM}$

R= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, 97

$hA_1 = 3 \text{ nM}$
 $hA_{2A} = 0.18 \text{ nM}$
 $hA_{2B} = 48.3 \text{ nM}$
 $hA_3 = 2,378 \text{ nM}$

Figura 37. Composti con NH_2 libero in N5

Purtroppo la presenza del gruppo amminico libero è anche una caratteristica degli antagonisti A_1 e A_{2A} ^{92,93,94} per cui, anche se i composti riportati mostrano buona affinità verso i recettori hA_{2B} , risultano essere completamente non selettivi.

Questi studi preliminari indicano evidentemente una situazione ancora non chiara su quali siano i requisiti strutturali necessari per avere affinità e selettività verso il sottotipo recettoriale A_{2B} .

Sulla base di tutte queste osservazioni, si é deciso di sintetizzare alcuni ibridi molecolari a struttura pirazolo-triazolo-pirimidinica, sostituiti in N8 con catene ottimali per l'interazione con i recettori A_{2B} (feniletile, fenilpropile, isopentile) e contemporaneamente in N5 catene a base fenilacetica (Figura 38).

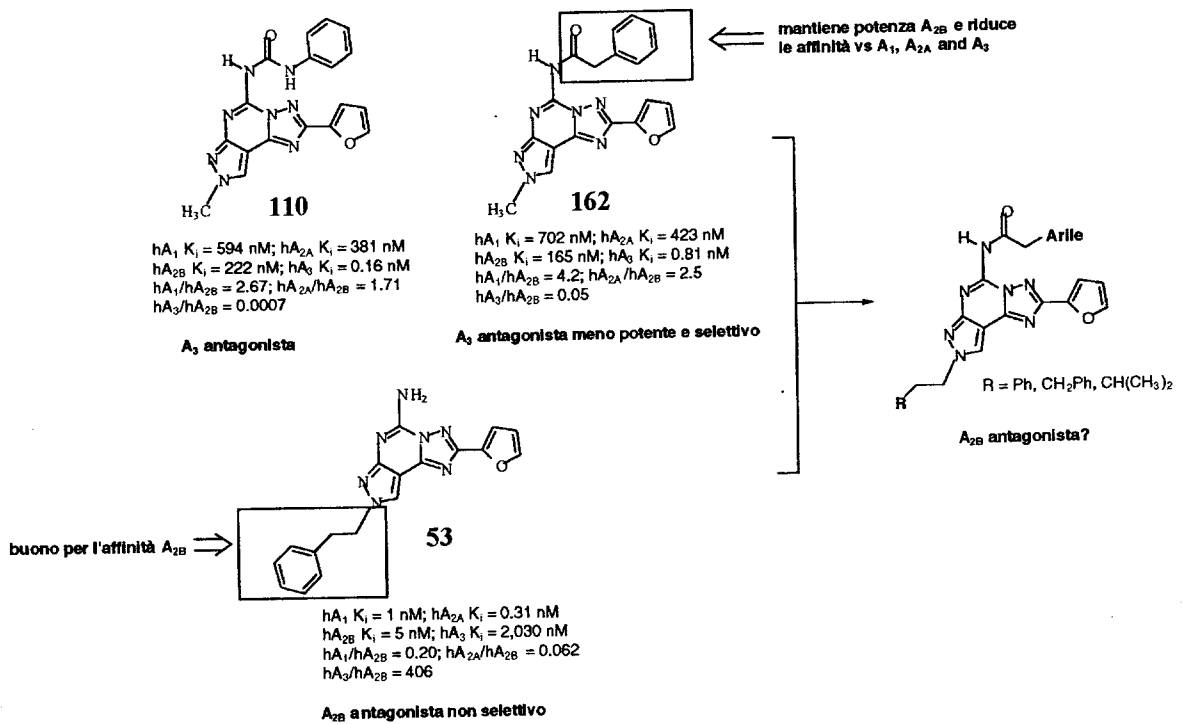
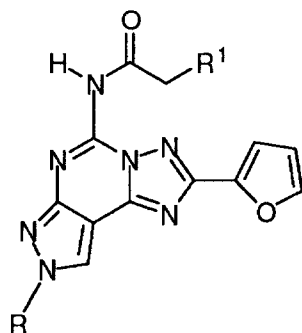


Figura 38. Razionale A_{2B}

Teoricamente questa combinazione di sostituzioni dovrebbe consentire di avere una certa affinità verso il recettore umano A_{2B} , ma soprattutto permettere di discriminare nei confronti degli altri sottotipi recettoriali. Infatti, la presenza delle catene fenilacetiche dovrebbe ridurre l'affinità nei confronti dei recettori A_1 e A_{2A} , mentre catene stericamente ingombranti in posizione N8 sfavorirebbero l'interazione verso hA_3 . Tutti i composti sintetizzati (263-271, Tabella 17) sono stati valutati in saggi di binding nei confronti di tutti i sottotipi recettoriali.

Tabella 17. Strutture dei composti sintetizzati (263-271)

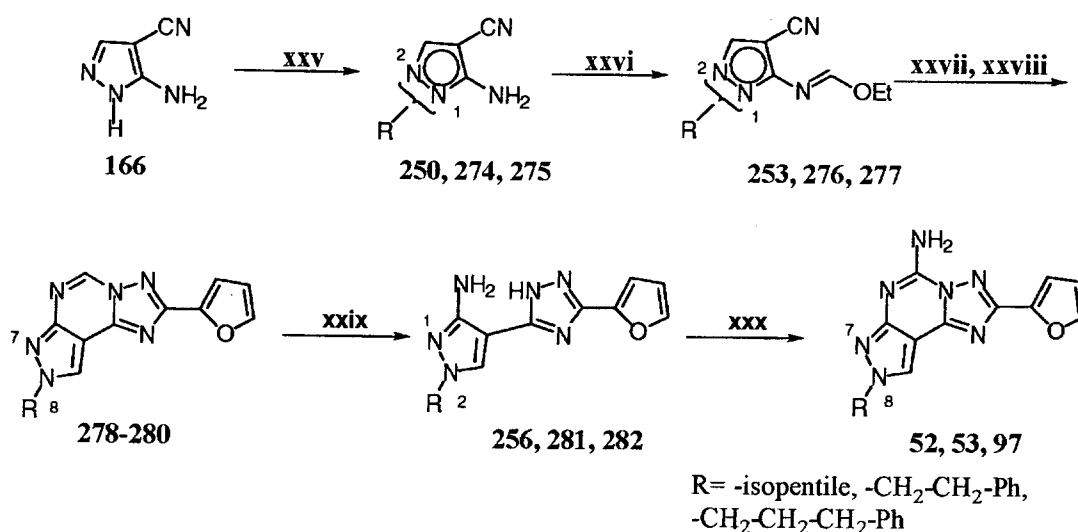


Composto	R	R ¹
263	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂	Ph
264	PhCH ₂ CH ₂	Ph
265	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂	Ph
266	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂	α-naphthyl
267	PhCH ₂ CH ₂	α-naphthyl
268	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂	α-naphthyl
269	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂	Ph-O
270	PhCH ₂ CH ₂	Ph-O
271	PhCH ₂ CH ₂ CH ₂	Ph-O

6.2. CHIMICA

I composti (263-271) sono stati sintetizzati seguendo la procedura, già precedentemente descritta, per la sintesi delle pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine, come riassunto nello Schema 9.

Schema 9



Reagenti: xxv) NaH, DMF, RX (247, 272, 273); xxvi) HC(OEt)₃, riflusso; xxvii) idrazide dell'acido 2-furoico, MeO(CH₂)₂OH; xxviii) Ph₂O, 260°C, flash cromatografia; xxix) HCl, riflusso; xxx) NH₂CN, 1-metil-2-pirrolidone, pTsOH, 140°C

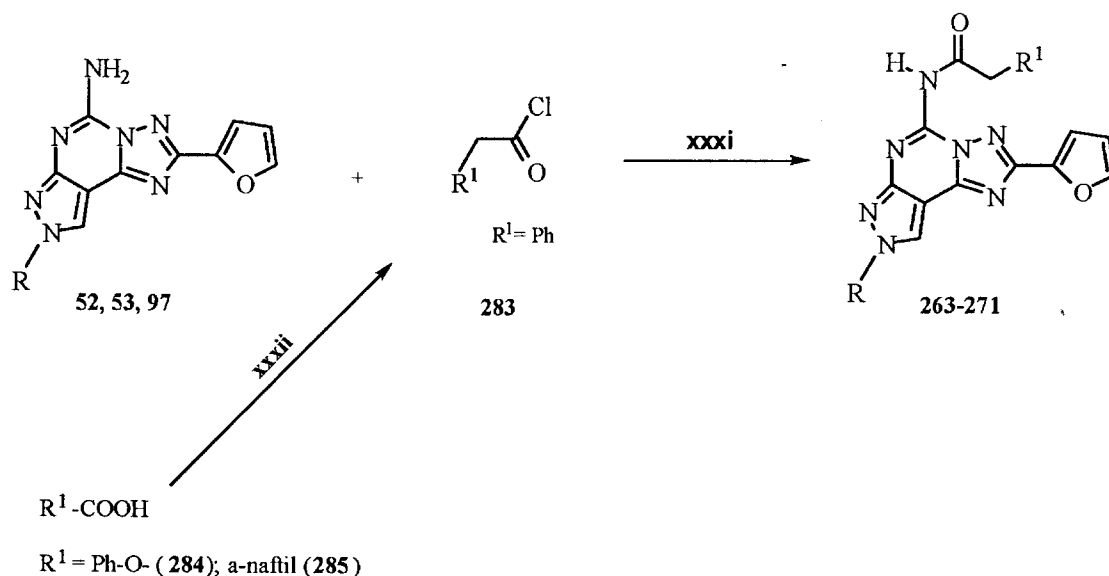
Anche in questo caso, l'alchilazione del 5-ammino-4-cianopirazolo (166), in presenza di NaH in DMF, con l'opportuno alogenuro alchilico (247, 272, 273), porta ad una miscela inseparabile di due regioisomeri (250, 274, 275) in rapporto N1:N2 pari a 1:4.

Per successivo riscaldamento a riflusso con trietilortoforniato si ottengono i corrispondenti imminoeteri (253, 276, 277) i quali, per reazione con l'idrazide dell'acido furoico, in 2-metossietanolo, e successiva ciclizzazione termica in difenilettere a 260°, generano le pirazolo-triazolo-pirimidine (278-280). Mediante flash cromatografia vengono separati i due regioisomeri N7 (minor quantità) e N8 (prodotto predominante). Per idrolisi con HCl al 10%

in diossano, si ottengono gli amminotriazoli (256, 281, 282) i quali, per reazione con cianammide, in presenza di acido p-toluensolfonico in 1-metil-2-pirrolidone, a 140° , portano alle 5-ammino pirazolo-triazolo-pirimidine (52, 53, 97) in buona resa.

I prodotti finali (263-271) si ottengono mediante coupling fra le pirazolo-triazolo-pirimidine (52, 53, 97) e l'appropriato arilacetilcloruro (283) in diossano anidro, in presenza di trietilammina a riflusso per 12 ore. Quando il cloruro acilico non era disponibile commercialmente, è stato preparato mediante reazione del corrispondente acido (284, 285) con cloruro di tionile in eccesso, in presenza di alcune gocce di dimetil formammide a temperatura ambiente per 2 ore (Schema 10).

Schema 10



Reagenti: xxxi): diossano anidro, Et_3N , riflusso, 12 ore; **xxxii):** SOCl_2 , DMF, rt

I prodotti ottenuti sono stati purificati mediante flash cromatografia e caratterizzati mediante spettroscopia IR, $^1\text{H-NMR}$, punto di fusione e analisi elementare.

6.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'attività dei composti sintetizzati è stata valutata in saggi di binding nei confronti dei recettori umani clonati A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 espressi in cellule CHO (A_1 , A_{2A} , A_3) e HEK-293 (A_{2B}) utilizzando come radioligandi rispettivamente [3H]-1,3-dipropil-8-ciclopentil xantina ([3H]-DPCPX)¹⁶³ (A_1 e A_{2B}), [3H]-4-[2-[[7-ammino-2-(2-furil)-[1,2,4]-triazolo-[2,3-a]-[1,3,5]-triazin-5-il]ammino]etil]fenolo ([3H]-ZM241385)⁹⁵ (A_{2A}), e [3H]-5-(4-metossifenilcarbamoil)ammino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]-pirimidina ([3H]-MRE3008-F20) (A_3).¹⁶⁵

I risultati sono riassunti in **Tabella 18**.

Come sperato tutti i composti sintetizzati (263-271) hanno mostrato buona affinità verso il recettore A_{2B} nel range nanomolare (20-40 nM), con diversi livelli di selettività nei confronti degli altri sottotipi recettoriali (da 1 a 55 volte).

Si deve tener presente che, mentre l'affinità nei confronti del recettore A_{2B} è simile per tutti i composti, indipendentemente dalle sostituzioni in N5 e N8, risulta notevolmente differente l'affinità nei confronti degli altri sottotipi recettoriali, indicando chiaramente che questa combinazione di sostituenti influenza notevolmente la selettività.

In particolare, l'introduzione di una catena fenilacetica in posizione 5 e la concomitante sostituzione in 8 con una catena aralchilica è in grado, come atteso, di ridurre significativamente l'affinità nei confronti del recettore umano A_3 , inducendo altresì un incremento di affinità nei confronti del recettore A_{2B} .

Per meglio evidenziare questo fenomeno, basta confrontare i valori di affinità del composto 110 (hA_1 K_i = 594 nM, hA_{2A} K_i = 381 nM, hA_{2B} K_i = 222 nM, hA_3 K_i = 0.16 nM) con quelle del derivato 264 (hA_1 K_i = 120 nM, hA_{2A} K_i = 60 nM, hA_{2B} K_i = 35 nM, hA_3 K_i = 45 nM).

Va anche notato che l'introduzione di catene fenilacetiche in N5 è in grado di far diminuire significativamente l'affinità nei confronti di A_1 e A_{2A} rispetto ai derivati N5 non sostituiti (es.

composto **53** (hA_1 $K_i = 1$ nM, hA_{2A} $K_i = 0.31$ nM, hA_{2B} $K_i = 5$ nM, hA_3 $K_i = 2,030$ nM) e composto **264** (hA_1 $K_i = 120$ nM, hA_{2A} $K_i = 60$ nM, hA_{2B} $K_i = 35$ nM, hA_3 $K_i = 45$ nM).

Tabella 18. Affinità di binding vs i recettori hA_1 , hA_{2A} , hA_{2B} e hA_3 dei composti sintetizzati

Comp.	hA_1^a (K_i , nM)	hA_{2A}^b (K_i , nM)	hA_{2B}^c (K_i , nM)	hA_3^d (K_i , nM)	hA_1/hA_{2B}	hA_{2A}/hA_{2B}	hA_3/hA_{2B}
263	200±23	57±4	31±3	81±6	6.4	1.8	2.6
264	120±14	60±7	35±5	45±5	3.4	1.7	1.3
265	75±3	60±5	40±3	121±10	1.9	1.5	3
266	142±12	42±3	28±3	215±22	5.07	1.5	7.7
267	90±11	55±6	30±4	120±14	3	1.8	4
268	1,100±100	800±104	20±3	300±28	55	40	15
269	55±5	38±4	25±2	50±5	2.2	1.5	2
270	20±2	40±3	22±3	300±28	0.9	18	13.6
271	50±4	45±5	25±4	40±4	2	1.8	1.6

^aSpiazzamento del legame specifico del composto [3 H]-DPCPX dal recettore umano A_1 espresso in cellule CHO, (n=3-6). ^bSpiazzamento del legame specifico del composto [3 H]-ZM 241385 dal recettore umano A_{2A} espresso in cellule HEK-293. ^cSpiazzamento del legame specifico del composto [3 H]-DPCPX dal recettore umano A_{2B} espresso in cellule HEK-293, (n=3-6). ^dSpiazzamento del legame specifico del composto [3 H]MRE3008-F20 dal recettore umano A_3 espresso in cellule HEK-293. I dati sono espressi come $K_i \pm$ SEM in nM (n=3-6).

Analizzando attentamente i risultati, è evidente che l'inserimento di un ossigeno, nella catena fenilacetica in N5, non modifica significativamente il profilo biologico dei derivati nei confronti del recettore A_{2B} (es. composto **263**, hA_1 $K_i = 200$ nM, hA_{2A} $K_i = 57$ nM, hA_{2B} K_i

= 31 nM, hA_3 Ki = 81 nM e composto **269**, hA_1 Ki = 55 nM, hA_{2A} Ki = 38 nM, hA_{2B} Ki = 25 nM, hA_3 Ki = 50 nM), mentre si osserva un leggero incremento di affinità vs A_1 e A_{2A} con conseguente riduzione della selettività.

Va osservato, infine, che la simultanea presenza di una catena aralchilica abbastanza lunga, quale il fenilpropile in N8, e di una catena arilacetica estremamente ingombrante e lipofilica, quale l' α -naftile in N5, porta all'unico derivato di questa serie che presenti una buona affinità nei confronti di hA_{2B} ma soprattutto una significativa selettività nei confronti degli altri sottotipi recettoriali (composto **268**, hA_1 Ki = 1,100 nM; hA_{2A} Ki = 800 nM; hA_{2B} Ki = 20 nM; hA_3 Ki = 300 nM, hA_1/A_{2B} = 55, h_{2A}/A_{2B} = 40, hA_3/hA_{2B} = 15).

Allo stato attuale, questo derivato può essere considerato uno dei primi esempi di antagonista per il recettore adenosinico umano A_{2B} , a struttura non-xantinica, dotato di buona affinità e selettività.

Inoltre, è stato associato un saggio funzionale (Tabella 19 e Figura 39), che valuta il blocco della produzione di cAMP, indotto da NECA 100 nM, da parte degli antagonisti. Tutti i composti sintetizzati hanno evidenziato una IC_{50} nel range nanomolare (110-250 nM), con andamento prossimo ai valori di binding. Nel complesso, questi studi hanno permesso di ottenere risultati soddisfacenti sia in termini di affinità che di selettività per quanto riguarda nuovi antagonisti A_{2B} a struttura non xantinica, e sono state poste le basi per l'ottimizzazione dei requisiti strutturali indispensabili per il riconoscimento molecolare di questo sottotipo recettoriale.

Tuttavia resta ancora da chiarire come mai così piccole modifiche strutturali, in particolare la sostituzione di un NH della funzione arilcarbamoilica (caratteristica di A_3 antagonisti, es. composto **110**) con un CH_2 , possano indurre una così significativa variazione del profilo biologico di questa classe di composti.

Tale fenomeno potrebbe essere spiegato con tre differenti ipotesi.

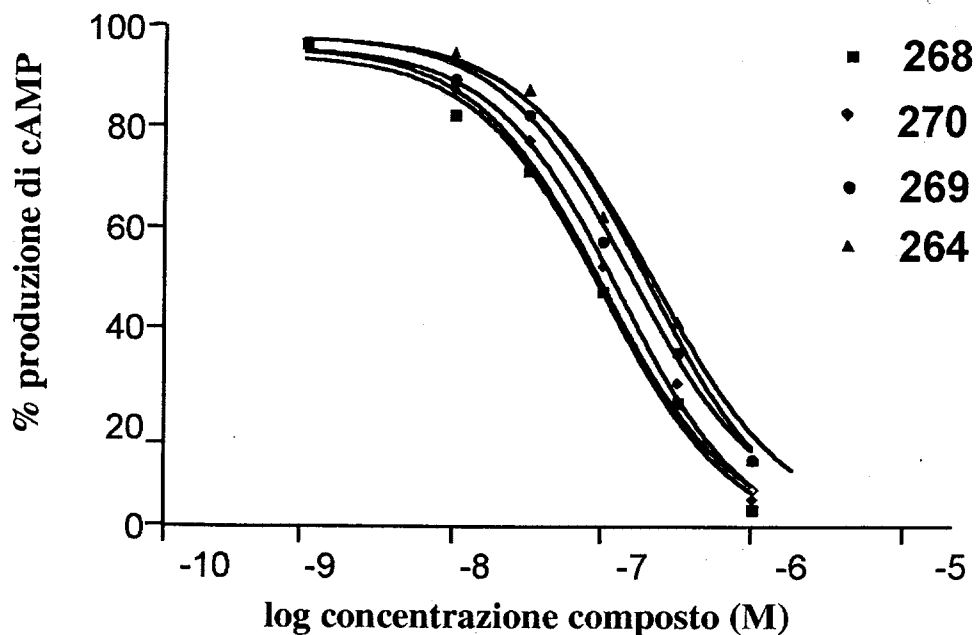
La prima prevede un forte coinvolgimento dei loops extracellulari nella discriminazione dei

vari sottotipi recettoriali, ovvero che la selettività sia mediata dalla porzione esterna del recettore piuttosto che da diversità all'interno del sito di binding. Purtroppo tale teoria non può essere supportata da prove sperimentali (es. studi di mutagenesi o simulazioni grafiche) visto l'elevato grado di libertà che presentano questi loops a causa della bassa presenza di ponti disolfuro, che garantirebbero una certa rigidità al sistema.

Tabella 19. Saggio funzionale: valori di IC_{50} dei composti 263-271 ottenuti dall'inibizione della produzione di cAMP, indotta da NECA 100 nM, su cellule CHO transfettate col recettore hA_{2B} .

Composti	IC_{50} (nM)
263	190 ± 30
264	210 ± 32
265	250 ± 35
266	170 ± 24
267	180 ± 22
268	110 ± 15
269	150 ± 19
270	130 ± 18
271	140 ± 21

Figura 39



La seconda ipotesi si basa sulla possibilità che la presenza dell'NH carbamoilico possa dare origine a legami idrogeno intramolecolari (Figura 40) o intermolecolari (all'interno del sito di binding) che porterebbero a conformazioni differenti all'interno del sito recettoriale.

La sua sostituzione con un CH_2 preverrebbe tale legame a H

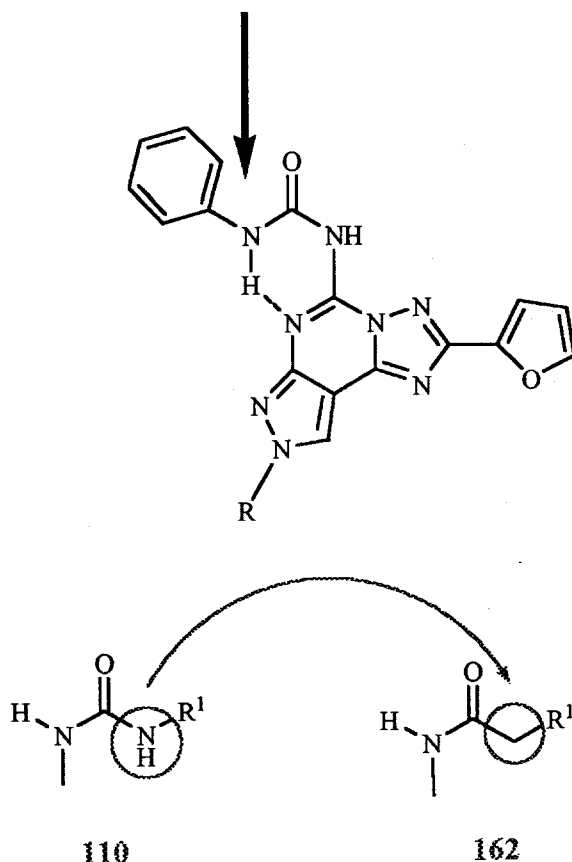


Figura 40. Seconda ipotesi

L'assenza di questo NH, come nei composti riportati in questo lavoro di tesi, potrebbe quindi far sì che la conformazione più stabile di questa classe di composti, all'interno del recettore, sia completamente diversa da quella cui danno origine i composti di tipo ureidico, portando quindi a interazioni completamente differenti all'interno dei siti recettoriali di A_{2B} e A_3 .

La terza ipotesi è basata sulla possibilità che i due sottotipi recettoriali siano al loro interno significativamente diversi, ovvero che la selettività si abbia all'interno del sito di binding, teoria esattamente opposta alla prima.

teoria esattamente opposta alla prima.

Per poter quindi verificare quale di queste ipotesi fosse valida, ed eventualmente analizzare quali altri fenomeni fossero coinvolti nell'interazione con il recettore, è stato effettuato uno studio di docking recettoriale del composto più interessante (268) sia sul sottotipo A_3 che A_{2B} .

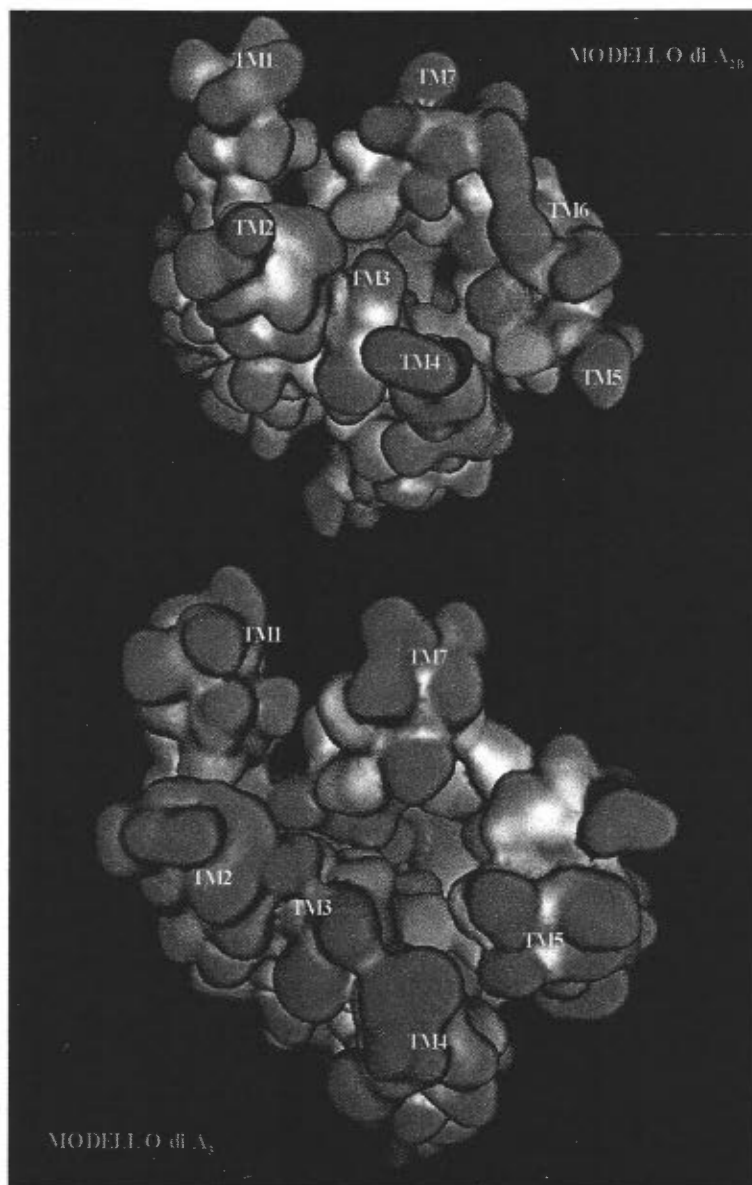


Figura 41. Immagini della superficie molecolare del modello A_{2B} e A_3

Dall'analisi comparativa della topologia dei segmenti transmembrana dei recettori adenosinici di tipo A_{2B} ed A_3 , entrambi costruiti con tecnica di modeling comparativo (comparative modeling) basato sulla struttura cristallografica della rodopsina bovina,¹⁶⁷ si nota che la disposizione assunta dai domini TM3, TM5, TM6 e TM7, di entrambi i recettori, genera una cavità che si distende lungo l'asse perpendicolare alla superficie della membrana citoplasmatica (**Figura 41**).

La profondità relativa di questa cavità è diversa tra i due sottotipi recettoriali ed in particolare risulta essere più profonda nel recettore A_{2B} rispetto al recettore A_3 .

Da un precedente studio di docking molecolare¹⁷⁵ relativo al composto **268** su entrambi i sottotipi recettoriali, appare chiara la preferenza di questo composto ad occupare il volume associato alla presente cavità.

In virtù del fatto che lo spazio conformazionale e l'ingombro sterico associato alle due catene laterali (in posizione 5 e in posizione 8) del composto **268** sono considerevolmente maggiori rispetto agli altri derivati della presente serie, tale derivato trova una più facile collocazione (conformazione più stabile all'interno del recettore basata su un criterio sia sterico che elettrostatico) all'interno della cavità più profonda presente in A_{2B} e non nel sottotipo A_3 .

Come si può vedere nelle **Figure 42-43**, la conformazione assunta dal composto **268** in A_{2B} è completamente distesa lungo questa cavità.

In A_3 invece, dove la cavità è meno profonda, il composto **268** non può assumere questa stessa conformazione e deve adottare un diverso riarrangiamento, che lo porta ad essere quasi perpendicolare all'asse transmembrana (compreso tra TM2, TM3, TM5 e TM6), con il gruppo α -naftilico orientato verso il compartimento extracellulare, ed il gruppo fenilpropilico allungato verso TM2.

Questa differente conformazione, preferenzialmente assunta da **268** nei due diversi sottotipi recettoriali, potrebbe essere in accordo con l'incremento di selettività A_{2B}/A_3 osservato nelle

presente serie di composti all'aumentare della dimensione delle due catene laterali nel sistema tricyclico di partenza.

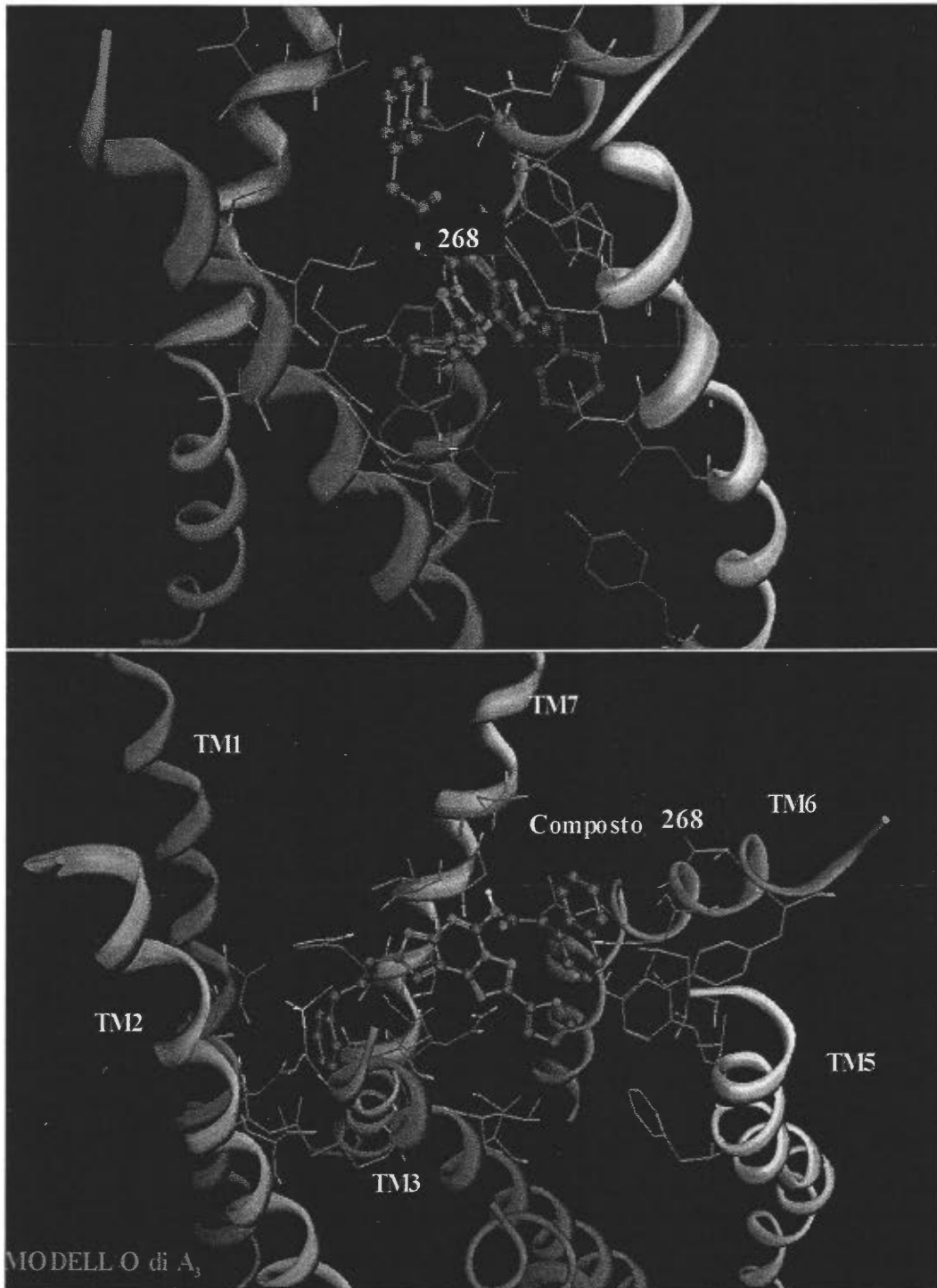


Figura 42. Conformazione ottenuta dal docking del complesso 268-recettore a livello del sito di binding del modello molecolare dei sottotipi A_{2B} e A_3 .

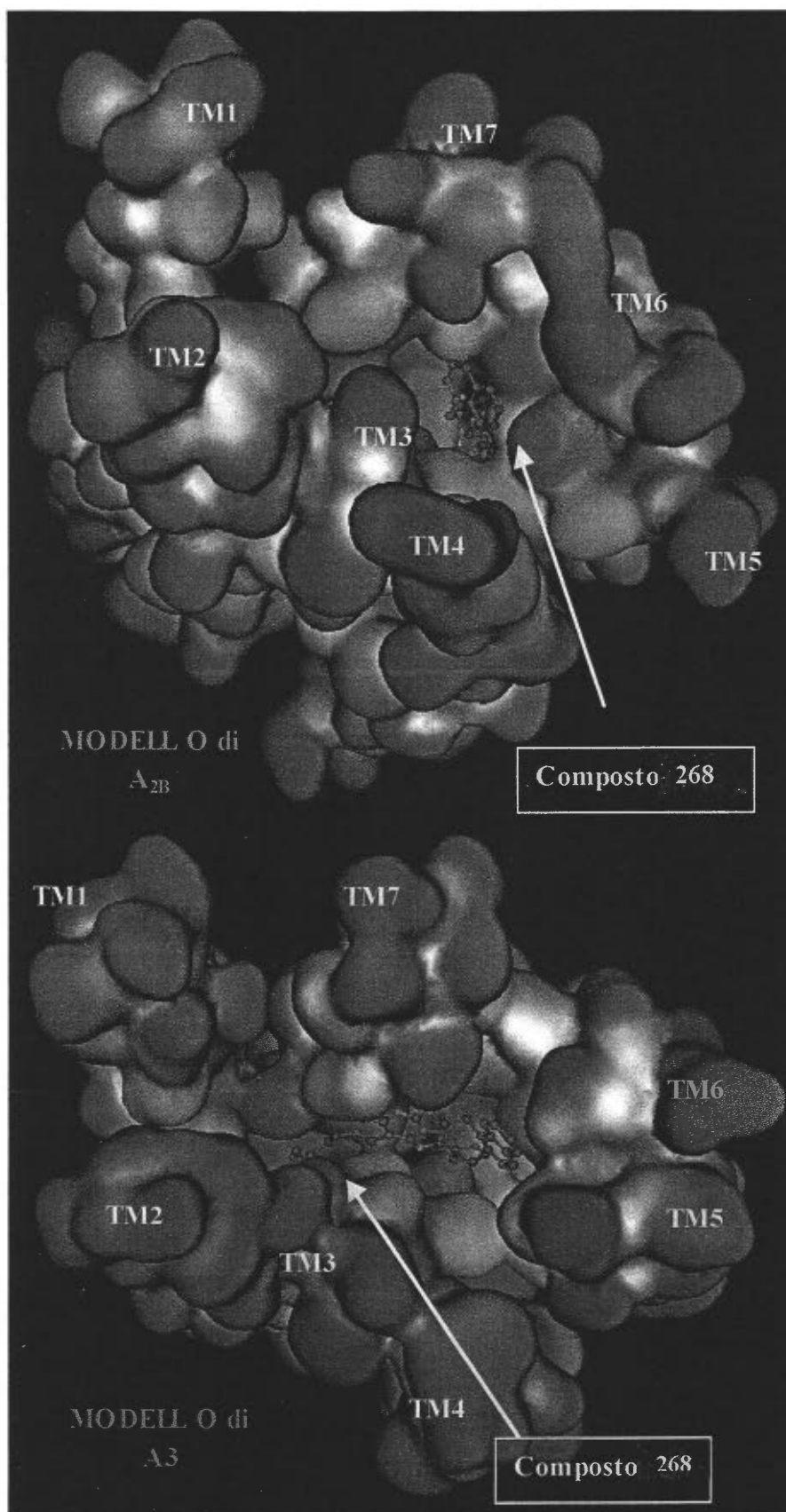


Figura 43. Conformazione ottenuta dal docking del complesso 268-recettore, utilizzando le superfici molecolari dei recettori A_{2B} e A_3 , ottenute con metodo MOE.

In base ad un ulteriore approfondimento, sembra si possa dedurre che questa diversa profondità della cavità sia da attribuirsi ad alcune mutazioni, che compaiono soprattutto a livello di TM5 e TM6, in cui una Phe 187 sostituisce una Leu 192 del recettore A_{2B} . Ovviamente l'ingombro sterico della catena laterale della Phe è aumentato rispetto alla Leu e quindi limita l'accesso alla cavità stessa (Figure 45-49).

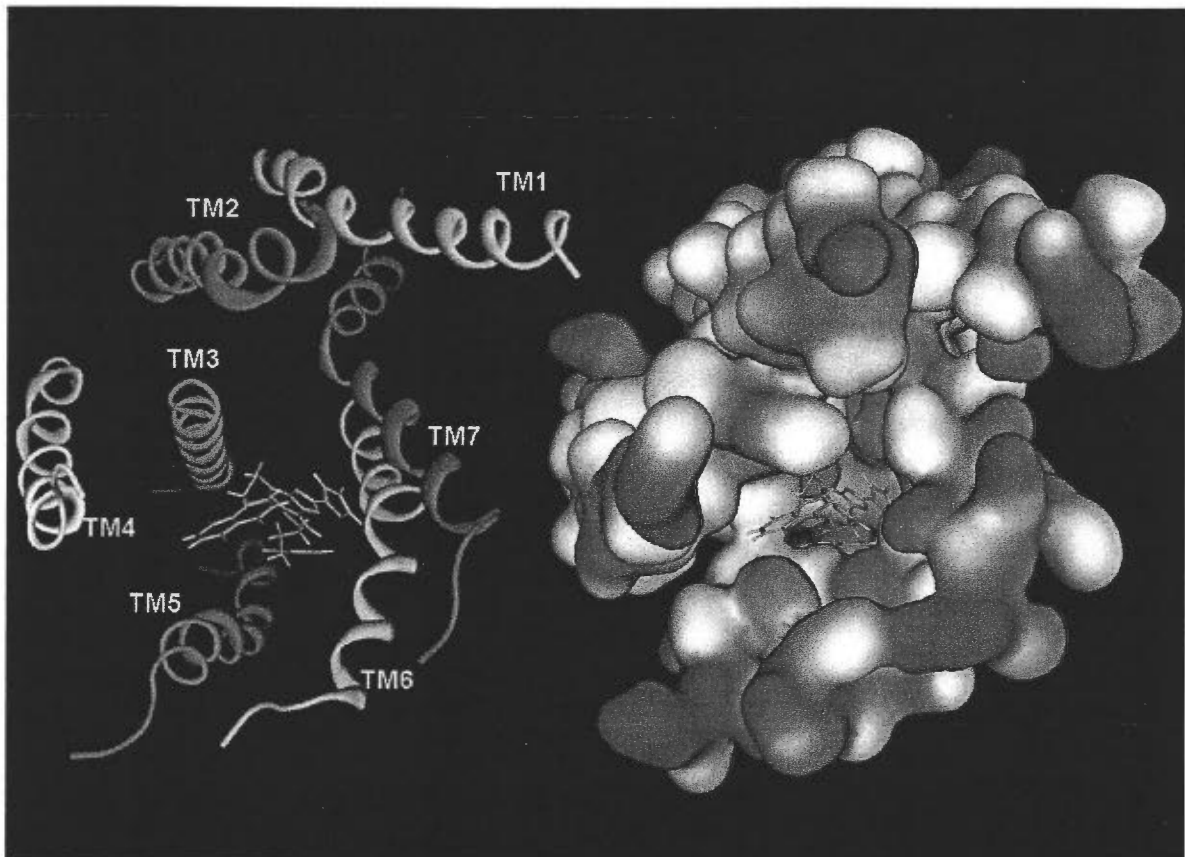


Figura 45. Cavità più profonda del recettore A_{2B} . Visione dall'alto (sinistra) e superfici molecolari (destra).

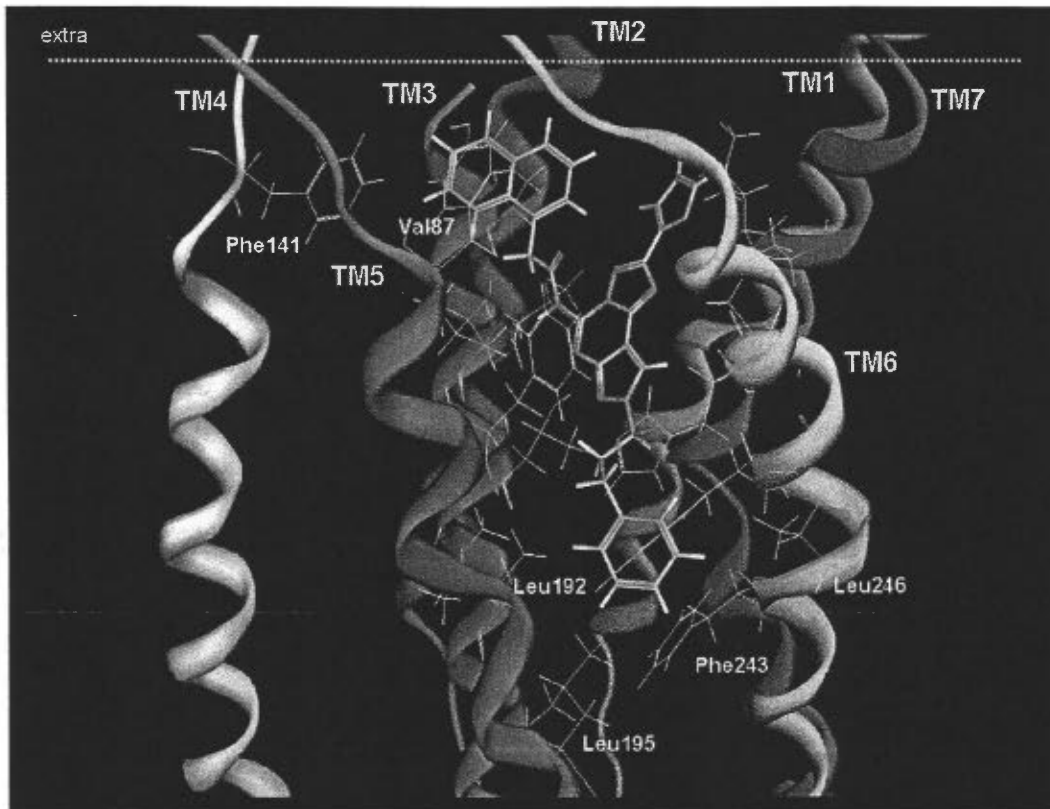


Figura 46. Regione transmembrana ottenuta dal docking del complesso 268-recettore A_{2B}

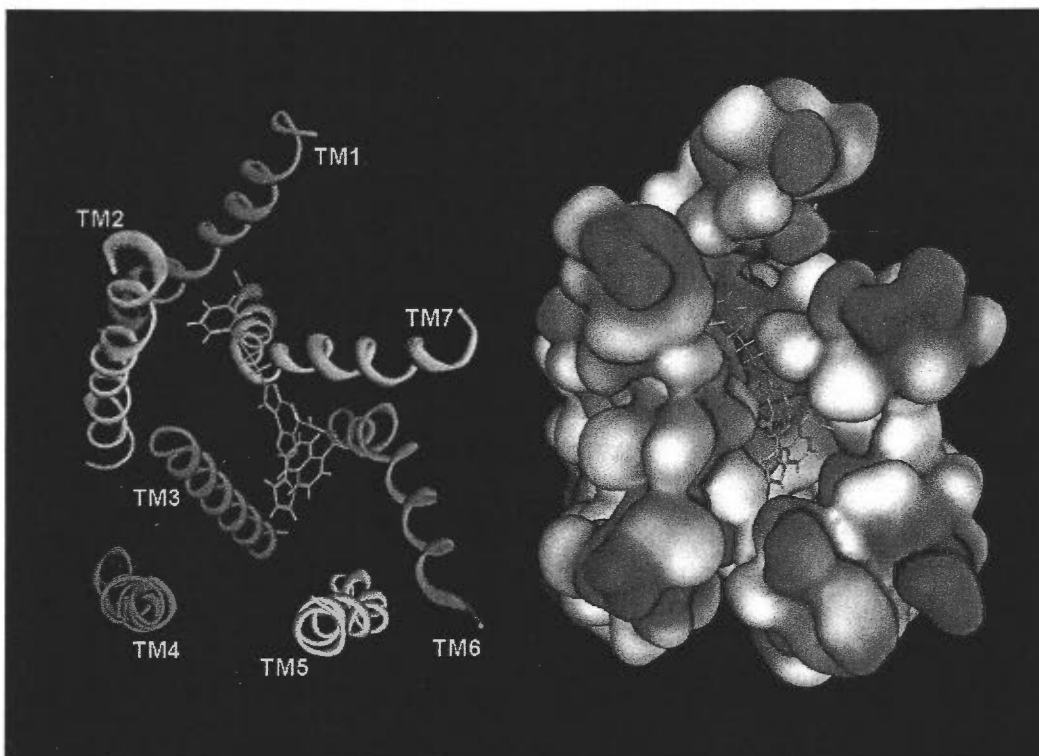


Figura 47. Cavità meno profonda del recettore A_3 . Visione dall'alto (sinistra) e superfici molecolari (destra).

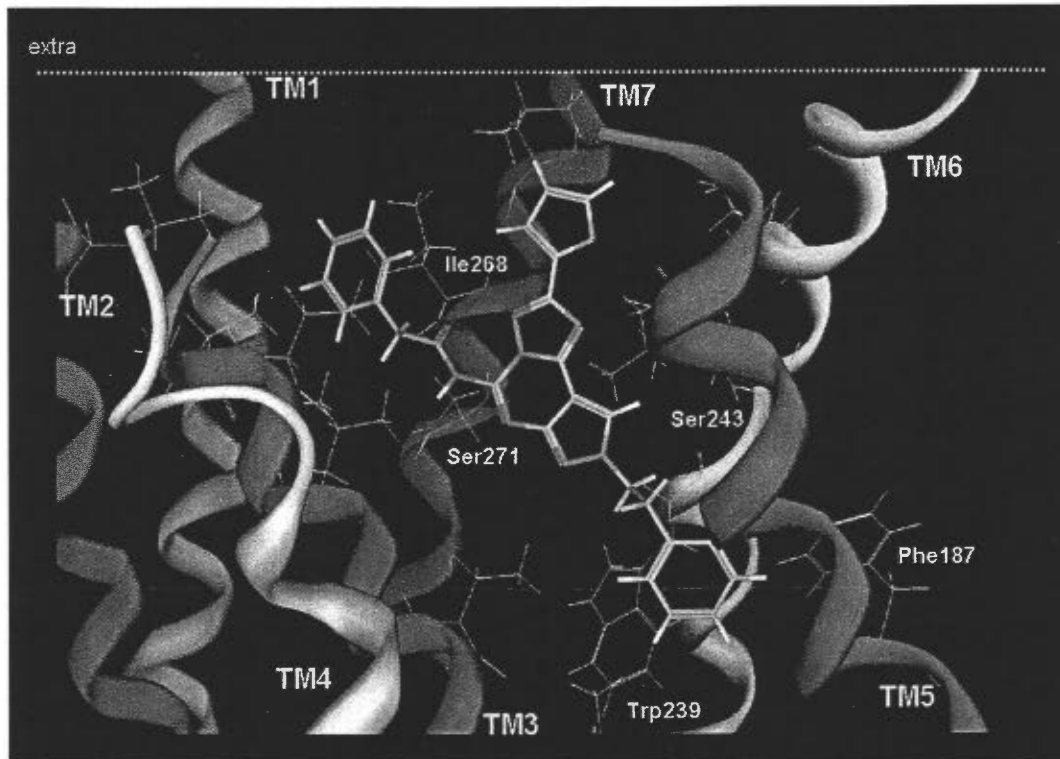


Figura 48. Regione transmembrana ottenuta dal docking del complesso 268-recettore A_3

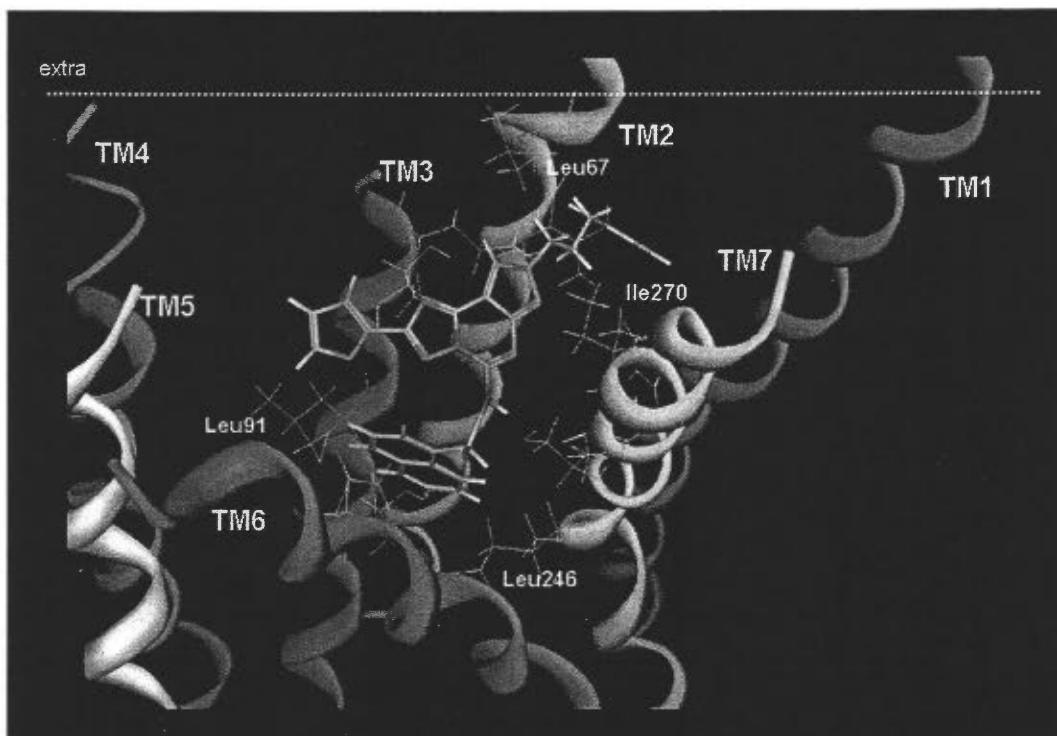


Figura 49. Docking del complesso 264-recettore A_3 . Si osserva una Phe187 al posto di una Leu192, oltre alla porzione idrofila responsabile delle interazioni stabilizzanti con l'NH carbamoilico.

Nel sottotipo hA_{2B} , entrambi i sostituenti sia in N5 che in N8, si trovano in due porzioni lipofile; in particolare, il gruppo 3-fenilpropilico in N8 è circondato da alcuni amminoacidi apolari (**Figura 46**): Ile 93 (TM3), Leu 96 (TM3), Val 191 (TM5), Leu 192 (TM5), Leu 195 (TM5), Phe 243 (TM6), Leu 246 (TM6), e Trp 247 (TM6). Invece, il gruppo α -naftilico in N5 è compreso tra i domini TM 3 e 5, in prossimità di Ala 82 (TM3), Val 87 (TM3), Phe 141 (TM4) e Thy 184 (TM5).

Al contrario, nel recettore hA_3 , il composto **268** non è in grado di raggiungere la porzione idrofila identificata dai residui Ser 243 (TM6) e Ser 271 (TM7) responsabili, come visto precedentemente, delle interazioni stabilizzanti con l'NH dei derivati a catena arilcarbamoilica.

Più precisamente, il gruppo 3-fenilpropilico in N8 si trova tra i domini TM 2 e 7, circondato da due amminoacidi apolari: Leu 67 (TM2) e Ile 270 (TM7), mentre l' α -naftilacetico in N5 è in prossimità di Leu 91 (TM3) e Leu 246 (TM6) (**Figura 48**).

In tutti gli altri sottotipi recettoriali è presente una istidina al posto della Ser 243 (TM6), che può essere, perciò, responsabile della peculiare selettività del recettore hA_3 verso i derivati a catena arilcarbamoilica.

Infine è stato calcolato che la formazione del complesso **268**-recettore hA_3 richiede un'energia superiore di 55 Kcal mol^{-1} rispetto a quello **268**-recettore hA_{2B} , che è comunque in grado di accogliere anche composti di dimensioni minori, grazie al fatto che il nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico è localizzato al centro della tasca e stabilizzato da un legame idrogeno con l'Asn 254 (TM6); un'analoga interazione sembra instaurarsi con il residuo Leu 86. Infatti, il composto **264**, con catena fenilacetica in N5 ed un gruppo feniletilico in N8, mostra potenza analoga sia verso il recettore umano A_{2B} che A_3 ($hA_{2B} \text{ Ki} = 35 \text{ nM}$; $hA_3 \text{ Ki} = 45 \text{ nM}$), in accordo con i dati recentemente pubblicati e riguardanti composti con la catena ureidica in N5. Infatti si è osservato che intervengono alcune interazioni stabilizzanti: legame idrogeno tra l'NH in N5 e il gruppo idrossilico di Ser 243; interazioni idrofobiche della catena

fenilacetica in N5 e le catene laterali di Met 86 (TM3), Leu 90 (TM3) e Ile 268 (TM7); infine, interazione idrofobica tra il gruppo 2-fenilettilico in N8 e Phe 187 (TM5) e Trp 239 (TM6) (**Figura 49**).

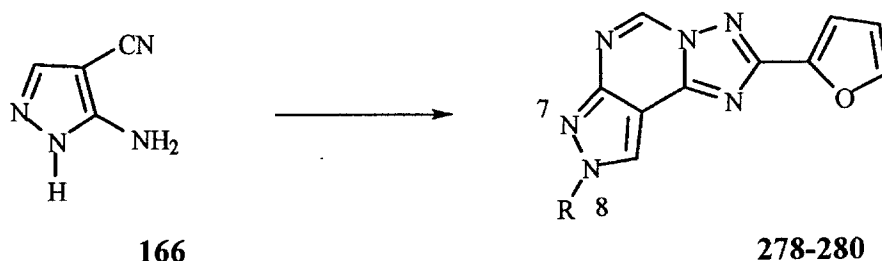
6.4. CONCLUSIONI

Le informazioni riportate hanno permesso di ottenere non solo il primo derivato a struttura non-xantinica dotato di buona affinità e selettività nei confronti del recettore umano A_{2B} (composto **268**, hA_1 $K_i = 1,100$ nM; hA_{2A} $K_i = 800$ nM; hA_{2B} $K_i = 20$ nM; hA_3 $K_i = 300$ nM, $hA_1/A_{2B} = 55$, $h_{2A}/A_{2B} = 40$, $hA_3/hA_{2B} = 15$) ma hanno anche posto le basi per la sintesi di nuovi derivati più potenti e selettivi. Tramite studi di docking recettoriale è stato possibile evidenziare una significativa differenza fra i sottotipi recettoriali A_{2B} e A_3 . Infatti, mentre il recettore A_{2B} presenta una profonda tasca nel sito di binding, nel modello A_3 tale cavità ha dimensioni assai più ridotte. Questa forte discriminazione dal punto di vista strutturale fra i due sottotipi recettoriali giustifica il fatto che sostituenti ingombranti sia in N5 che in N8 sono favorevoli per l'interazione con il sottotipo recettoriale A_{2B} .

6. 5. PARTE SPERIMENTALE

6. 5. 1. CHIMICA

Procedura generale per la preparazione delle 8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (278-280)



Viene riportata la procedura, che è già stata ampiamente trattata nei capitoli precedenti, per la sintesi delle pirazolo-triazolo-pirimidine.

Una soluzione di **166** (5-ammino-4-cianopirazolo) (1.08 gr, 10 mmoli) in 40 ml di DMF anidra viene raffreddata a 0 °C e trattata con NaH (60% in olio, 12 mmoli) in varie porzioni in 10 minuti. Dopo 45 minuti, viene aggiunto l'appropriato (ar)alchil alogenuro (**247**, **272**, **273**)(12 mmoli) e la miscela di reazione viene lasciata a 25 °C e agitata per 3-5 h (TLC: AcOEt-etero di petrolio 1:1). Terminata la reazione si addiziona H₂O (80 ml), e si estrae con AcOEt (5 x 25 ml). Le fasi organiche sono riunite, anidrificate (Na₂SO₄) filtrate e concentrate a pressione ridotta, a fornire il pirazolo alchilato (**250**, **274**, **275**) come una miscela inseparabile di isomeri N1 e N2 (rapporto circa 1:4). Tale miscela (**250**, **274**, **275**) viene successivamente trattata con trietilortoformiato (60 ml) e la soluzione viene portata a riflusso sotto argon per 8 h. Poi il solvente viene rimosso sotto vuoto e il residuo oleoso, costituito dalla miscela di immidati (**253**, **276**, **277**), viene sciolto in 2-metossietanolo (50 ml) e addizionato di idrazide dell'acido 2-furoico (13 mmoli). La miscela viene portata a riflusso per 5-10 h e, dopo raffreddamento, il solvente viene rimosso a pressione ridotta. Il residuo viene quindi sciolto in difenilettere (50 ml) e la soluzione ottenuta viene scaldata a 260°C

(utilizzando un Dean-Stark per l'eliminazione azeotropica dell'acqua prodotta durante la reazione). Dopo 1.5 h la miscela viene versata in esano raffreddato a 0 °C (300 ml). Il precipitato viene filtrato e purificato tramite flash cromatografia (AcOEt/ esano 1:1), in modo da separare il derivato N8 sostituito (278-280) dal corrispondente regioisomero N7.

8-(3-Metil-1-butil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (278)

resa 54%; solido giallo pallido; p.f. 235-237 °C (AcOEt-etere di petrolio); IR (KBr): 1635, 1510, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 1.0 (d, 6H, $J=6.2$); 1.5-1.9 (m, 3H); 4.6 (t, 2H, $J=7.4$); 6.6 (m, 1H); 7.3 (m, 1H); 7.7 (m, 1H); 8.8 (s, 1H); 9.1 (s, 1H)

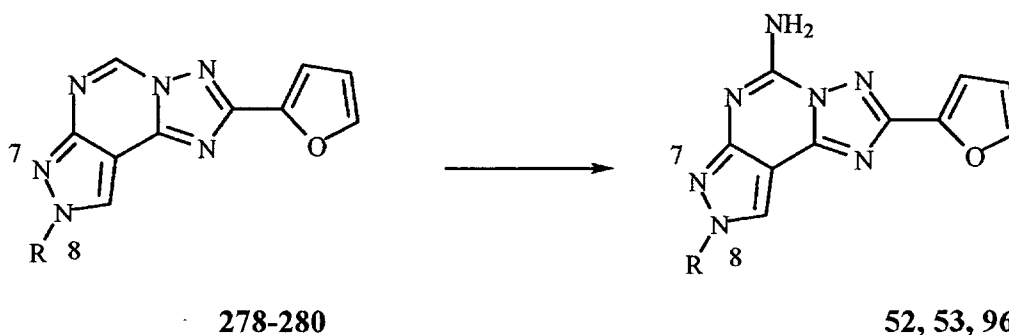
8-(2-fenilettil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo [1,5-c]pirimidina (279)

resa 56%, solido giallo; p.f. 268-270 °C; (AcOEt -etere di petrolio); IR (KBr): 1660, 1510, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.32 (t, 2H, $J=6.7$); 4.72 (t, 2H, $J=6.7$); 6.73 (s, 1H); 7.23 (m, 6H); 7.95 (s, 1H); 8.8 (s, 1H); 9.41 (s, 1H).

8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo [1,5-c]pirimidina (280)

resa 63 %; solido giallo; p.f. 165-166 °C (AcOEt -etere di petrolio); IR (KBr): 1630, 1500, 1440 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 2.34-2.48 (m, 2H); 2.67 (t, 2H, $J = 7.5$); 4.43 (t, 2H, $J=7.5$); 6.61 (m, 1H); 7.16-7.32 (m, 6H); 7.64 (d, 1H, $J = 2$); 8.29 (s, 1H); 9.02 (s, 1H).

Procedura generale per la preparazione di 5-Ammino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (52, 53, 96)



Una soluzione della triazolo pirimidina (**278-280**) (10 mmoli) in HCl acquoso al 10% (50 ml) e diossano (10 ml), viene portata a riflusso per 3 h. Quindi la soluzione è raffreddata e neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO_3 a 0°C . Gli aminotriazoli ottenuti (**256**, **281**, **282**) vengono estratti con AcOEt (3 x 20 ml), le fasi organiche vengono riunite, anidificate con Na_2SO_4 ed evaporate sotto vuoto. L'ammina così ottenuta (**256**, **281**, **282**) viene disciolta in 1-metil-2-pirrolidone (40 ml), e alla soluzione vengono aggiunti cianammide (60 mmoli) e acido p-toluen solfonico (15 mmoli). La miscela ottenuta viene quindi riscaldata a 160°C per 6 h. Dopo 6 h viene aggiunta altra porzione di cianammide (60 mmoli) e si scalda per tutta la notte. La soluzione viene poi diluita con AcOEt (80 ml) e il precipitato (eccesso di cianammide) viene allontanato per filtrazione; la fase organica viene concentrata e lavata con acqua (3 x 30 ml) per allontanare l'eccesso di 1-metil-2-pirrolidone. La fase organica viene anidrificata (Na_2SO_4) e concentrata sotto vuoto. Il residuo viene quindi purificato mediante cromatografia (AcOEt/etere di petrolio 2:1) per dare il prodotto desiderato (**52**, **53**, **96**).

5-Ammino-8-(2-fenilettil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (53)

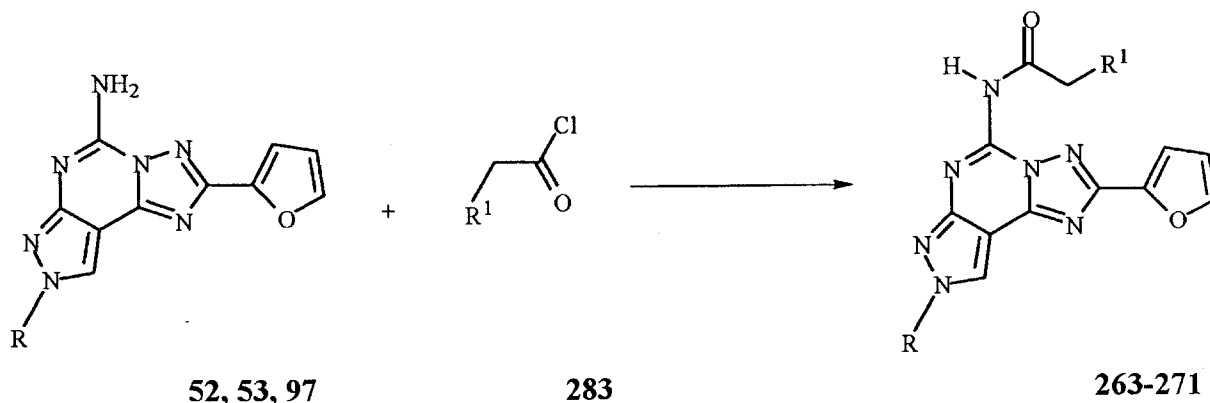
resa 45%; solido bianco; p.f. $186-187^\circ\text{C}$; IR (KBr): 3500-2900, 1670, 1645, 1620, 1530, 1455 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 3.21 (t, 2H, $J = 6.4$); 4.53 (t, 2H, $J = 6.4$); 6.7 (s, 1H); 7.1-

7.4 (m, 6H); 7.65 (bs, 2H); 7.93 (s, 1H); 8.45 (s, 1H).

5-Ammino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidina (96)

resa 57%; solido giallo; p.f. 174-175 °C; IR (KBr): 3510-2950, 1665, 1640, 1615, 1520, 1455 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO d_6) δ : 2.14-2.21 (m, 2H); 2.54 (t, 2H, $J = 7$); 4.29 (t, 2H, $J = 6.4$); 6.72 (s, 1H); 7.14-7.32 (m, 6H); 7.64 (bs, 2H); 7.93 (s, 1H); 8.64 (s, 1H).

Procedura generale per la preparazione di 5-[(Aralchil)carbonil]ammino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidine (263-271)



L'ammino composto (**52, 53, 96**) (10 mmol) viene sciolto in diossano anidro (15 ml) e viene addizionato dell'opportuno acil cloruro (**283-285**)(13 mmol) e trietilammina (13 mmol). La miscela viene quindi posta a riflusso sotto atmosfera di argon per 12 ore. Al termine della reazione il solvente viene rimosso a pressione ridotta e il residuo viene sciolto in AcOEt (30 ml) e lavato due volte con acqua (15 ml). La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata. Il residuo viene quindi purificato mediante flash chromatografia (AcOEt-etero di petrolio 4:6) per fornire il prodotto desiderato (**263-271**).

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-isopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (263)

resa 85%, solido giallo chiaro; p.f. 144-145 °C (AcOEt -etero di petrolio); IR (KBr): 3255-2930, 1673, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.98 (d, 6H, J = 7.5); 1.60 (m, 1H); 1.91 (m, 2H); 4.40 (t, 2H, J = 7); 4.53 (s, 2H); 6.60 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.18 (d, 1H, J = 4); 7.26-7.39 (m, 5H); 7.64 (d, 1H, J = 2); 8.22 (s, 1H); 9.11 (bs, 1H).

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-(2-fenilettil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (264)

resa 80%, solido bianco; p.f. 147 °C (AcOEt -etero di petrolio); IR (KBr): 3240-2920, 1673,

1614, 1600, 1505 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.21 (t, 2H, $J = 7$); 3.98 (s, 2H); 4.61 (t, 2H, $J = 7$); 6.65 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.05-7.45 (m, 11H); 7.98 (d, 1H, $J = 4$); 8.67 (s, 1H); 11.12 (bs, 1H).

5-[(Benzil)carbonil]ammino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (265)

resa 85%, solido giallo chiaro; p.f. 116-117 °C (AcOEt -etere di petrolio); IR (KBr): 3250-2900, 1675, 1625, 1600, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.39 (m, 2H); 2.67 (t, 2H, $J = 7$); 4.37 (t, 2H, $J = 7$); 4.53 (s, 2H); 6.61 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.16-7.43 (m, 11H); 7.65 (d, 1H, $J = 4$); 8.19 (s, 1H); 9.12 (bs, 1H).

5-[(α -Naftilmetil)carbonil]ammino-8-isopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (266)

resa 80%, solido giallo chiaro; p.f. 95-96 °C (AcOEt -etere di petrolio); IR (KBr): 3240-2950, 1680, 1625, 1595, 1510 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.97 (d, 6H, $J = 7.5$); 1.47-1.50 (m, 1H); 1.83-1.95 (m, 2H); 4.40 (t, 2H, $J = 7$); 4.59 (s, 2H); 6.67 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.19 (d, 1H, $J = 4$); 7.21-7.59 (m, 4H); 7.79-8.15 (m, 4H); 8.81 (s, 1H); 11.03 (bs, 1H).

5-[(α -Naftilmetil)carbonil]ammino-8-(2-feniletile)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (267)

resa 74%, solido bianco; p.f. 107 °C (AcOEt -etere di petrolio); IR (KBr): 3250-2970, 1678, 1620, 1595, 1500 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.12 (t, 2H, $J = 7$); 4.41 (s, 2H); 4.61 (t, 2H, $J = 7$); 6.64 (dd, 1H, $J = 2, J = 4$); 7.03-7.15 (m, 5H); 7.25-7.39 (m, 4H); 7.81-8.00 (m, 4H); 8.03 (d, 1H, $J = 4$); 8.82 (s, 1H); 11.03 (bs, 1H).

5-[(α -Naftilmetil)carbonil]ammino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (268)

resa 82%, solido giallo chiaro; p.f. 109 °C (AcOEt-etere di petrolio); IR (KBr): 3240-2980, 1676, 1610, 1585, 1510 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.15 (t, 2H, $J = 7$); 2.65-2.78 (m, 2H); 4.38

(t, 2H, J = 7); 4.44 (s, 2H); 6.67 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 7.03-7.18 (m, 5H); 7.32-7.59 (m, 4H); 7.65-8.11 (m, 5H); 8.92 (s, 1H); 11.10 (bs, 1H).

5-[(Fenossimetil)carbonil]ammino-8-isopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (269)

resa 80%, solido bianco; p.f. 175 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 3235-2960, 1675, 1620, 1595, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.98 (d, 6H, J = 7.5); 1.39-1.45 (m, 1H); 1.88-1.97 (m, 2H); 4.41 (t, 2H, J = 7); 5.04 (s, 2H); 6.75 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 6.95-7.08 (m, 3H); 7.19-7.40 (m, 3H); 7.96 (d, 1H, J = 2); 8.88 (s, 1H); 10.98 (bs, 1H).

5-[(Fenossimetil)carbonil]ammino-8-(2-fenilettil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (270)

resa 68%, solido bruno; p.f. 107 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 3245-2980, 1670, 1615, 1590, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 3.46 (t, 2H, J = 7); 4.52 (t, 2H, J = 7); 5.05 (s, 2H); 6.72 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 6.81-7.47 (m, 11H); 7.95 (d, 1H, J = 2); 8.88 (s, 1H); 10.96 (bs, 1H).

5-[(Fenossimetil)carbonil]ammino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (271)

resa 72%, solido bruno; p.f. 85 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 3230-2985, 1681, 1615, 1590, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.19 (t, 2H, J = 7); 2.61-2.73 (m, 2H); 4.27 (t, 2H, J = 7); 5.04 (s, 2H); 6.61 (dd, 1H, J = 2, J = 4); 6.81-7.43 (m, 11H); 7.65 (d, 1H, J = 4); 8.23 (s, 1H); 10.02 (bs, 1H).

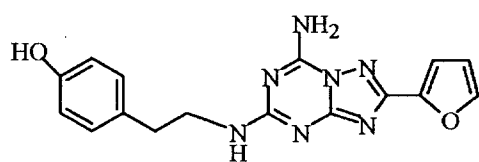
7. TRIAZOLO TRIAZINE

7. 1. INTRODUZIONE

Recentemente, il gruppo di ricerca Zeneca ha progettato il composto denominato **ZM241385** (**33**, 7-ammino-2-(2-furil)-5-[2-(4-idrossifenil)etil]ammino[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina) che si è dimostrato uno dei più potenti antagonisti del recettore adenosinico A_{2A} con buona solubilità in acqua.

Si è osservato che questo composto lega con buona affinità anche il recettore adenosinico hA_{2B} . La sua forma triaziata è attualmente utilizzata come radioligando per lo studio di questo sottotipo recettoriale.⁹⁵

Modificando la struttura dello ZM241385 si è visto che, omettendo l'ossidrile in posizione 5, si ha un aumento di affinità verso gli A_{2B} come nel composto **54**; analoghi effetti sono riscontrabili con l'inserzione del sostituente 5-benzilamminico (**286**) e del 5-(2-fenil)idrazinico (**287**), ma la selettività verso gli altri recettori (in particolare gli A_{2A}) risulta modesta (**Figura 50**).



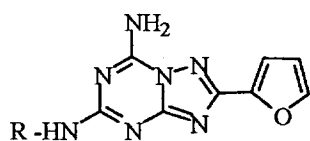
ZM241385, 33

$rA_1 = 2,040$ nM

$rA_{2A} = 0.3$ nM

$gA_{2B} = 87$ nM

$rA_3 \Rightarrow 10,000$ nM



54; R = - (CH₂)₂ - Ph

$hA_{2B} = 9.9$ nM

286; R = - CH₂ - Ph

$hA_{2B} = 7.6$ nM

287; R = - NH - Ph

$hA_{2B} = 7.6$ nM

Figura 50. Triazolo-triazine

Sembra quindi che la posizione 5 (ed eventualmente la 7) dello ZM241385, sia il sito di preferenza per incrementare l'affinità recettoriale per gli A_{2B} (**Figura 51**).

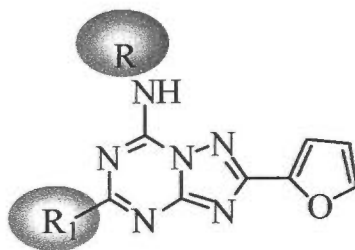


Figura 51. Posizioni modificabili dello ZM

In particolare si è pensato di utilizzare sostituenti in posizione 7 che, inseriti in altre classi di composti, hanno dimostrato essere ottimali per l'interazione con i recettori hA₃ (ureidici –NHCONHPh) e con gli A_{2B} (fenilacetici –NHCOCH₂Ph).

Inoltre sono stati inseriti in posizione 5 sostituenti come: –OPh, –SCH₃, –N(CH₃)₂ che possiedono caratteristiche lipofile e steriche differenti. Su questa base, è stata ottenuta una nuova serie di derivati 7-ammino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazinici sostituiti in posizione 5, con lo scopo di determinare l'antagonismo nei confronti dei recettori adenosinici, valutando l'inibizione dell'Adenilato ciclasi, indotta dai vari composti (**Tabella 20**).

Tabella 20. Composti sintetizzati a struttura triazolo-triazinica (**288-308**).

Composto	R	R ¹	PM
288	COCHPh ₂	SCH ₃	430
289	COCH ₂ Ph	SCH ₃	354.38
290	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	SCH ₃	346.40
291	COCH ₂ Ph	OPh	412.4
292	COCH ₂ Ph	N(CH ₃) ₂	363.38
293	COCH ₂ 4-OCH ₃ Ph	N(CH ₃) ₂	393.41
294	COCH ₂ 4-OCH ₃ Ph	OPh	442.44
295	COCHPh ₂	OPh	476.50
296	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	OPh	392.42

Tabella 20. Composti sintetizzati a struttura triazolo-triazinica (288-308) (continua)

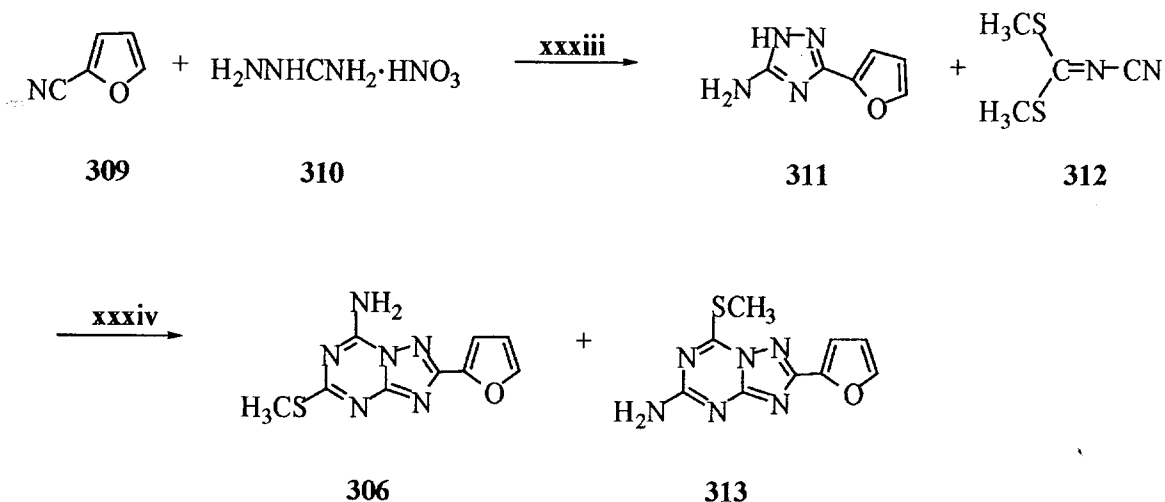
Composto	R	R ¹	PM
297	COCHPh ₂	N(CH ₃) ₂	449.56
298	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	N(CH ₃) ₂	343.39
299	CONHPh	SCH ₃	367.4
300	CONHPh-4CH ₃	SCH ₃	381.41
301	CONHPh	N(CH ₃) ₂	364.4
302	CONHPh-4CH ₃	N(CH ₃) ₂	378.4
303	CONHPh	OPh	413.4
304	CONHPh-4CH ₃	OPh	427.4
305	COCH ₂ Ph-4OCH ₃	SCH ₃	396.4
306	H	SCH ₃	248.26
307	H	OPh	294.27
308	H	N(CH ₃) ₂	245.25

7. 2. CHIMICA

I prodotti progettati (288-308), sono stati sintetizzati seguendo le procedure note in letteratura, per la preparazione del nucleo [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazinico, come rappresentato negli **Schemi 11-13**.

Partendo dal 2-furonitrile (309), in presenza di acido cloridrico gassoso e amminoguanidina nitrato (310), si ha la formazione del 5-ammino-3-(2-furil)-1,2,4-triazolo (311) (**Schema 11**).

Schema 11



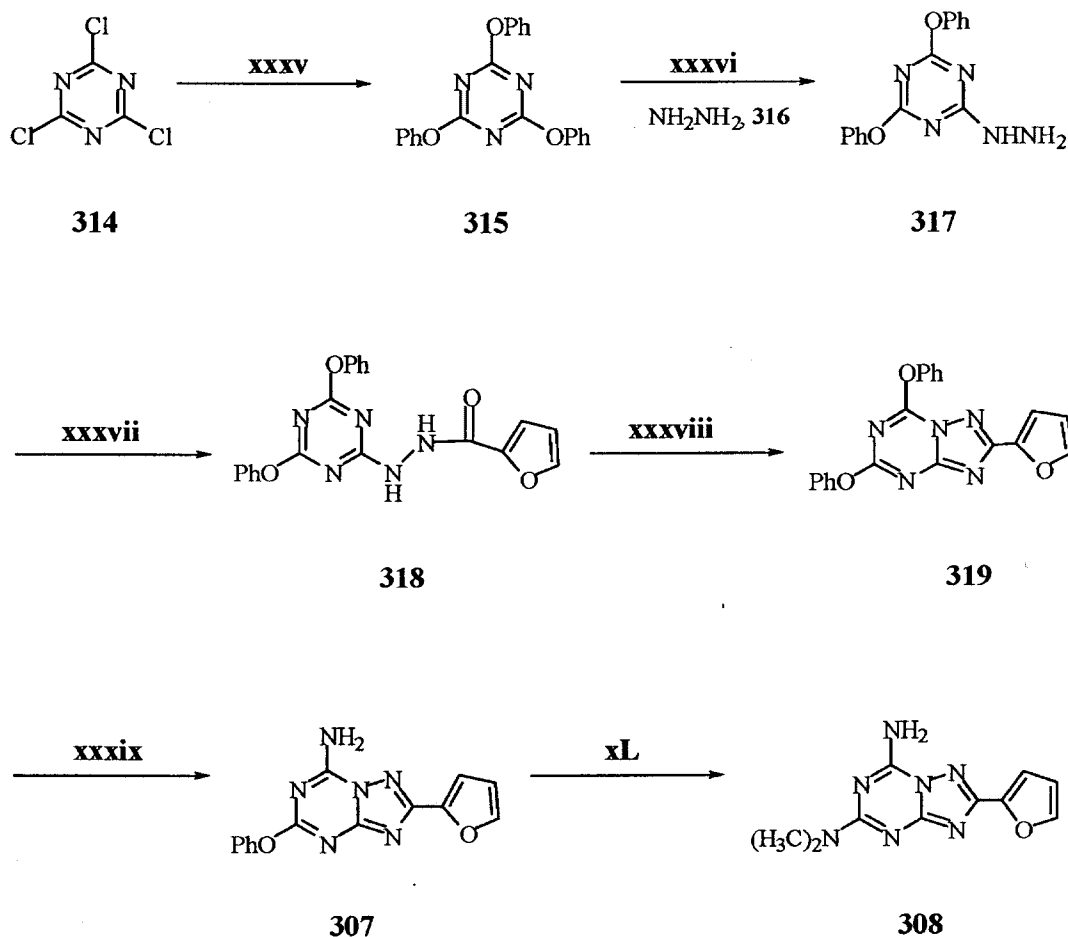
Reagenti: xxxiii) HCl; xxxiv) 180°C, Argon.

Per successivo riscaldamento a 180°C in atmosfera di argon per 1 ora con dimetil N-cianoditio(immino)carbonato (312), si ottengono i regioisomeri (306, 313), che vengono poi separati mediante flash-cromatografia (Etere di Petrolio : AcOEt = 8 : 2).

I derivati 5-OPh (307) e 5-N(CH₃)₂ (308) sono stati sintetizzati partendo dalla 2,4,6-tricloro triazina (314) che, in presenza di un eccesso di fenolo (3eq) a 220°C per circa 5h, dà la 2,4,6-trifenossitriazina (315) come solido bianco.

Per la successiva aggiunta di idrazina (**316**) in CH_2Cl_2 , si ottiene la 2-idrazino-4,6-difenossi-1,3,5-triazina (**317**) che, trattata con il 2-furoilcloruro forma la corrispondente idrazide (**318**). Il riarrangiamento dell'idrazide (**318**) avviene in condizioni anidre, in presenza di P_2O_5 e xilene a refluxo, e porta all'intermedio 2-sostituito 5,7-difenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (**319**) (Schema 12).

Schema 12



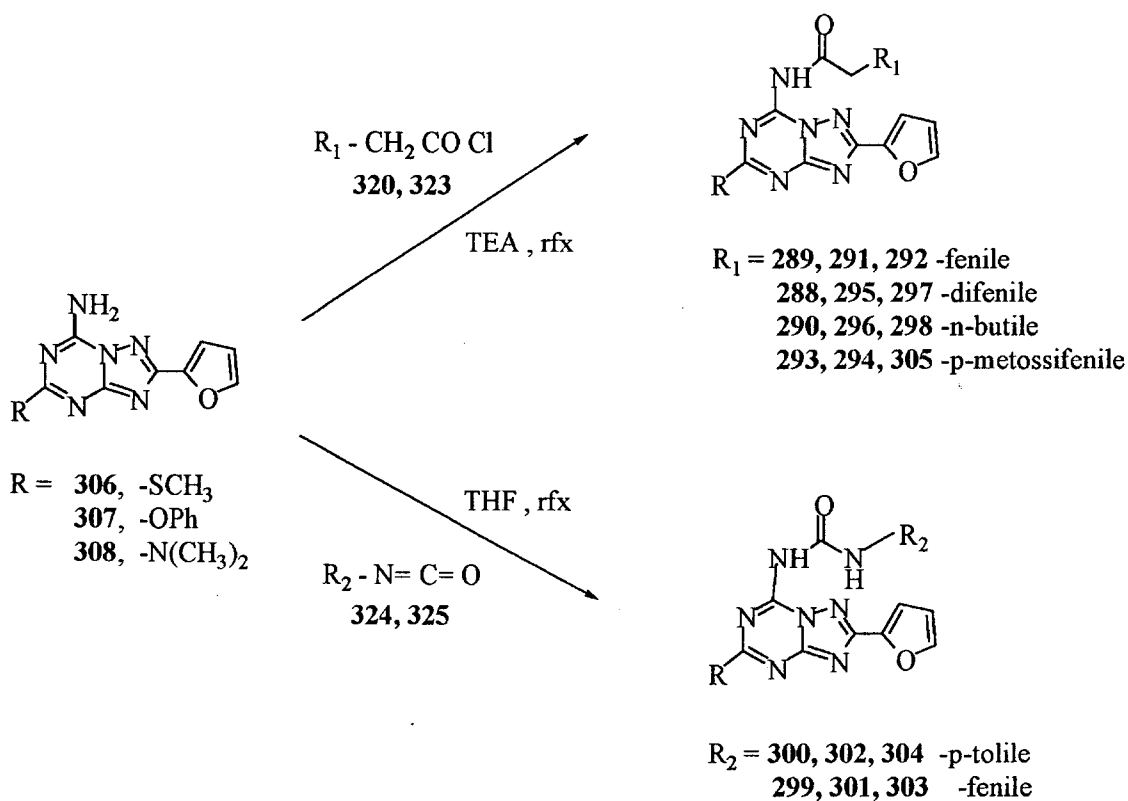
Reagenti: xxxv) Fenolo, 220°C per 5h; xxxvi) CH_2Cl_2 ; xxxvii) 2-furoilcloruro; xxxviii) P_2O_5 in xilene, rfx; xxxix) EtOH/ NH_3 , rfx; xL) Soluzione etanolica, tubo chiuso, 120°C.

Successivamente, per riscaldamento a refluxo con EtOH/NH₃ si ottiene il derivato 7-ammino sostituito (**307**). Ponendo ora il 7-ammino[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (**307**) a reagire con dimetilammina in soluzione etanolica, in tubo chiuso a 120°C, si arriva alla 7-dimetilammino[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (**308**).

I prodotti finali (**288-298, 305**) si ottengono mediante coupling fra le triazolo triazine (**306-308**) e l'appropriato acilcloruro (**320-323**), in presenza di TEA a refluxo per 12h.

Le corrispondenti uree (**299-304**) sono state ottenute per reazione con l'opportuno isocianato (**324, 325**) in THF a refluxo per 18 ore (Schema 13).

Schema 13



7. 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

In **Tabella 21** sono riportate le affinità dei composti sintetizzati nei confronti dei recettori adenosinici di ratto A₁ e A_{2A}.

Tabella 21. Affinità di "binding" verso i recettori rA₁ e rA_{2A} dei composti sintetizzati (288-308).

Composto	R	R ¹	rA ₁ (nM) ^a	rA _{2A} (nM) ^b
288	COCHPh ₂	SCH ₃	557±205	>10,000
289	COCH ₂ Ph	SCH ₃	1,420±260	429±38
290	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	SCH ₃	1,520±170	427±96
291	COCH ₂ Ph	OPh	7,260±2,820	136±48
292	COCH ₂ Ph	N(CH ₃) ₂	6,080±1,040	6,700±3,200
293	COCH ₂ -4-OCH ₃ Ph	N(CH ₃) ₂	8,740±590	10,300±1,300
294	COCH ₂ -4-OCH ₃ Ph	OPh	12±2% displ	892±252
295	COCHPh ₂	OPh	<10% displ	1,880±310
296	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	OPh	2,900±710	189±26
297	COCHPh ₂	N(CH ₃) ₂	951±88	4,090±1,360
298	CO(CH ₂) ₄ CH ₃	N(CH ₃) ₂	1,570±380	>10,000
299	CONHPh	SCH ₃	10,000±2,900	1,660±1,120
300	CONHPh-4CH ₃	SCH ₃	3,440±690	742±194
301	CONHPh	N(CH ₃) ₂	3,150±550	580±100
302	CONHPh-4CH ₃	N(CH ₃) ₂	2,720±830	2,720±2,090
303	CONHPh	OPh	17±5% displ	38.9±3.5
304	CONHPh-4CH ₃	OPh	35±5% displ	214±72
305	COCH ₂ Ph-4OCH ₃	SCH ₃	5,000±1,170	1,570±660
306	H	SCH ₃	1,730±360	96.5±36.1
307	H	OPh	2,720±680	18.3±3.4
308	H	N(CH ₃) ₂	31,400±8,000	3,800±1,230

^a Spiazzamento del legame specifico del composto [³H](R)-PIA dal recettore di ratto A₁ espresso in cellule CHO, (n=3-6). ^b Spiazzamento del legame specifico del composto [³H]CGS21680 dal recettore di ratto A_{2A} espresso in cellule HEK-293. I dati sono espressi come K_i ± SEM in nM (n=3-6).

Come radioligandi sono stati utilizzati rispettivamente: [³H](R)-PIA per rA₁ e [³H]CGS21680 per rA_{2A}.

Risulta evidente che, indipendentemente dalle sostituzioni, i derivati presentano affinità nel range alto nM verso i recettori rA₁ e rA_{2A} con scarsa selettività.

E' abbastanza chiaro che anche l'introduzione di catene arilcarbamoiliche (ottimali per l'affinità verso il recettore hA₃) o arilacetiche (ottimale per gli A_{2B}) non siano in grado di far diminuire significativamente l'affinità nei confronti del recettore A_{2A}, compromettendo quindi una eventuale selettività. Inoltre non permettono una discriminazione significativa tra A₁ e A_{2A}.

Sembra quindi che, sia modificando il sostituente in posizione 5 che in posizione 7 (limitatamente ai gruppi qui considerati), non sia possibile una discriminazione tra i sottotipi recettoriali considerati (vedi i composti **300**, **302**, **304**). L'unica osservazione ben evidente è che il gruppo amminico libero in 7 permette di avere buona affinità verso A_{2A} e discreta selettività verso A₁ (vedi i composti **306**, **307**).

Al fine di valutare meglio questa serie di derivati, in base anche alle differenze di specie, alcuni composti selezionati sono stati saggiati verso i recettori hA₁, hA_{2A} e hA₃ (**Tabella 22**).

Come si può osservare, i composti risultano essere totalmente inattivi verso gli A₁, mentre mantengono una buona affinità verso gli A_{2A} (range di 22-230 nM).

L'aspetto più interessante riguarda l'interazione con il recettore hA₃. Infatti, l'introduzione di una funzione arilcarbamoilica che, come detto in precedenza, risulta ottimale verso A₃, non produce gli effetti desiderati. Infatti, i derivati **299**, **301**, **303** presentano affinità nel range alto nM (300-600 nM) e quindi sono meno attivi che non verso gli A_{2A}.

Per cercare di spiegare tale fenomeno, abbiamo eseguito una sovrapposizione molecolare tra il derivato **301** e il composto **110**, che è un potente antagonista hA₃ (**Figura 52**).

Come risulta evidente dalla **Figura 53**, il gruppo dimetilamminico in posizione 5, è situato in corrispondenza dell'azoto pirazolico in posizione 7 e non in posizione 8.

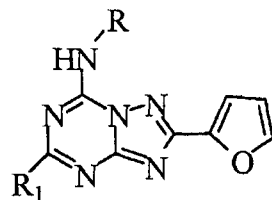


Tabella 22. Affinità di binding (Ki) o % di inibizione verso i recettori hA₁, hA_{2A} e hA₃ dei composti sintetizzati con una concentrazione di agonista pari a 10 μM.

Composto	R	R ¹	hA ₁ (nM) ^a	hA _{2A} (nM) ^b	hA ₃ (nM) ^c
291	COCH ₂ Ph	OPh	51%	22.5±8.5	1,020±173
292	COCH ₂ Ph	N(CH ₃) ₂	46%	98±39	1,050±466
299	CONHPh	SCH ₃	72%	26.7±9.8	414±29
301	CONHPh	N(CH ₃) ₂	58%	39±9.2	311±122
303	CONHPh	OPh	68%	234±84	633±37

^aSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A₁ espresso in cellule CHO, (n=3-6). ^bSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-ZM 241385 dal recettore umano A_{2A} espresso in cellule HEK-293. ^cSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]-DPCPX dal recettore umano A_{2B} espresso in cellule HEK-293, (n=3-6). ^dSpiazzamento del legame specifico del composto [³H]MRE3008-F20 dal recettore umano A₃ espresso in cellule HEK-293. I dati sono espressi come K_i ± SEM in nM (n=3-6)

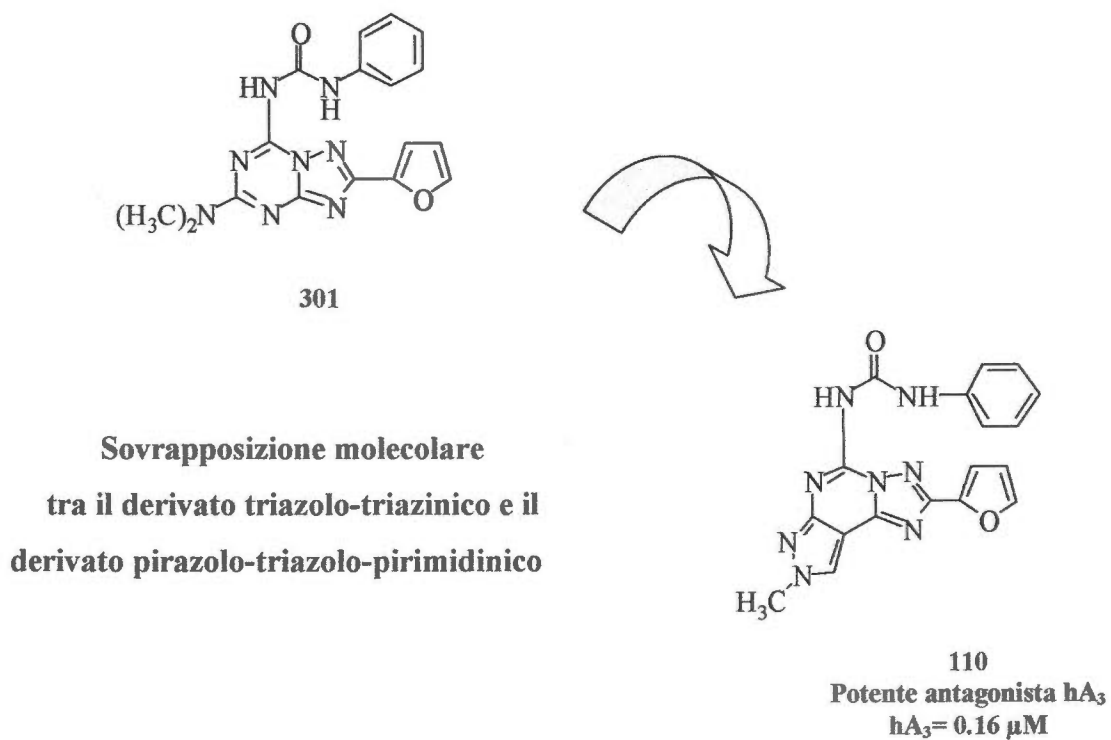


Figura 52. Sovrapposizione molecolare

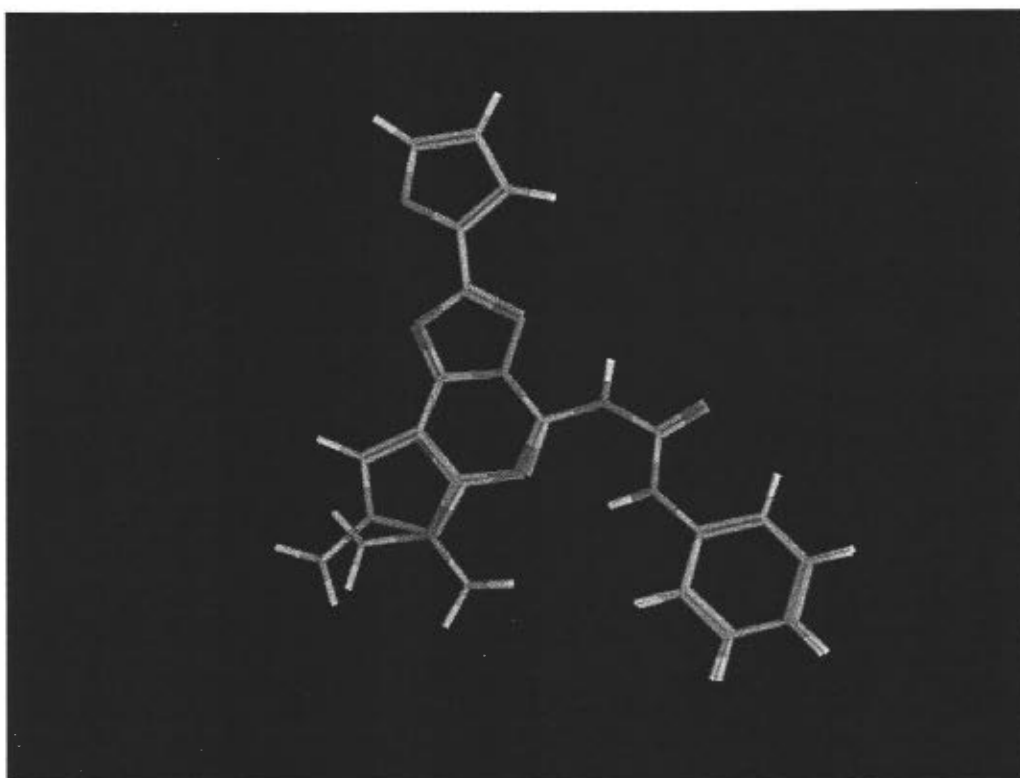


Figura 53. Sovrapposizione molecolare tra il derivato triazolo-triazinico (301) e il derivato pirazolo-triazolo-pirimidinico (110).

Questo potrebbe essere sufficiente a spiegare la scarsa affinità verso gli A₃; infatti è noto che, nella serie pirazolo-triazolo-pirimidinica, i derivati N7 sostituiti risultano totalmente inattivi nei confronti del recettore hA₃.¹⁵⁹

Una valutazione a parte deve essere fatta per l'interazione con il recettore A_{2B}; attualmente, per problemi di brevetto, non è possibile effettuare "binding" sul recettore A_{2B}, quindi il test è stato condotto utilizzando un saggio funzionale in cui si valuta l'inibizione dell'enzima Adenilato ciclasi, in cellule HEK transfettate con il recettore hA_{2B} (**Tabella 23**).

Tabella 23. Saggio funzionale: valutazione dell'inibizione dell'enzima Adenilato ciclasi, in cellule HEK che esprimono il recettore hA_{2B}. I valori sono la media di almeno tre esperimenti.

Composto	EC ₅₀ (μ M)	Composto	EC ₅₀ (μ M)
288	>100	299	26
289	\approx 100	300	22
290	>100	301	\approx 100
291	>100	302	>100
292	>100	303	12
293	>100	304	27
294	>100	305	38
295	>100	306	18
296	\approx 100	307	3.7
297	>100	308	32
298	>100	ZM 241385	0.475

Si tratta di un test meno sensibile di quello in cui viene calcolata la percentuale di inibizione della produzione del metabolita cAMP, perciò va sottolineato che non sarà possibile parlare di

selettività verso gli altri sottotipi recettoriali, in quanto il saggio funzionale e il “binding” presentano sensibilità notevolmente differenti. Comunque questo test permette di avere informazioni preliminari riguardanti i requisiti strutturali ottimali per l’interazione con il recettore A_{2B}.

Come riportato in **Tabella 23**, tutti i derivati che in posizione 7 presentano funzioni fenilacetiche (**288-298, 305**) risultano essere praticamente inattivi nei confronti del recettore A_{2B}. L’unica eccezione è rappresentata dal composto **305**, che presenta blanda attività verso gli A_{2B}, ma in questo caso è possibile ipotizzare un’influenza da parte del sostituente (-SCH₃) in posizione 5, dal momento che gli analoghi, con il gruppo fenossi o dimetilamminico, risultano inefficaci qualunque sia la sostituzione in 7; l’unico composto che presenta blanda attività, è il derivato con il gruppo amminico libero.

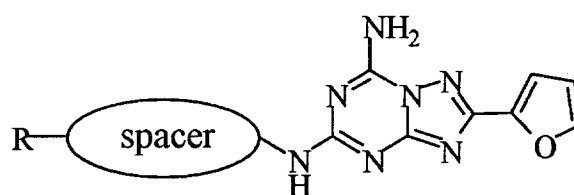
Differente è il discorso sui derivati ureidici. Infatti, eccetto i derivati **301** e **302**, i derivati **299, 300, 303, 304** mostrano una discreta attività nei confronti del recettore A_{2B} nel range μM (12-20 μM).

Sicuramente il dato più incoraggiante riguarda il derivato **307** che presenta un buon valore di EC₅₀ pari a 3.7 μM (lo ZM241385 ha una EC₅₀ pari a 475 nM) suggerendo che, molto probabilmente, per avere potenza verso gli A_{2B}, il gruppo amminico in 7 deve essere non sostituito.

7. 4. CONCLUSIONI

In conclusione, lo studio qui riportato ha permesso di approfondire le conoscenze riguardanti i requisiti strutturali indispensabili per avere affinità e selettività verso i recettori hA_{2B} e hA_3 .

In particolare, per quanto riguarda il recettore hA_{2B} , gli studi futuri saranno mirati verso la sintesi di derivati con il gruppo amminico, in posizione 7, libero, e catene variamente sostituite in posizione 5 (**326**, **Figura 54**).



326

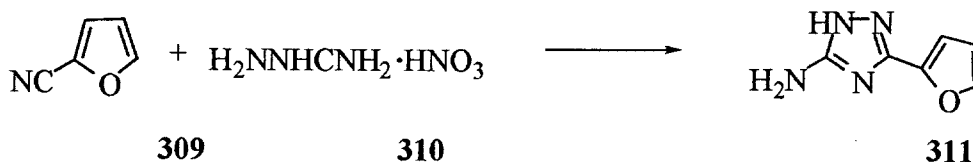
R= -alchile, -arilalchile

Figura 54. Nuovi antagonisti A_{2B} ?

7. 5. PARTE SPERIMENTALE

7. 5. 1. CHIMICA

Procedura per la preparazione del 5-ammino-3-(2-furil)-1,2,4-triazolo (311)

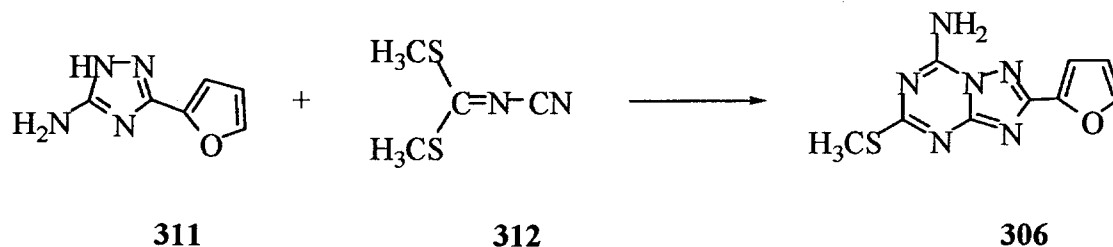


Acido cloridrico gassoso (20 g) viene fatto gorgogliare in una soluzione raffreddata di 2-furonitrile (309, 46.5 g) in EtOH assoluto (30 cm³). Il solido che cristallizza viene filtrato e portato a riflusso per 4 ore con piridina (300 cm³) e amminoguanidina nitrato (310, 56.0 g).

La miscela viene raffreddata, si filtra l'eventuale residuo solido e il filtrato viene portato a secco e addizionato ad acido nitrico (400 cm³); il sale di nitrato viene quindi filtrato e lavato con acqua (100 cm³) ed EtOH (50 cm³). Si ripristina la base libera per aggiunta di sodio carbonato a una sospensione acquosa calda del sale; la soluzione basica viene infine raffreddata per dare il composto sottoforma di prismi.

Resa 70%; p.f. 204-206°C; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 6.1 (bs, 2H); 6.6 (s, 1H); 7.7 (s, 1H); 12.5 (bs, 1H).

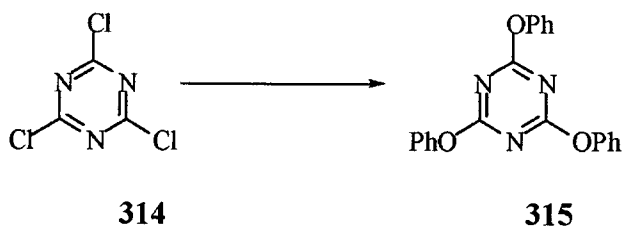
**Procedura per la preparazione del 7-ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]
[1,3,5]triazina (306)**



Una miscela di 5-ammino-3-(2-furil)-[1,2,4]triazolo (**311**, 342 g, 2.28 mol) e dimetil N-cianoditio(immino)carbonato (**312**, 367.6 g, 2.52 mol) viene agitata e riscaldata a 180° per 1 ora in atmosfera di azoto. La miscela viene quindi raffreddata e portata a riflusso in CH₂Cl₂ (4 dm³) e CH₃OH (1.5 dm³) per 5 ore. La sospensione viene quindi filtrata su uno strato di celite e al filtrato ottenuto si aggiunge gel di silice.

Allontanato il solvente, il solido viene purificato mediante cromatografia.

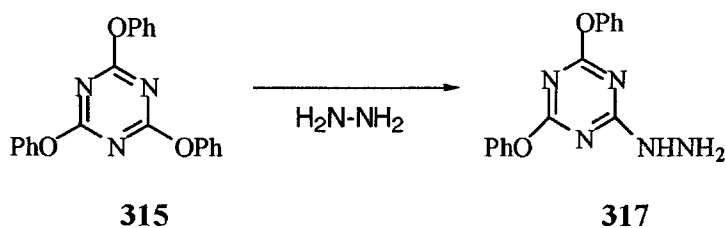
Resa 60%; solido marrone; p.f. 238-240°C (EtOAc-etero di petrolio); IR (KBr): 3330, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 2.5 (s, 3H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.2 (d, 1H, J=4); 7.7 (d, 1H, J=2); 8.8 (bd, 2H).

Procedura per la preparazione del 2,4,6-trifenossi-1,3,5-triazina (315)

Una miscela di 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, **314** (184.4 g, 1.0 mol) in eccesso di fenolo (3.0-4.0 mol) viene riscaldata per 5h a 200°C a riflusso. Si estrae successivamente con metanolo a caldo e si ottiene così un solido bianco.

Resa quantitativa; p.f. 234-336°C (EtOAc-etero di petrolio); ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 7.8 (s, 15H).

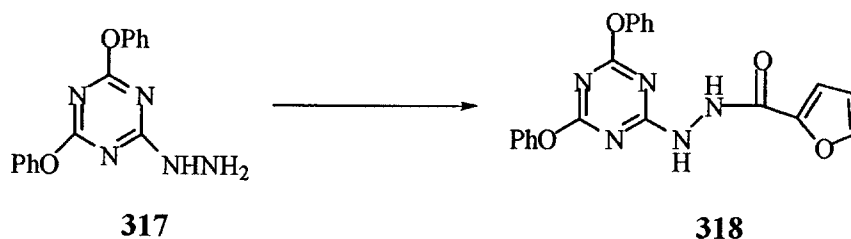
Procedura per la preparazione del 2-idrazino-4,6-difenossi-1,3,5-triazina (317)



Ad una soluzione di 2,4,6-trifenossi-1,3,5-triazina **315** (36 g, 0.1 mol) in CH_2Cl_2 (500 cm^3) viene aggiunta idrazina idrata **316** (5 cm^3 , 0.1 mol) e si lascia agitare per tutta la notte. Si evapora il solvente e il residuo viene trattato con propan-2-olo (300 cm^3) e agitato per 14 ore; si filtra il prodotto così ottenuto.

Resa 84%; p. f $106-108^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO } d_6$) δ : 4.3 (bs, 2H); 7.1-7.3 (m, 6H); 7.3-7.5 (m, 4H); 9.2 (bs, 1H).

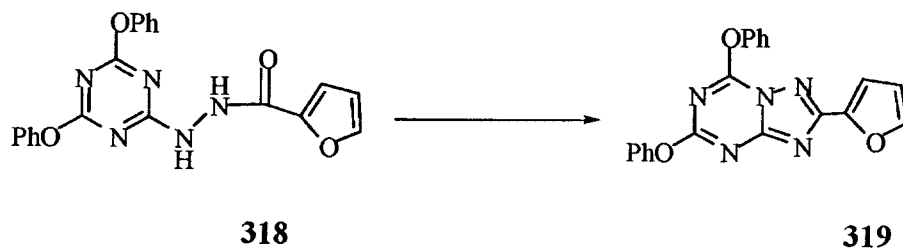
Procedura per la preparazione del N²-(4,6-difenossi-1,3,5-triazin-2-il)2-furoidrazide (318)



All'idrazina sintetizzata (**317**, 15 g, 0.05 mol) sciolta e raffreddata in CH₂Cl₂ (200 cm³) contenente TEA (7.0 cm³, 0.05 mol), viene addizionata goccia a goccia una soluzione di 2-furoil cloruro (3.8 g, 0.05 mol) in CH₂Cl₂ (50 cm³). Si agita per 2 ore, si aggiunge ulteriore 2-furoil cloruro (0.76 g, 0.01 mol) e si lascia agitare tutta notte. La miscela viene poi lavata con acqua (2x200 cm³) e brine (100 cm³), anidrificata, tirata a secco e purificata mediante cromatografia su silice in AcOEt 4/ Petrolio 6.

Resa 51%; p.f. 182-184°C; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1-7.6 (m, 11H); 7.9 (d, 1H, J=4); 10.0 (bs, 1H); 10.4 (bs, 1H).

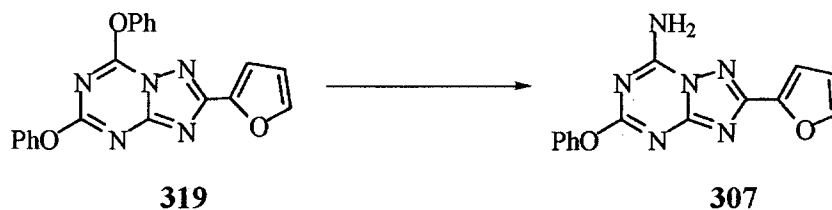
Procedura per la preparazione del 2-(2-furil)-5,7-difenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (319)



L'idrazide ottenuta (**318**, 7.0 g, 0.018 mol), addizionata di P_2O_5 (17 g) viene portata a riflusso per 14 ore in xilene; evaporato poi il solvente, il residuo viene lavato con acqua e brine, anidrificato e tirato a secco; segue purificazione cromatografica in AcOEt 2/ Petrolio 8.

Resa 58%; p.f. 246-248°C; 1H NMR (DMSO d_6) δ : 6.7 (dd, 1H, $J=2$, $J=4$); 7.2 -7.6 (m, 11H); 8.0 (d, 1H, $J=4$).

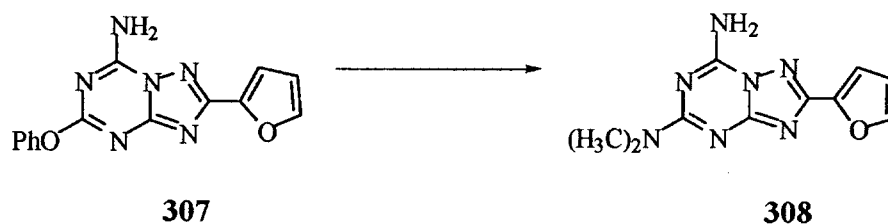
Procedura per la preparazione del 7-ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (307)



Una soluzione del composto ciclizzato in EtOH saturato con NH_4OH viene portato a riflusso per 3 ore; si elimina il solvente e si cristallizza il residuo con etere etilico-etero di petrolio.

Resa 55%; solido giallo pallido; p.f. 250-252°C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 3300, 1615, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 6.7 (dd, 1H, $J=2$, $J=4$); 7.1 (d, 1H, $J=2$); 7.2-7.6 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, $J=4$); 9.1 (bd, 2H).

Procedura per la preparazione del 7-ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (308)

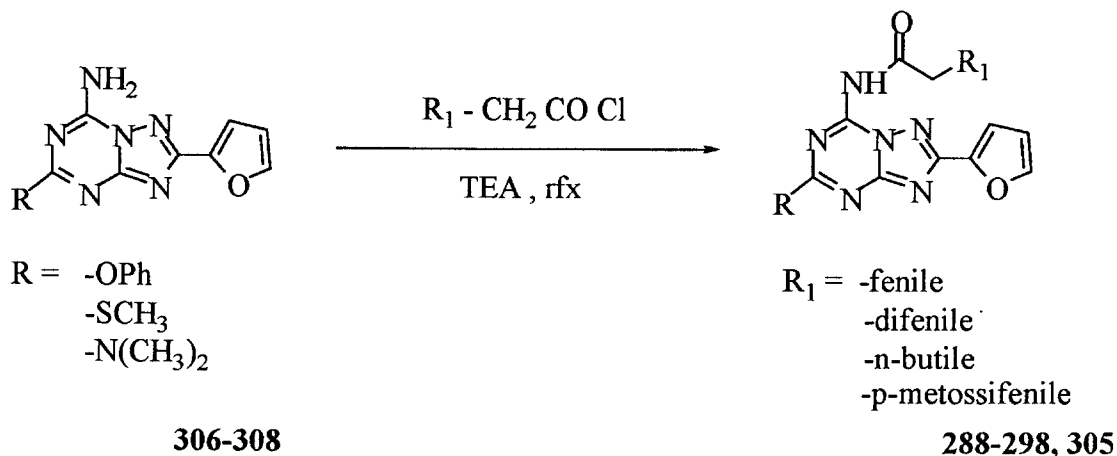


In un tubo chiuso si portano a riflusso 15 ml di dimetilammina in soluzione etanolica al 33% con 300 mg di **307**.

Purificazione mediante colonna cromatografica in AcOEt 1/ Petrolio 1.

Resa 78%; solido giallo pallido; p.f. 260 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 3300, 1620, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.1 (s, 6H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.2 (bd, 2H).

Procedura generale per la preparazione del 7-(aralchilcarbonil)ammino-2-(2-furil)-5-(-N(CH₃)₂; -OC₆H₅; -SCH₃)[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (288-298, 305)



Il composto **306-308** (70 mg, 0.3 mmol) sciolto in THF (15 ml) viene addizionato all'opportuno acil cloruro (**320-323**, 1.2 mmol) e TEA (1.2 mmol). La miscela viene quindi posta a riflusso per 12 ore e purificata mediante flash cromatografia (AcOEt/ Petrolio in diversi rapporti) per dare i prodotti desiderati.

7-[difenilcarbonil]ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (288)

Resa 65%; solido giallo pallido; p.f. 172 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1520, 1420 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 5.1 (s, 1H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 10H); 7.9 (d, 1H, J=4).

7-[(fenilacetil)carbonil]ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (289)

Resa 75%; solido marrone; p.f. 70 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 2.5 (s, 3H); 4.0 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 11.8 (bs, 1H).

7-[(pentil)carbonil]ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (290)

Resa 70%; solido bianco; p.f. 125 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1675, 1520, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.9-1.6 (m, 11H); 2.5 (s, 3H); 4.0 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 11.8 (bs, 1H).

7-(fenilacetil)ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (291)

Resa 65%; solido bianco; p.f. 208 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1520, 1425 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 4.2 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2,); 7.2-7.6 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 9.1 (bs, 1H).

7-(fenilacetil)ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (292)

Resa 75%; solido giallo; p.f. 226 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1525, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.1 (s, 6H); 4.3 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.4 (s, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.8 (bs, 1H)

7-[4-metossi(fenilacetil)]ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (293)

Resa 73%; solido giallo pallido; p.f. 168 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1530, 1460 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.1 (s, 6H); 3.8 (s, 3H); 4.3 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.0 (d, 2H, J=9); 7.4 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.8 (bs, 1H).

7-[4-metossi(fenilacetil)]ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (294)

Resa 70%; solido bianco; p.f. 178 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1525, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.8 (s, 3H); 4.2 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2 (d, 2H, J=9); 7.6 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 9.1 (bs, 1H).

7-(difenilacetil)ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (295)

Resa 67%; solido giallo pallido; p.f. 136 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1520, 1425 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 5.1 (s, 1H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 10H); 7.9 (d, 1H, J=4); 9.1 (bs, 1H).

7-(pentilcarbonil)ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (296)

Resa 71%; solido bianco; p.f. 157 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1685, 1515, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.9-1.6 (m, 11H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (s, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 9.1 (bs, 1H).

7-(difenilacetil)ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (297)

Resa 70%; solido giallo; p.f. 105 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1520, 1425 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.1 (s, 6H); 5.8 (s, 1H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.7-7.4 (s, 10H); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.8 (bs, 1H).

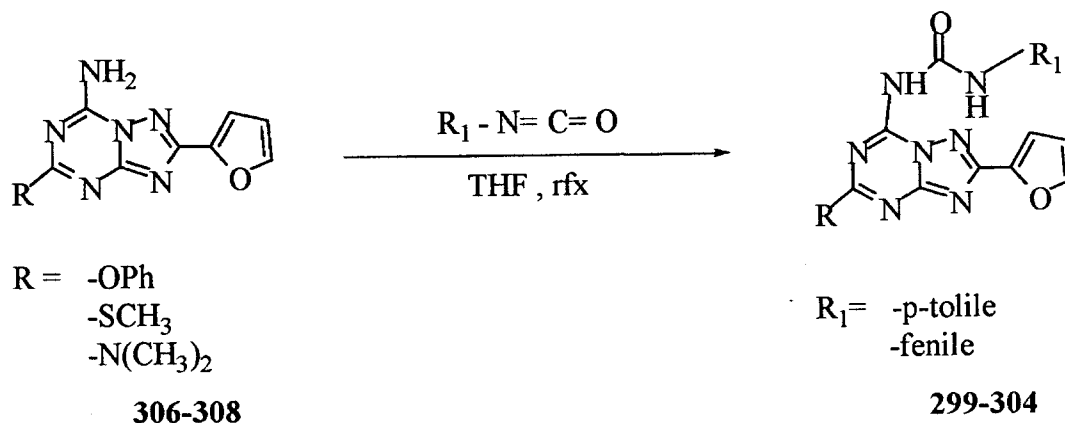
7-(pentilcarbonil)ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (298)

Resa 68%; solido bianco; p.f. 147 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1685, 1515, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 0.9-1.7 (m, 11H); 3.1 (s, 6H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.8 (bs, 1H).

7-[4-(metossibenzil)carbonil]ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (305)

Resa 78%; solido giallo pallido; p.f. 138 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1680, 1525, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 2.5 (s, 3H); 3.8 (s, 3H); 4.3 (s, 2H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 6.9 (d, 2H, J=9); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 11.8 (bs, 1H).

**Procedura generale per la preparazione del 7-(arilcarbamoil)ammino-2-(2-furil)-5-(
N(CH₃)₂; -OC₆H₅; -SCH₃)[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazina (299-304)**



L'ammina **306-308** (10 mmol) è dissolta in diossano distillato di fresco (15 ml) e alla soluzione viene addizionato l'appropriato isocianato (13 mmol). Si porta la miscela a riflusso sotto argon per 18 ore. Il solvente viene quindi allontanato a pressione ridotta e si purifica il residuo per flash cromatografia (AcOEt 3 / Petrolio 7) per dare i composti desiderati.

7-(fenilcarbamoil)ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (299)

Resa 75%; solido giallo; p.f. 165 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 2.5 (s, 3H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.7 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.1 (bs, 1H); 10.6 (bs, 1H).

**7-[4-metil(fenilcarbamoil)]ammino-2-(2-furil)-5-tiometil[1,2,4]triazolo[1,5-a]-
[1,3,5]triazina (300)**

Resa 69%; solido giallo; p.f. 169 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1515, 1460 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO d₆) δ: 2.3 (s, 3H); 2.5 (s, 3H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4); 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2 (d, 2H, J=9); 7.7 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.1 (bs, 1H); 10.6 (bs, 1H).

**7-(fenilcarbamoil)ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-
[1,3,5]triazina (301)**

Resa 80%; solido bianco; p.f. 270 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1520, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 3.1 (s, 6H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 5H); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.2 (bs, 1H); 10.6 (bs, 1H).

7-[4-metil(fenilcarbamoil)]ammino-5-dimetilammino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (302)

Resa 83%; solido bianco; p.f. 263 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1515, 1460 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 2.3 (s, 3H); 3.1 (s, 6H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2 (d, 2H, J=9); 7.6 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.2 (bs, 1H); 10.6 (bs, 1H).

7-(fenilcarbamoil)ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (303)

Resa 65%; solido giallo pallido; p.f. 196 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1510, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2-7.6 (m, 10H); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.7 (bs, 1H); 10.2 (bs, 1H).

7-[4-metil(fenilcarbamoil)]ammino-2-(2-furil)-5-fenossi[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazina (304)

Resa 73%; solido giallo pallido; p.f. 203 °C (AcOEt-etero di petrolio); IR (KBr): 1660, 1510, 1445 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO d_6) δ : 2.3 (s, 3H); 6.7 (dd, 1H, J=2, J=4), 7.1 (d, 1H, J=2); 7.2 (d, 2H, J=9); 7.6 (d, 2H, J=9); 7.9 (d, 1H, J=4); 8.7 (bs, 1H); 10.2 (bs, 1H).

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Pearson, J.D. Ectonucleotidases. Measurement of activities in vivo and in vitro. In: *Topics and perspectives in adenosine research* (Eds. Gerlach E and Becker BF) Springer-Verlag, Berlin, 1987, 89-101.
- 2) Pearson, J.D. Ectonucleotidases. Measurement of activities and use of inhibitors. In: *Methods in pharmacology Vol. 6. Methods used in adenosine research* (Ed. Paton DM) pp83-107. Plenum Press, New York, 1985.
- 3) *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1992 Winter;4(4):346-69.
- 4) Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998, 50, 413-492.
- 5) Snyder, H.S. Adenosine as a neuromodulator. *Ann. Rev. Neurosci.* 1985, 8, 103-122.
- 6) Berne, RM.. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol.* 1963, 204, 317-322.
- 7) Dalziel, HH.; Westfall, DP.. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: Subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev.* 1994, 46, 449-466.
- 8) Burnstock, G.; Bolis, L.; Straub RW. Cell membrane receptors for drugs and hormones: Multidisciplinary Approach. *New York: Raven.* 1978, 107-118.
- 9) Gordon, JL. Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochem J.* 1986, 233, 309-319.
- 10) Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-Purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 1985, 16, 433-440.
- 11) Stone, TW.. Adenosine in the Nervous System. *Academic Press, Londo.* 1991.
- 12) Ollson, RA.; Pearson, JD.; Straub RW. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev.* 1990, 70, 761-845.
- 13) Fredholm, BB.; Abbracchio, MP.; Burnstock, G.; Daly, JW.; Harden, KT.; Jacobson, KA.; Leff, P.; Williams, M.. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994, 46, 143-156.
- 14) Londos, C.; Cooper, D.M.F.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Biochem.* 1979, 77, 2551-2554.
- 15) Van Calker, D.; Muller, M.; Hamprecht, B.. Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem.* 1979, 33, 999-1005.

- 16) Zhou, Q.Y.; Li, C.; Olah, M.E.; Johnson, R.A.; Stiles, G.L.; Clivelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 7432-7436.
- 17) Sajjadi, F.G.; Firestein, G.S. cDNA cloning and sequence analysis of the human A₃ adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1179, 105-107.
- 18) Salvatore, C.A.; Jacobson, M.A.; Taylor, H.E.; Linden, J.; Johnson, R.G. Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 10365-10369.
- 19) Fredholm, B.B.; Burnstock, G.; Harden, T.K.; Spedding, M. Receptor nomenclature. *Drug Dev. Res.*, 1996, 39, 461.
- 20) Fredholm, B.B.; Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Dubyak, G.R.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A.; Schwabe, U.; Williams, M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1997, 18, 79.
- 21) Fredholm, B.B.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 527-552.
- 22) Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Sthele, J.H.; Rivkees, S.A. Molecular cloning and characterization of a rat A₁-receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol. Endocrinol.*, 1991, 5, 1037.
- 23) Dixon, A.K.; Gubitz, A.K.; Sirinathsinghji, D.J.S.; Richardson, P.J.; Freeman, T.C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 118, 1461-1468.
- 24) Freissmuth, M.; Schütz, W.; Linder, M.E. Interactions of the bovine brain A₁-adenosine receptor with recombinant G-protein α -subunits. Selectivity for rG_{i α -3}. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 17778.
- 25) Munshi, R.; Pang, I.H.; Sternweis, P.C.; Linden, J. A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G₁₁, G₁₂ and G_o. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 22285.
- 26) Londos, C.; Cooper, D.M.F.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 2551.
- 27) Van Calker, D.; Müller, M.; Hamprecht, B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature*, 1978, 276, 839.

- 28) Megson, A.C.; Dickenson, J.M.; Townsend-Nicholson, A.; Hill, S.J. Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A₁-receptors and constitutive P₂-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.*, 1995, 115, 1415.
- 29) Gerwins, P.; Fredholm, B.B. Activation of adenosine A₁ and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1995, 351, 186.
- 30) Jain, N.; Kemp, N.; Adeyemo, O.; Buchanan, P.; Stone, T.W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 1995, 116, 2127.
- 31) Malhotra, J.; Gupta, Y.K. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 120, 282.
- 32) Trost, T.; Schwabe, U. Adenosine receptors in fat cells. Identification by (-)-N⁶-[3H]phenylisopropyladenosine binding. *Mol. Pharmacol.*, 1981, 19, 228-235.
- 33) Liang, H-X.; Belardinelli, L.; Ozeck, M.; Shryock, J.C. Tonic activity of the adipocyte A₁-adenosine receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2002, 135, 1457-1466.
- 34) Joost, H.G.; Steinfelder, H.J. Modulation of insulin sensitivity by adenosine. Effects on glucose transport, lipid synthesis, and insuline receptors of the adipocyte. *Mol. Pharmacol.*, 1982, 22, 614-618.
- 35) Belardinelli, L.; Lerman, B. B. Electrophysiological basis for the use of adenosine in the diagnosis and treatment of cardiac arrhythmias. *Br. Heart J.* 1990, 63, 3-4.
- 36) Di Marco, J.P.; Miles, W.; Akhtar, M.; Milstein, S.; Sharma, A.D.; Platia, E.; McGovern, B.; Scheinman, M.M.; Govier, W.C. Adenosine for paroxysmal supraventricular tachycardia: dose ranging and comparison with verapamil. Assessment in placebo-controlled, multicenter trials. *Ann. Intern. Med.*, 1990, 113, 104.
- 37) Niazi, I.; Lanzerotti, C.; Mc Pike, J.; Kiemen, J.; Kappel, D.; Bahnson, T.; Belardinelli, L.; Cheng, J.; Shreeniwas, R.; Wolff, AA. Termination of Supraventricular Tachycardia with CVT-510, a selective A₁ Adenosine Receptor Agonist is associated with Fewer Arrhythmias than Adenosine. *Circulation.* 2001, 17, 2317.
- 38) Gellai, M.; Schreiner, G.F.; Ruffolo, J.; Fletcher, T.; DeWolf, R.; Brooks, D.P. CVT-124, a novel adenosine A₁ receptor antagonist with unique diuretic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 286, 1191-1196.
- 39) Gottlieb, S.S; Brater, D.C; Thomas, I.; Havranek, E.; Bourge, R.; Goldman, S.; Dyer, F.; Gomez, M.; Bennett, D.; Ticho, B.; Beckman, E.; Abraham, W.T. BG9719 (CVT-124), an A₁ adenosine receptor antagonist, protects against the decline in renal function observed with diuretic therapy. *Circulation* 2002, 105, 1348-1353.

- 40) Muller, C.E. Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
- 41) Lohse, M.J.; Klotz, K-N.; Schwabe, U.; Cristalli, G.; Vittori, S.; Grifantini, M. 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A₁ adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1988**, *337*, 687-698.
- 42) Vittori, S.; Lorenzen, A.; Stannek, C.; Costanzi, S.; Volpini, R.; IJzerman, A.P.; Von Freijtag Drabbe Kunzel, J.K.; Cristalli, G. N-Cycloalkyl Derivatives of Adenosine and 1-Deazaadenosine as Agonists and Partial Agonists of the A₁ Adenosine Receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 250-260.
- 43) Knutsen, L.J.S.; Lau, J.; Petersen, H.; Thomsen, C.; Weis, J.U.; Shalmi, M.; Judge, M.E.; Hansen, A.J.; Sheardown, M.J. N-Substituted Adenosines As Novel Neuroprotective A₁ Agonists with Diminished Hypotensive Effects. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3463-3477.
- 44) Hutchinson, S.A.; Baker, S.P.; Scammels, P.J. New 2,N⁶-Disubstituted Adenosines: Potent and Selective A₁ Adenosine Receptor Agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2002**, *10*, 1115-1122.
- 45) Bruns, R.F.; Fergus, J.H. Solubilities of adenosine Antagonists determined by radioreceptor assay. *J. Pharma. Pharmacol.* **1989**, *41*, 590-594.
- 46) Belardinelli, L.; Shryock, J.C.; Zhang, Y.; Scammels, P.J.; Olsson, R.; Dennis, D.; Milner, P.; Pfister, J.; Baker, S.P. 1,3-Dipropyl-8-[2-(5,6-epoxy)norbonyl]xanthine, a potent, specific and selective A₁ adenosine receptor antagonist in the guinea pig heart and brain and in DDTIMF-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275*, 1167-1176.
- 47) Colotta, V.; Catarzi, D.; Varano, F.; Cecchi, L.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Trincavelli, L.; Lucacchini, A. [1,2,4]Triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one: A Versatile Tool for the Synthesis of Potent and Selective Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1158-1164.
- 48) Hess, A.; Muller, C.E.; Frobenius, W.; Reith, U.; Klotz, K-N.; Eger, K. 7-Deazaadenines Bearing polar Substituents: Structure-Activity Relationships of New A₁ and A₃ Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4636-4646.
- 49) Van Muijlwijk-Koezen, J.E.; Timmerman, H.; Vollinga, R.C.; Von Frijtag Drabbe Kunzel, J.K.; De Groote, M.; Visser, S.; IJzerman, A.P. Thiazole and Thiadiazole Analogues as a Novel Class of Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *11*, 2017-2019.
- 50) Kuroda, S.; Akahane, A.; Itani, H.; Nishimura, S.; Durkin, K.; Kinoshita, T.; Tenda, Y.; Sakane, K. Discovery of FR 166124, A Novel Water-Soluble Pyrazolo-[1,5-a]pyrimidine Adenosine A₁ Receptor Antagonist. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1979-1984.

- 51) Ferrarini, P.L.; Mori, C.; Manera, C.; Martinelli, A.; Mori, F.; Saccomanni, G.; Barilli, P.L.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Trincavelli, L.; Lucacchini, A. A Novel Class of Highly Potent and Selective A₁ Adenosine Antagonists: Structure-Affinity Profile of a Series of 1,8-Naphthyridine Derivatives. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2814-2823.
- 52) Daly, J. W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1983**, *3*, 69-80.
- 53) Ferrè S.; Fredholm, B.B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.*, **1997**, *20*, 482.
- 54) Ferrè S.; Von Euler, G.; Johansson, J.; Fredholm, B.B. ; Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 7238.
- 55) Ferrè S.; Fuxe, K.; Von Euler, G.; Johansson, J.; Fredholm, B.B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*, **1992**, *51*, 501.
- 56) Svenningsson, P.; Le Moine, C.; Kull, B.; Sunahara, R.; Bloch, B.; Fredholm, B.B. Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience*, **1997**, *80*, 1171.
- 57) Peterfreund, R.A.; MacCollin, M.; Gusella, J.; Fink, J.S. Characterization and expression of the human A_{2A} adenosine receptor gene. *J. Neurochem.*, **1996**, *66*, 362.
- 58) Varani, K.; Gessi, S.; Dalpiaz, A.; Borea, P.A. Pharmacological and biochemical characterization of purified A_{2A} adenosine receptor in human platelet membranes by [³H]-CGS 21680 binding. *Br. J. Pharmacol.*, **1996**, *117*, 1693.
- 59) Varani, K.; Gessi, S.; Dalpiaz, A.; Borea, P.A. Characterization of A_{2A} adenosine receptor in human lymphocyte membranes by [³H]-SCH 58261 binding. *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, *122*, 386-392.
- 60) Varani, K.; Gessi, S.; Dionisotti, S.; Ongini, E.; Borea, P.A. [³H]-SCH 58261 labelling of functional A_{2A} adenosine receptor in human neutrophil membranes. *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, *123*, 1723.
- 61) Hettinger, B. D.; Lee, A.; Linden, J.; Rosin, D. L. Ultrastructural localization of adenosine A_{2A} receptors suggest multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in the rat striatum. *J. Comp. Neurol.*, **2001**, *431*, 331-346.
- 62) Ongini, E.; Fredholm, B.B. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1996**, *17*, 364-372.

- 63) Stone, T.W.; Behan, W.M.H. Adenosine receptors, kynurenines and neuroprotection. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 15.
- 64) Chen, J.F.; Staal, R.; Xu, K.; Beilstein, M.; Sonsalla, P.K.; Schwarzschild, M.A. Novel neuroprotection by adenosine A_{2A} receptor inactivation in an animal model of Parkinson's disease. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 71.
- 65) Varani, K.; Rigamonti, D.; Sipione, S.; Camurri, A.; Borea, P.A.; Cattabeni, F.; Abbracchio, M.P.; Cattaneo, E. Aberrant amplification of A_{2A} receptor signaling in striatal cells expressing mutant Huntington. *FASEB J.*, 2001, 15, 1245.
- 66) Aoyama, S.; Kase, H.; Borrelli, E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D₂ receptor-deficient mice by an adenosine A_{2A} receptor antagonist. *J. Neurosci.*, 2000, 20, 5848.
- 67) Hirsh, E.C.; Hunot, S. Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21, 163.
- 68) Ferré, S.; O'Connor, W.T.; Snaprud, P.; Ungersted, U.; Fuxe, K. Antagonistic interaction between adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors in the ventral striopallidal system. Implication for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 1994, 63, 765-773.
- 69) Rimondini, R.; Ferré, S.; Ogren S.O.; Fuxe, K. Adenosine A_{2A} agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 1997, 17, 82-91.
- 70) Harada, N.; Okajima, K.; Murakami, K.; Usune, S.; Sato, C.; Ohshima, K.; Katsuragi, T. Adenosine and selective A_{2A} receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 294, 1034-1042.
- 71) Bouma, M.G.; van den Wildenberg, F.A.; Buurman, W.A. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1996, 270, C522-C529.
- 72) Hasko, G.; Kuhel, D.G.; Chen, J.F.; Schwarzschild, M.A.; Deitch, E.A.; Mabley, J.G.; Marton, A.; Szabo, C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A_{2A} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000, 14, 20065-2074.
- 73) Tucker, A.; Linden, J. Cloned receptor and cardiovascular response to adenosine. *Cardiovasc. Res.* 1992, 27, 62-67.
- 74) Bertolet, B.D.; Belardinelli, L.; Franco, E.A.; Nichols, W.W.; Kerensky, R.A.; Hill, J.A. Selective attenuation by N-0861 (N⁶-endonorborean-2-yl-9-methyladenine) of cardiac A₁ adenosine receptor mediated effects in humans. *Circulation* 1996, 93, 1871-1876.
- 75) Marumoto, R.; Yoshioka, Y.; Osamu, M.; Shunsuke, S.; Imai, K.-I.; Kawazoe, K.; Honjo, M. Synthesis and coronary vasodilating activity of 2-substituted adenosines. *Chem. Pharm. Bull.* 1975, 23, 759-774.

- 76) Cusack, N.J.; Hourani, S.M.O. 5'-N-Ethylcarboxamido-adenosine: A potent inhibitor of human platelet aggregation. *Brit. J. Pharmacol.* **1981**, *72*, 443-447.
- 77) Bruns, R.F.; Lu, G.H.; Pugsley, T.A. Characterization of the A₂ adenosine receptor labelled by [³H] NECA in rat striatum membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
- 78) Jarvis, M.F.; Schulz, R.; Hutchison, A.J.; Do, U.H.; Sills, M.A.; Williams, M. [³H] CGS21680, a selective A₂ adenosine receptor agonist directly labels A₂ receptors in rat brain. *J. Pharmacol. EXP. Ther.* **1989**, *251*, 888-893.
- 79) Cristalli, G.; Camaioni, E.; Di Francesco, E.; Volpini, R.; Vittori, S. Chemical and Pharmacological profile of selective adenosine receptor agonists. In *Perspectives in Receptor Research*; Giardinà, D.; Piergentili, S.; Pignini, M. Eds; Pharmaco Chemistry Library, Elsevier Science Publishers: **Amsterdam**, **1996**, 165-180.
- 80) Cristalli, G.; Camaioni, E.; Vittori, S.; Volpini, R. Platelet aggregation, inhibitory activity of selective A_{2A} adenosine receptor agonists. *Nucleosides Nucleotides.* **1995**, *3-5*, 449-453.
- 81) Mathot, R.A.; van der Wenden, E.M.; Soudijn, W.; Ijzerman, A.P.; Danhof, M. Deoxyribose analogs of N⁶-cyclopentyladenosine (CPA)-partial agonists at the adenosine A(1) receptor in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1957-1964.
- 82) Siddiqui, S.M.; Jacobson, K.A.; Esker, J.L.; Olah, M.E.; Ji, X.; Melman, N.; Tiwari, K.N.; Secrist, J.A. III, Schneller, S.W.; Cristalli, G.; Stiles, G.L.; Johnson, C.R.; Ijzerman, A.P. Search for new purine- and ribose-modified adenosine-analogues as selective agonists and antagonists at adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1174-1188.
- 83) Jacobson, K.A.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Fischer, B.; Maillard, M.; van Bergen, A.; van Galen, P.J.M.; Karton, Y.J. Structure-activity relationships of 8-styrylxanthines as A₂-selective adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1333-1342.
- 84) Shimada, J.; Suzuki, F.; Nonaka, H.; Ishii, A.; Ichikawa, S. (E)-1,3-dialkyl-7-methyl-8-(3,4,5)trimethoxystyryl)xanthines: potent and selective adenosine A_{2A} antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2342-2345.
- 85) Muller, C.E.; Geis, U.; Hipp, J.; Schobert, U.; Frobenius, W.; Pawlowski, M.; Suzuki, F.; Sandoval-Ramirez, J. Synthesis and structure-activity relationship of 3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4396-4405.
- 86) Nonaka, Y.; Shimada, J.; Nonaka, H.; Koike, N.; Aoki, N.; Kobayashi, H.; Kase, H.; Yamaguchi, K.; Suzuki, F. Photoisomerization of a potent and selective adenosine A₂ antagonist, (E)-1,3-dipropyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)7-methylxanthine. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3731-3733.

- 87) Shamin, M.T.; Ukena, D.; Padgett, W.L.; Daly, J.W. Effects of 8-phenyl and 8-cycloalkyl substituents on the activity of mono-, di-, and trisubstituted alkylxanthines with substitution at the 1-,3- and 7- positions. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1231-1237.
- 88) Muller, C.E.; Schobert, U.; Hipp, J.; Geis, U.; Frobenius, W.; Pawlowski, M. Configurationally stable analogs of styrylxanthines as A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 709-719.
- 89) Muller, C.E.; Sandoval-Ramirez, J.; Schobert, U.; Geis, U.; Frobenius, W.; Klotz, K.N. 8-(Sulfostyryl)xanthines: water soluble A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 707-719.
- 90) Sauer, R.; Maurinsh, J.; Reith, U.; Fulle, F.; Klotz, K.N.; Muller, C.E. Water-soluble phosphate pro-drugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 440-448.
- 91) Kim, Y.C.; Ji, X.; Jacobson, K.A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist(CGS 15943) are selective for the human A₃ receptor subtype. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4142-4148.
- 92) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Pineda, M.J.; Zocchi, C.; Dionisotti, S.; Ongini, E. Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives: potent and selective A_{2A} adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1164-1171.
- 93) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Bergonzoni, M.; Dionisotti, S.; Ongini, E.; Varani, K.; Borea, P.A. Design, synthesis, and biological evaluation of a second generation of pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as potent and selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2126-2133.
- 94) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Monopoli, A.; Ongini, E.; Varani, K.; Borea, P.A. 7-substituted-5-amino-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as A_{2A} adenosine receptor antagonists: a study on the importance of modifications at the side chain on the activity and solubility. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 115-126.
- 95) Ji, X.D.; Jacobson, K.A. Use of triazolotriazine [³H]-ZM241385 as a radioligand at recombinant human A_{2B} adenosine receptors. *Drug Des. Discov.* **1999**, *16*, 217-226.
- 96) Brackett, L.E.; Daly, J.W. Functional characterization of the A_{2B} adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.*, **1994**, *47*, 801.
- 97) Dubey, R.K.; Gillespie, D.G.; Osaka, K.; Suzuki, F.; Jackson, E.K. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells: possible role of A_{2B} receptor. *Hipertension*, **1996**, *27*, 786.

- 98) Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Characterization of adenosine receptors in human erythroleukemia cells: further evidence for heterogeneity of adenosine A₂ receptors. *Mol. Pharmacol.*, 1993, 43, 909.
- 99) Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells: an enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 1979.
- 100) Yakel, J.L.; Warren, R.A.; Reppert, S.M.; North, R.A. Functional expression of adenosine A_{2B} receptor in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, 1993, 43, 277.
- 101) Nicholls, J.; Brownhill, V.R.; Hourani, S.M.O. Characterization of P1-purinoceptors on rat isolated duodenum longitudinal muscle muscularis mucosae. *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 117, 170.
- 102) Iwamoto, T.; Umemura, S.; Toya, Y.; Uchibori, T.; Kogi, K.; Takagi, N.; Ishii, M. Identification of adenosine A₂ receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 199, 905.
- 103) Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol. Rev.* 1997, 49, 381-402.
- 104) Altiok, N.; Balmforth, A.J.; Fredholm, B.B. Adenosine receptor induced cAMP changes in D384 astrocytoma cells and effect of bradykinin thereon. *Acta Physiol. Scand.*, 1992, 144, 55.
- 105) Phillis, J.W.; O'Regan, M.H.; Perkins, L.M. Effect of adenosine receptor agonist on spontaneous and K⁺-evoked acetylcholine release from the in vivo rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 1993, 605, 293.
- 106) Vallejo, A.I.; Arin, R.M.; Schijvarger, S.A.; Varela, A. Role of A_{2B} receptors in the gastric mucosal cells. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 87.
- 107) Forsythe, P.; Ennis, M. Adenosine, mast cells and asthma. *Inflamm. Res.*, 1999, 48, 301.
- 108) Feoktistov, I.; Goldstein, A.E.; Biaggioni, I. A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors stimulate CDC42 in human mast cells. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 83.
- 109) Feoktistov, I.; Polosa, R.; Holgate, S.T.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors: a novel therapeutic target in asthma? *Trends Pharmacol. Sci.* 1998, 19, 148-153.
- 110) Dubey, R.K.; Gillespie, D.G.; Mi, Z.C.; Jackson, E.K. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts-Role of A_{2B} receptors. *Circulation* 1997, 96, 2656-2666.
- 111) Morrison, R.R.; Talukder, M.A.; Ledent, C.; Mustafa, S.J. Cardiac effects of adenosine in A_{2A} receptors knockout hearts: uncovering A_{2B} receptors. *Am. J. Physiol.* 2002, 282, H437-H444.

- 112) Le Vraux, V.; Chen, Y.L.; Masson, I.; De Sousa, M.; Giroud, J.P.; Florentin, I.; Chauvelot-Moachon, L. Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci.* **1993**, *52*, 1917-1924.
- 113) Beutler, B.; Milsark, I.W.; Cerami, A. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* **1985**, *229*, 869-871.
- 114) De Zwart, M.; Link, R.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J.K.; Cristalli, G.; Jacobson, K.A.; Townsend-Nicholson, A.; Ijzerman, A.P. A functional screening of adenosine analogues at the adenosine A_{2B} receptor: a search for potent agonists. *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 969-985.
- 115) De Zwart, M.; de Groote, M.; van der Klein, P.A.M.; an Dun, S.; Bronsing, R.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J.K.; Ijzerman A.P. Phenyl-substituted N⁶-phenyladenosines and N⁶-phenyl-5'-N-ethylcarboxamidoadenosines with high activity at human adenosine A_{2B} receptors. *Drug. Dev. Rev.* **2000**, *49*, 85-93.
- 116) Vittori, S.; Camaioni, E.; Costanzi, S.; Volpini, R.; Klotz, K-N.; Cristalli, G. Synthesis and receptor affinity of polysubstituted adenosines. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 739-740.
- 117) apassotiropoulos, A.; Hock, C.; Nitsch, R.M. Genetics of interleukin 6: implication for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2001**, *22*, 903-908.
- 118) Harada, H.; Asano, O.; Hoshino, Y.; Yoshikawa, S.; Matsukura, M.; Kabasawa, Y.; Nijima, J.; Kotake, Y.; Watanabe, N.; Kawata, T.; Inoue, T.; Horizoe, T.; Yasuda, N.; Minami, H.; Nagata, K.; Marakami, M.; Nagaoka, J.; Kobayashi, S.; Tanaka, I.; Abe, S. 2-Alkynyl-8-aryl-9-methyladenines as novel adenosine receptor antagonists: their synthesis and structure-activity relationships toward hepatic glucose production induced via agonism of the A_{2B} receptor. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 170-179.
- 119) Jacobson, K.A.; Ijzerman, A.P.; Linden, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A_{2B} adenosine receptors. *Drug. Dev. Res.* **1999**, *47*, 45-53.
- 120) Hayallah, A.M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, P.; Schumacher, B.; Daly, J.W.; Muller, C.E. 1,8-disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent A_{2B}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500-1510.
- 121) Lambertucci, C.; Camaioni, E.; Costanzi, S.; Kachler, S.; Klotz, K-N.; Volpini, R.; Cristalli, G.; Vittori, S. A bromine atom in C-8 position of 9-substituted adenines enhances A_{2A} affinity. Presented at "Purines 2000: Biochemical, pharmacological and clinical perspectives" Abstract reported on *Special Issue Drug Dev. Res.* **2000**, *50*, 67(074).
- 122) Kim, Y-C.; De Zwart, M.; Chang, L.; Moro, S.; von Frijtag Drabbe Kunzel, J.K.; Melman, N.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine

- antagonist (CGS 15943) having high potency at the human A_{2B} and A₃ adenosine receptor subtypes. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2835-2845.
- 123) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Klotz, K-N.; Spalluto, G.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P.A. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as adenosine receptor ligands: a starting point for searching A_{2B} adenosine receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* 2001, 53, 225-235.
- 124) Poucher, S.M.; Keddie, J.R.; Singh, P.; Stoggal, S.M.; Caulkett, P.W.R.; Jones, G.; Collis, M.G. The *in vitro* pharmacology of ZM 241385, a potent non-xanthine, A_{2A} selective adenosine receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 1995, 115, 1096-1102.
- 125) Abbracchio, M.P.; Brambilla, R.; Kim, H.O.; von Lubitz, D.K.J.E.; Jacobson, K.A.; Cattabeni, F. G-protein-dependent activation of phospholipase-C by adenosine A₃ receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1995, 48, 1038-1045.
- 126) Ali, H.; Choi, O.H.; Fraundorfer, P.F.; Yamada, K.; Gonzaga, H.M.S.; Beaven, M.A. Sustained activation of phospholipase-D via adenosine A₃ receptors is associated with enhancement of antigen-ionophore-induced and Ca²⁺-ionophore-induced secretion in a rat mast-cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 276, 837-845.
- 127) van Schaick, E.A.; Jacobson, K.A.; Kim, H.O.; IJzerman, A.P.; Danhof, M. Haemodynamic effects and histamine release elicited by the selective adenosine A₃ receptor agonists 2-Cl-IB-MECA in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1996, 308, 311-314.
- 128) Linden, J.; Taylor, H.E.; Robeva, A.S.; Tucker, A.L.; Stehle, J.; Rivkees, S.A.; Fink, J.S.; Reppert, S.M. Molecular cloning and functional expression of a sheep A₃ adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol. Pharmacol.* 1993, 44, 524-532.
- 129) Poulsen, S.A.; Quinn, R.S. Adenosine receptors: new opportunities for future drug. *Bioorg. Med. Chem.* 1998, 6, 619-641.
- 130) Hagberg, H.; Andersson, P.; Lacarewicz, J.; Jacobson, I.; Butcher, S.; Sandberg, M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem.* 1987, 49, 227-231.
- 131) Fleming, K.M.; Mogul, D.J. Adenosine A₃ receptors potentiate hippocampal calcium current by a PKA-dependent/PKC-independent pathway. *Neuropharmacology* 1997, 36, 353-362.
- 132) Von Lubitz, D.K.J.E.; Lin, R.C.S.; Popik, P.; Carter, M.F.; Jacobson, K.A. Adenosine A₃ receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 263, 59-67.
- 133) Auchampach, J.A.; Rizvi, A.; Qiu, Y.; Tang, X.L.; Maldonado, C.; Teschner, S.; Bolli, R. Selective activation of A₃ adenosine receptors with N-(3-Iodobenzyl)adenosine-5'-N-

- Methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ. Res.* **1997**, *79*, 1153-1160.
- 134) Jacobson, K. A. Adenosine A₃ receptors: novel ligands and paradoxical effects. *TIPS*. **1998**, *19*, 184-190.
- 135) Cushley, M.J.; Tattersfield, A.E.; Holgate, S.T. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *15*, 161-165.
- 136) Ezeamuzie, C.I.; Philips, E. Adenosine A₃ receptors on human eosinophils mediate inhibition of degranulation and superoxide release. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 188-194.
- 137) MacKenzie, W.M.; Hoskin, D.W.; Blay, J. Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A₃ receptor. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3521-6.
- 138) Yao, Y.; Sei, Y.; Abbracchio, M.P.; Jang, J.L.; Kim, Y.C.; Jacobson, K.A. Adenosine A₃ receptor agonist protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A₃ antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *232*, 317-322.
- 139) Fishman, P.; Bar-Yehuda, S.; Ohana, G.; Pathak, S.; Wasserman, L.; Barer, F.; Multani, A.S. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A₃ adenosine receptor. *Eur J Cancer* **2000**, *36*, 1452-1458.
- 140) Jin, X.; Shepherd, R.K.; Duling, B.R.; Linden, J. Inosine binds to A₃ adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2849-2857.
- 141) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P.A. and Spalluto G. A₃ Adenosine receptor ligands; history and perspectives. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 103-128.
- 142) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Klotz, K.N.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P.A. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as highly potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4473-4478.
- 143) Kim, H.O.; Ji, X.D.; Siddiqi, S.M.; Olah, M.E.; Stiles, G.L. and Jacobson, K.A. 2-Substitution of N⁶-benziladenosine-5¹-uronamides enhances selectivity for A₃ adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3164-3621.
- 144) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Ji, X.-D.; Olah, M.E.; Stiles, G.; Dionisotti, S.; Zocchi, C.; Ongini, E. and Jacobson, K.A. Novel N⁶-(substituted-phenylcarbamoyl) adenosine-5¹-uronamides as potent agonists for A₃ adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 802-806.

- 145) Olah, M.E.; Gallo-Rodriguez, C.; Jacobson, K.A. and Stiles, G.L. ^{125}I -4-aminobenzyl-5'-N-methylcarboxamidoadenosine, a high affinity radioligand for the rat A_3 adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 978-982.
- 146) Kim, H.O.; Ji, X.D.; Melman, N.; Olah, M.E.; Stiles, G.L. and Jacobson, K.A. Selective ligands for rat A_3 adenosine receptors: structure-activity relationships of 1,3-dialkylxanthine-7-riboside derivatives. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4020-4030.
- 147) Kim, H.O.; Ji, X.D.; Melman, N.; Olah, M.E.; Stiles, G.L. and Jacobson, K.A. Structure-activity relationships of 1,3-di-alkyl-xanthine derivatives at rat A_3 adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3373-3382.
- 148) Volpini, R.; Costanzi, S.; Lambertucci, C.; Vittorini, S.; Klotz, K.N.; Lorenzen, A.; Cristalli, G. Introduction of Alkynyl Chains on C-8 of Adenosine Led to Very Selective Antagonists of the A_3 Adenosine Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1931-1934.
- 149) Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J.W.; Muller, C.E. 1,8-Disubstituted Xanthine Derivatives. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500-1510.
- 150) Muller, C.E.; Thorand, M.; Quirishi, R.; Dieckmann, M.; Jacobson, K.A.; Padgett, W.L.; Daly, J. W. Imidazo[2,1-i]purin-5-ones and Related Tricyclic Water-soluble Purine Derivatives: Potent $\text{A}_{2\text{A}}$ - and A_3 -Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3440-3450.
- 151) Ozola, V.; Thorand, M.; Quirishi, R.; Dieckmann, M.; Schumacher, B.; Quirishi, R.; Jacobson, K.A.; Muller, C.E. 2-Phenylimidazo[2,1-i]purin-5-ones: Structure-Activity Relationships and Characterization of Potent and Selective Inverse Agonists at Human A_3 Adenosine Receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*(3), 347-356.
- 152) Kim, Y.C.; Ji, X.D.; Jacobson, K.A. Derivatives of the Triazolo-quinazoline adenosine antagonist (CGS 15943) are selective for the human A_3 receptor subtype. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4142-4148.
- 153) Kim, Y.C.; de Zwart, M.; Chang, L.; Moro, S.; Jacobien, K; Frijtag, D.K; Melman, N.; Ijzerman, A.P.; Jacobson, K.A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS15943) having high potency at the human $\text{A}_{2\text{B}}$ and A_3 receptor subtype. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2835-2845.
- 154) Van Muijlwijk-Koezen, J.E.; Timmerman, H.; Link, R.; van der Goot, H.; Menge, W.M.; Frijtag, von Drabbe Kunzel, J.; de Groote, M.; Ijzerman, A.P. Isoquinoline and quinazoline

- urea analogues as antagonists for the human adenosine A₃ receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2227-2238.
- 155) Jiang, J.; van Rhee, A.M.; Chang, L.; Patchornik, A.; Ji, X.; Evans, P.; Melman, N.; Jacobson, K.A. Structure-activity relationships of 4-(phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridines as highly selective A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2596-2608.
- 156) Karton, Y.; Jiang, Y.L.; Ji, X.D.; Melman, N.; Olah, M.E.; Stiles, G.L.; Jacobson, K.A. Synthesis and biological activities of flavonoid derivatives as A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2293-2301.
- 157) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Pineda de Las Infantas, M.J.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Volpini, R.; Costanzi, S.; Vittori, S.; Cristalli, G.; Melman, N.; Park, K.-S.; Ji, X.-D.; Jacobson, K.A. Synthesis and biological activity of a new series of N⁶-arylcarbamoyl, 2-(Ar)alkynyl-N⁶-arylcarbamoyl, and N⁶-carboxamido derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide as A₁ and A₃ adenosine receptor agonists. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3174-3185.
- 158) Moro, S.; Li, A.H.; Jacobson, K.A. Molecular modeling studies of human A₃ adenosine antagonists: structural homology and receptor docking *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 1239-1248.
- 159) Pier Giovanni Baraldi, Barbara Cacciari, Stefano Moro, Romeo Romagnoli, Giampiero Spalluto, Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Karl-Norbert Klotz, Edward Leung, Katia Varani, Stefania Gessi, Pier Andrea Borea. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Investigation of New Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives as Human A₃ Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 770-780.
- 160) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Merighi, S.; Varani, K.; Gessi, S.; Borea, P.A.; Spalluto, G. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives: a new pharmacological tool for the characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Drug Dev. Res.* **2001**, *51*, 406-415.
- 161) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Moro, S.; Klotz, K.N.; Leung, E.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P.A. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as highly potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists: influence of the chain at N⁸ pyrazole nitrogen. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4768-4780.
- 162) Gatta, F.; Del Giudice, M.R.; Borioni, A.; Borea, P.A.; Dionisotti, S. and Ongini, E. Synthesis of imidazo[1,2-c]1,2,4-pyrazolo[4,3-e]pyrimidines, pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines and triazolo[5,1-i]purines: new potent A₂ adenosine receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, *28*, 569-577.

- 163) Lohse, M.J.; Klotz, K.-N.; Lindernborn-Fotinos, J.; Reddington, M.; Schwabe, U.; Olsson, R.A. 8-Cyclopentyl 1-3dipropylxanthine DPCPX a selective high affinity antagonist radioligand for A₁ adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1987**, *336*, 204-210.
- 164) Zocchi, C.; Ongini, E.; Ferrara, S.; Baraldi, P.G.; Dionisotti, S. Binding of the radioligand [³H]-SCH58261, a new non-xanthine A_{2A} adenosine receptor antagonist, to rat striatal membranes. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 1381-1386.
- 165) Varani, K.; Merighi, S.; Gessi, S.; Klotz, K.N.; Leung, E.; Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Borea, P.A. [³H]MRE3008-F20: a novel antagonist radioligand for the pharmacological and biochemical characterization of human A₃ adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 968-975.
- 166) Hansch, C.; Leo, A.; and Hoekman, D. In: *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington, D.C., 1995.
- 167) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Trong, I.L.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- 168) Jiang, Q.; van Rhee, A.M.; Kim, J.; Yehle, S.; Wess, J.; Jacobson, K.A. Hydrophilic side chains in the third and seventh transmembrane helical domains of human A_{2A} adenosine receptors are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 512-521.
- 169) Todd, D. The Wolff-Kishner Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1353-1355.
- 170) Curtius, T.; Mohr, E. Ueberführung von nicotinsäure in b amidopyridin. *Ber.* **1898**, *31*, 2493-2495.
- 171) Moro, S.; Spalluto, G.; Deflorian, F.; Pastorin, G.; Cacciari, B.; Kim, S. K.; Jacobson, K. A. Demystifying the Three Dimensional Structure of G Protein-Coupled Receptors With the Aid of Molecular Modeling. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **2003**.
- 172) Olah, M.E.; Jacobson, K.A.; Stiles, G.L. Role of the second extracellular loop of adenosine receptors in agonist and antagonist binding. Analysis of chimeric A₁/A₃ adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24692-24698.
- 173) Ongini, E.; Dionisotti, S.; Gessi, S.; Irenius, E.; Fredholm, B.B. Comparison of CGS 15943 and SCH 58261 as antagonist at human A₃ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*, 7.
- 174) Anna Maconi, Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Giampiero Spalluto, Pier Giovanni Baraldi, Barbara Cacciari, Katia Varani, Stefano Moro and Pier Andrea Borea. Synthesis, Biological Properties and Molecular Modeling Investigation of the First Potent, Selective and Water Soluble Human A₃ Adenosine Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3579-3582.

- 175) Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Giampiero Spalluto, Francesca Deflorian, Stefano Moro, Barbara Cacciari, Pier Giovanni Baraldi, Stefania Gessi, Katia Varani and Pier Andrea Borea. Pyrazolo[4,3-e]-1, 2, 4-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives as Adenosine Receptor Antagonists. Influence of the N5 Substituent on the Affinity at the Human A₃ and A_{2B} Adenosine Receptor Subtypes: A Molecular Modeling Investigation. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4287-4296.
- 176) Koshiba, M.; Rosin, D. L.; Hayashi, N.; Linden, J.; Sitkovsky, M. V. Patterns of A_{2A} extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow Cytometry studies with anti- A_{2A} receptor monoclonal antibodies. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 614-624.
- 177) Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- 178) Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G.; Da Ros, T.; Klotz, K.-N.; Varani, K.; Gessi, S.; Borea, P.A. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Investigation of New Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives as Human A₃ Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 770-780
- 179) Singha, C.N. Dixit, N.; Sathyanarayana, D.N. ¹H and ¹³C NMR spectra of some unsymmetric N,N'-dipyridyl ureas: spectral assignments and molecular conformations. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1997**, 157-162.
- 180) Hyden, S.; Wilbert, G. Pyridine isocyanates. *Chem. & Ind. (London)* **1967**, *33*, 1406-1407.
- 181) Molecular Operating Environment (MOE 2000.02), Chemical Computing Group, Inc, 1255 University St., Suite 1600, Montreal, Quebec, Canada, H3B 3X3. MOE (2000.02)
- 182) Moro, S.; Guo, D.; Camaioni, E.; Boyer, J. L.; Harden K. T.; Jacobson, K. A. Human P2Y₁ receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1456-1466.
- 183) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105-132.
- 184) Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. An all-atom force field for simulation of protein and nucleic acids. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230-252.
- 185) Dewar, M.J.S.E.; Zoebisch, G.; Healy, E.F. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.
- 186) Schmidt, P.; Eichenberger, K.; Wilhelm, M.; Druey, J. Pyrazolo-pyrimidine III. *Helvetica Chimica Acta*, **1959**, *39*, 349-359.

9. APPENDICE

PARTE SPERIMENTALE

9. 1. CHIMICA

Generale. Le reazioni sono state seguite mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su gel di silice (F₂₅₄ Merck) e i prodotti si visualizzano con Iodio o permanganato di potassio acquoso. Gli spettri all'infrarosso (IR) sono misurati su un Perkin Elmer 257. ¹H NMR viene effettuato in soluzioni di CDCl₃ o DMSO-d₆ con uno spettrometro Bruker AC 200, i valori dei picchi vengono determinati in parti per milione (δ) utilizzando come standard interno il tetrametilsilano, e i valori delle costanti di accoppiamento (J) sono forniti in Hz. L'etere di petrolio si riferisce alle frazioni di ebollizione comprese fra 40-60 °C. I punti di fusione sono stati determinati con un Buchi-Tottoli e non sono stati corretti.

Le colonne cromatografiche sono state effettuate utilizzando gel di silice Merck 60-200. Tutti i prodotti riportati indicano spettri IR e ¹H NMR in accordo con le strutture.

Le fasi organiche sono state anidificate su solfato di magnesio. Le separazioni mediante HPLC sono state condotte con una Waters Delta Prep 3000 in colonna a fase inversa (30 x 3 cm; 15 mm).

I composti sono stati eluiti con un gradiente di 0-60% del solvente B in 25 min ad un flusso di 30 mL/min impiegando come fasi mobili: solvente A (10%, v/v, acetonitrile in 0.1% TFA) e solvente B (60%, v/v, acetonitrile in 0.1% TFA). I prodotti purificati sono stati convertiti nei corrispondenti cloridrati mediante l'utilizzo di una soluzione di HCl 0.1 N nella fase mobile contenente il prodotto puro. Le analisi di HPLC sono state condotte su cromatografia liquida Bruker di tipo LC 21-C, impiegando una colonna Vydac 218 TP 5415 C18 (250 x 4 mm, dimensione delle particelle pari a 5 mm) e sottoposte ad un detector Bruker LC 313 a lunghezza d'onda variabile nel range UV. La valutazione quantitativa è stata effettuata mediante un processore cromatografico associato ad un sistema Epson (QX-10).

Le analisi elementari sono state effettuate presso il laboratorio di microanalisi del Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara e i valori per C, H e N rientrano nel range $\pm 0.4\%$.

9. 2. BIOLOGIA

Preparazione di membrane ottenute da cellule CHO

L'espressione dei recettori umani A_1 , A_{2A} e A_3 in cellule CHO è stato precedentemente riportato.³² Tali cellule crescono aderenti all'interno di fiasche da coltura e vengono mantenute nel Dulbecco's Eagles Medium contenente il mix F12 di nutrienti (DMEM/F12) privo di nucleosidi, siero bovino fetale al 10%, penicillina (100U/ml), streptomina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) e Geneticina (G418, 0.2 mg/ml). Le fiasche sono contenute all'interno di un incubatore in cui viene garantita la temperatura di 37 °C e un'atmosfera contenente il 5% di CO₂ e il 95% di aria. Ottenuta la confluenza cellulare, viene rimosso il mezzo di coltura e le cellule vengono lavate con PBS e staccate dalle fiasche con un tampone ipotonico freddo (Tris HCl 5 mM, EDTA 2mM, pH 7.4). La sospensione di cellule, omogeneizzata poi con un Polytron viene centrifugata per 30 minuti a 48,000 g. Il pellet di membrane viene risospeso in tampone Tris HCl 50 mM ad un pH di 7.4 per i recettori A_1 , in tampone Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ad un pH di 7.4 per gli A_{2A} , in tampone Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, 1 mM di EDTA ad un pH di 7.4 per gli A_3 , e incubato con 3 UI/ml di adenosina deaminasi per 30 minuti a 37°C. Alla fine la sospensione di membrane cellulari viene congelata a -80°C. I pellets sono utilizzati nei saggi di binding e dell'adenilato ciclasti.

Saggi di *binding* sui recettori adenosinici umani A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 clonati

I saggi di *binding* su cellule CHO transfettate con la forma ricombinante dei recettori adenosinici A_1 sono stati condotti utilizzando come radioligando [³H]-DPCPX 1 nM, e 6-8 concentrazioni crescenti del composto in esame. Le membrane venivano omogeneizzate in tampone Tris HCl 50 mM e diluite in modo da ottenere 60 µg di proteine per 100 µl. Ogni campione veniva portato ad un volume finale di 250 µl. Il *binding* non specifico è stato

definito in presenza di DPCPX 1 μM ed è risultato essere $\leq 10\%$ del *binding* totale. I campioni sono stati quindi incubati per 90 minuti a 25°C.

I saggi di *binding* sulle cellule CHO transfettate con la forma ricombinante dei recettori adenosinici A_{2A} sono stati eseguiti utilizzando [^3H]-ZM241385 1 nM e 6-8 concentrazioni crescenti del composto in esame. Le membrane venivano omogeneizzate in un tampone Tris HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 2 mM, pH 7.4, in modo da ottenere 100 μg di proteine per 100 μl . Il *binding* non specifico è stato determinato in presenza di ZM241385 1 μM ed è risultato essere $\leq 30\%$ del *binding* totale. Ogni campione veniva portato ad un volume finale di 250 μl e incubato per 60 minuti alla temperatura di 4 °C.⁵⁹

Gli esperimenti di inibizione di [^3H]-DPCPX sulle cellule HEC-293 (Receptor Biology Inc., Beltsville, MD, USA) transfettate con la forma ricombinante del recettore adenosinico A_{2B} umano sono stati eseguiti utilizzando come radioligando [^3H]-DPCPX 30 nM e 6-8 concentrazioni crescenti del composto in esame. Le membrane cellulari sono state risospese in tampone Tris HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM, benzamidina 0.1 mM, pH 7.4, 2 UI/ml di adenosina deaminasi, in modo da ottenere 20 μg di proteine per campione. Il *binding* non-specifico è stato determinato in presenza di NECA 100 μM ed è risultato $\leq 30\%$ del *binding* totale. Ogni campione viene portato ad un volume finale di 100 μl e incubato per 60 minuti a 25°C.¹⁶⁵

I saggi di *binding* sulle cellule CHO transfettate con la forma ricombinante del recettore adenosinico A_3 umano, sono stati effettuati utilizzando [^3H]MRE3008-F20 1 nM e 6-8 concentrazioni crescenti del composto in esame. Le membrane venivano omogeneizzate in un tampone Tris HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM, pH7.4, in modo da ottenere 100 μg di proteine per 100 μl .¹⁶⁵ Il *binding* non specifico è stato determinato in presenza di [^3H]MRE3008-F20 1 μM ed è risultato essere $\leq 30\%$ del *binding* totale.

La radioattività libera e quella legata sono state separate mediante una filtrazione sottovuoto attraverso filtri Whatman GF/B di fibra di vetro con un apparato di filtrazione "Micro-Mate" (Packard Instrument Company). La radioattività trattenuta dai filtri viene poi contata mediante un "Top Count Microplate Scintillation Counter" (efficienza del 57%). La concentrazione proteica è stata determinata secondo il metodo Bio-Rad¹⁷⁰ con l'utilizzo di albumina bovina usata come standard di riferimento.

Saggio di *binding* sui recettori clonati hA₁, hA_{2A} e hA₃ (triazolo-triazine).

I saggi di "binding" sulle cellule CHO, transfettate con la forma ricombinante dei recettori adenosinici hA₁, sono stati condotti utilizzando, come radioligando, [³H]-DPCPX, mentre per i recettori hA_{2A} su cellule HEK è stato impiegato il radioligando: [³H]-ZM241385. Analogamente per i recettori hA₃ in cellule CHO è stato utilizzato IB-MECA.

Nel "binding" non specifico degli A₁ sono state impiegate 6-8 differenti concentrazioni di composto e lavorate in presenza di CHA 10 µM.

Nel "binding" non specifico degli A_{2A} sono state impiegate 6-8 differenti concentrazioni di composto e lavorate in presenza di NECA 50 µM mantenendo la temperatura di incubazione di 25°C per 60 min.

Nel "binding" non specifico degli A₃ sono state impiegate 6-8 differenti concentrazioni di composto e lavorate in presenza di IB-MECA 1µM mantenendo la temperatura di incubazione di 4°C per 120 min.

Saggi di *binding* su recettori adenosinici A₁, A_{2A} e A₃ di ratto

Le cellule RBL-2H3 sono state fatte crescere nel Dulbecco's Eagles medium modificato contenente il 10% di siero bovino fetale, penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml), a 37 °C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂; le membrane omogeneizzate sono state preparate con il metodo già riportato.^{141, 142} La composizione del tampone di lisi è Tris 10 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4 a 5°C. Il saggio di *binding* del composto [¹²⁵I]N⁶-(4-ammino-3-

iodobenzil)adenosina-5'-(N-metiluronamide) ($[^{125}\text{I}]\text{AB-MECA}$) sulle membrane delle cellule RBL-2H3 è stato eseguito come riportato. I dosaggi sono stati eseguiti in un tampone contenente 50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, pH 8.26 a 5 °C.^{141, 145} Le provette contenevano 100 μl di sospensione di membrane omogeneizzate, 50 μl di $[^{125}\text{I}]\text{AB-MECA}$ (fino a una concentrazione finale di 0.3 nM), e 50 μl di soluzione dell'antagonista da saggiare. Gli antagonisti sono stati inizialmente disciolti in DMSO ad una concentrazione di 5 mM e poi diluiti con un tampone fino alla concentrazione finale dove l'ammontare di DMSO non è mai superiore all'1%. Le doppie incubazioni sono state effettuate per 1 h a 37°C e interrotte mediante filtrazione rapida su filtri Whatman GF/B usando un raccogliatore di cellule Brandell (Brandell, Gaithersburg, MD). Le provette sono state lavate per tre volte con 3 ml di tampone. La radioattività sui filtri è stata determinata con un "Beckman 5500B β -counter". Il *binding* non specifico è stato determinato in presenza di N-etilcarbrossamidoadenosina (NECA) 200 μM .

Il *binding* della $[^3\text{H}]\text{R-N}^6$ -fenilisopropiladenosina ($[^3\text{H}]\text{R-PIA}$) su recettori A_1 , provenienti da membrane di cellule di corteccia cerebrale di ratto, e quello del composto $[^3\text{H}]\text{CGS 21680}$ su recettori $\text{A}_{2\text{A}}$ provenienti dalla membrana striatale di ratto, sono stati eseguiti secondo procedura nota.^{178, 179} La adenosina deaminasi (3 U/ml) era presente durante la preparazione delle membrane di cervello ma non veniva addizionata durante l'incubazione con i radioligandi. Il *binding* sui recettori A_1 è stato eseguito a 37°C mentre quello sui recettori $\text{A}_{2\text{A}}$ è stato eseguito a 25°C. Il *binding* non specifico è stato determinato in presenza di 2-cloroadenosina (100 μM per A_1 e 400 μM per $\text{A}_{2\text{A}}$).

In tutti i saggi di *binding* sono state usate almeno 6 concentrazioni diverse di antagonista nel range di tre ordini di grandezza per poter calcolare appropriatamente la IC_{50} di ogni composto. I valori di IC_{50} sono stati calcolati con un computer usando il metodo della regressione non lineare strumentata del programma InPlot (Graph-PAD, San Diego, CA) che, applicando

l'equazione di Cheng-Prusoff, converte i valori apparenti di K_i usando valori di K_d di 1.0 nM, 14 nM, and 3.6 nM, rispettivamente dei composti [^3H]R-PIA, [^3H]CGS 21680 e [^{125}I]IB-MECA.

Saggio dell'Adenilato ciclastasi

Le membrane sono state sospese in 0.5 ml di tampone di incubazione (50 mM tris HCl, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) contenente GTP 5 μM , 0.5 mM di 4-(3-butossi-4-metossibenzil)-2-imidazolidinone (Ro 20-1724) come inibitore di fosfodiesterasi, 2.0 IU/ml di adenosina deaminasi, e sono state preincubate per 10 minuti sotto agitazione in un bagno termostato a 37°C. Quindi l'IB-MECA o gli antagonisti da esaminare vengono aggiunti alla miscela insieme a ATP (1 mM) e forskolina 10 μM e si continua l'incubazione per altri 10 minuti. La potenza degli antagonisti è stata determinata mediante l'antagonismo dell'inibizione della produzione di cAMP indotta da IB-MECA (100 nM). La reazione era ultimata con il trasferimento in un bagno di acqua bollente; dopo 2 minuti di bollitura le provette sono state raffreddate a 4°C e centrifugate a 2,000 g per 10 min. Il surnatante (100 μl) viene usato per la determinazione dei livelli di cAMP prodotti, seguendo il metodo riportato da Varani et al.¹⁶⁵

I campioni standard di cAMP (0-10 pmol) sono stati aggiunti ad ogni provetta in esame contenente il tampone di incubazione (Trizma base 0.1 M; aminofillina 8.0 mM; 2-mercaptoetanololo 6.0 mM, pH 7.4) e [^3H]-cAMP in un volume totale di 0.5 ml. La proteina legante, preparata dalle surrenali di manzo, viene aggiunta ai campioni (precedentemente incubati a 4° C per 150 minuti) e, dopo aver aggiunto carbone, si procede con la centrifugazione a 2,000 g per 10 min. Il surnatante limpido (0.2 ml) è stato mescolato con 4 ml di liquido di scintillazione e analizzato in un LS-1800 Beckman scintillation counter.

Dosaggio dell'inibizione dell'Adenilato Ciclasi su cellule transfettate con i recettori hA_{2B} (triazolo-triazine)

Attualmente, per problemi di brevetto, non è possibile effettuare il "binding" sul recettore A_{2B}, quindi il test è stato condotto utilizzando un saggio funzionale, condotto da Karl Norbert Klotz (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg, Versbacher Strasse 9, D-97078 Würzburg, Germany), in cui si valuta l'inibizione dell'enzima Adenilato ciclasi, in cellule HEK transfettate con il recettore hA_{2B}. Si tratta di un saggio meno sensibile, che rende difficile il confronto dei risultati ottenuti con gli altri sottotipi recettoriali.

Dosaggio dei livelli di cAMP (determinazione della K_B)

I livelli di cAMP sono stati misurati con il metodo di *binding* competitivo alla proteina.¹⁸⁰ Le cellule CHO transfettate con i recettori adenosinici umani A₃ vengono tripsinizzate e, dopo centrifugazione, risospese nel medium e depositate, in volumi di 1 ml, in 24 piastre di coltura. Dopo 24 ore si rimuove il medium e le cellule vengono lavate 3 volte con 1 ml di Dulbecco's Eagle's medium modificato, contenente 50 mM HEPES, pH 7.4. Le cellule vengono poi trattate, in presenza di rolipram (10 µM) e adenosina deaminasi (3 U/ml), con un range di concentrazioni dell'agonista Cl-IB-MECA solo o in combinazione con concentrazioni fissate di antagonista. Dopo 45 minuti si aggiunge al medium forskolina (10 µM) e si prosegue l'incubazione per altri 15 minuti. La reazione viene interrotta tramite la rimozione del surnatante e le cellule sono state lisate con l'aggiunta di 200 µl di HCl 1M freddo. Il lisato cellulare viene risospeso e conservato a -20°C. Per determinare i livelli di cAMP la protein-chinasi A (PKA) è stata incubata insieme a [³H]cAMP (2 nM) in un tampone K₂HPO₄/EDTA buffer (K₂HPO₄, 150 mM; EDTA, 10 mM), 20 µl del lisato cellulare e 30 µL 0.1 M HCl e 50 µl di soluzione di cAMP (0-16 pmol/200 µl per la curva standard) La radioattività legata è stata separata tramite filtrazione attraverso filtri Whatman GF/C, lavata una volta con tampone freddo. La radioattività viene misurata tramite uno scintillatore in fase liquida.

Per ogni curva concentrazione/effetto di Cl-IB-MECA è stato determinato un valore di EC₅₀ per l'accumulo di cAMP, usando il GraphPAD Prism software (GraphPAD, San Diego, CA). L'analisi di Schild¹⁶³ è stata eseguita sull'effetto dell'antagonismo.

9.3. APPROCCIO COMPUTAZIONALE

Tutti i calcoli sono stati effettuati su una workstation Silicon Graphics Octane R12000.

Il modello di recettore umano A₃ è stato ottenuto e ottimizzato mediante un pacchetto di modeling¹⁸¹ basato su un approccio proposto da Moro e al.¹⁸²

I domini transmembrana sono stati ottenuti mediante l'aggiunta dell'idrofobicità Kyte-Doolittle, e dei parametri di probabilità dell' E_{min} di superficie.¹⁸³

Le eliche transmembrana sono state ricavate dalle sequenze e minimizzate individualmente, quindi sono state raggruppate per formare un fascio di eliche in grado di rispecchiare le caratteristiche della struttura cristallografica della rodopsina bovina, recentemente pubblicata (PDB ID: 1F88). Tale fascio è stato a sua volta minimizzato impiegando un all-atoms force field Amber94,¹⁸⁴ finché il valore *rms* del gradiente coniugato (CG) fosse <0.01 kcal/mol/Å.

In tutti questi calcoli è stata adottata una costante dielettrica pari a 4.0.

Tutti i composti a struttura pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinica sono stati ottimizzati impiegando calcoli semiempirici RHF/AM1.¹⁸⁵

E' stato fatto il docking dei composti all'interno dell'ipotetico sito di legame mediante il DOCK docking program, che fa parte del sistema MOE.¹⁷⁷

Tale metodo di docking consente di monitorare contemporaneamente le interazioni di Van der Waals e quelle di tipo elettrostatico, oltre che di valutare le possibili conformazioni dei ligandi; è stato impiegato l'allineamento di Monte Carlo, che consiste nell'utilizzo di un casuale algoritmo di interazione che comporta modifiche di angoli di torsione e di posizioni atomiche, mentre ricalcola le energie interne e di interazione. Durante il docking, tutti gli angoli di torsione della catena laterale del ligando sono liberi di variare. A questo segue un'altra sequenza di minimizzazione energetica CG fino ad una soglia di gradiente < 0.1

kcal/mol/Å. La minimizzazione energetica di tutti i complessi viene effettuata impiegando un all-atoms force field Amber94.

I valori dell'energia di interazione sono stati calcolati come segue: $\Delta E_{(\text{complesso})} = E_{(\text{complesso})} - (E_{(L)} + E_{(\text{recettore})})$. Queste energie non sono quantità termodinamiche rigorose, perciò possono solo essere impiegate per valutare la stabilità dei complessi; di conseguenza, non possono essere utilizzate per calcolare le affinità di legame, dal momento che non vengono considerati gli effetti di solvatazione e i cambiamenti di entropia.

Tabella 24. Analisi elementare dei composti sintetizzati (110-165).

Comp	formula	MW	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
110	$C_{18}H_{14}N_8O_2$	374.36	57.75	3.77	29.93	56.90	4.15	29.05
111	$C_{18}H_{14}N_8O_5S$	450.08	47.58	3.11	24.06	47.72	3.08	24.11
112	$C_{18}H_{12}N_8O_2Cl_2$	442.04	48.78	2.73	25.28	48.57	2.70	25.14
113	$C_{19}H_{14}N_8O_4$	418.11	53.34	3.23	26.64	53.42	3.26	26.71
114	$C_{18}H_{13}N_9O_4$	419.10	54.55	3.37	26.78	54.66	3.41	26.85
115	$C_{19}H_{16}N_8O_2$	388.13	58.76	4.15	28.85	58.63	4.12	28.65
116	$C_{18}H_{13}N_8O_2Br$	453.26	47.70	2.89	24.72	47.89	2.94	24.78
117	$C_{18}H_{13}N_8O_2F$	392.35	55.10	3.34	28.56	55.17	3.33	28.66
118	$C_{19}H_{13}N_8O_2F_3$	344.13	51.59	2.96	25.33	51.72	3.01	25.41
119	$C_{19}H_{16}N_8O_3$	404.39	56.43	3.99	27.71	56.27	3.92	27.64
120	$C_{19}H_{16}N_8O_3$	404.39	56.43	3.99	27.71	56.31	4.00	27.73
121	$C_{18}H_{13}N_8O_2Cl$	408.80	52.89	3.21	27.41	53.01	3.30	27.52
122	$C_{18}H_{13}N_8O_2Cl$	408.80	52.89	3.21	27.41	52.66	3.15	27.29
123	$C_{19}H_{16}N_8O_2$	388.39	58.76	4.15	28.85	57.62	4.32	28.05
124	$C_{19}H_{16}N_8O_5S$	468.09	48.72	3.44	23.92	48.57	3.29	23.77
125	$C_{19}H_{14}N_8O_2Cl_2$	456.06	49.91	3.09	24.50	50.03	3.14	24.71
126	$C_{20}H_{16}N_8O_4$	432.12	55.56	3.73	25.91	55.33	3.67	26.03
127	$C_{19}H_{15}N_9O_4$	433.12	52.66	3.49	29.09	52.43	3.65	29.23
128	$C_{20}H_{18}N_8O_2$	402.15	59.69	4.51	27.85	59.82	4.38	27.72
129	$C_{19}H_{15}N_8O_2Br$	467.28	48.84	3.24	23.98	48.99	3.24	24.05
130	$C_{19}H_{15}N_8O_2F$	406.38	56.16	3.72	27.57	56.37	3.83	27.74
131	$C_{20}H_{15}N_8O_2F_3$	456.39	52.64	3.31	24.55	52.44	3.26	24
132	$C_{20}H_{18}N_8O_3$	418.41	57.40	4.34	26.79	57.61	4.37	26.91
133	$C_{20}H_{18}N_8O_3$	418.41	57.40	4.34	26.79	57.66	4.40	26.93
134	$C_{19}H_{15}N_8O_2Cl$	422.83	54.02	3.58	26.54	54.00	3.71	26.60

Tabella 24. Analisi elementare dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Comp	formula	MW	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
135	$C_{19}H_{15}N_8O_2Cl$	422.83	54.02	3.58	26.54	53.86	26.55	53.77
136	$C_{20}H_{18}N_8O_2$	402.42	59.69	4.51	27.85	58.66	3.98	28.11
137	$C_{20}H_{18}N_8O_3S$	482.11	59.69	4.51	27.85	59.45	4.56	27.99
138	$C_{20}H_{16}N_8O_2Cl$	470.07	55.12	3.70	25.71	54.97	3.62	25.62
139	$C_{21}H_{18}N_8O_4$	446.14	56.50	4.06	25.10	56.33	4.11	25.32
140	$C_{20}H_{17}N_9O_4$	447.14	53.69	3.83	28.18	53.84	3.97	28.34
141	$C_{21}H_{20}N_8O_2$	416.16	60.57	4.84	26.91	60.23	4.75	26.74
142	$C_{20}H_{17}N_8O_2Br$	481.31	49.91	3.56	23.28	50.03	3.61	23.40
143	$C_{20}H_{17}N_8O_2F$	420.40	57.14	4.08	26.65	57.03	4.15	26.84
144	$C_{21}H_{17}N_8O_2F_3$	470.41	53.62	3.64	23.82	53.46	3.59	24.00
145	$C_{21}H_{20}N_8O_3$	432.44	58.31	4.66	25.92	58.54	4.68	26.01
146	$C_{21}H_{20}N_8O_3$	432.44	58.31	4.66	25.92	58.18	4.62	25.91
147	$C_{20}H_{17}N_8O_2Cl$	436.86	55.03	3.93	25.69	55.32	3.97	25.86
148	$C_{20}H_{17}N_8O_2Cl$	436.86	55.03	3.93	25.69	54.89	3.90	25.57
149	$C_{21}H_{20}N_8O_2$	416.45	60.57	4.84	26.91	59.88	4.04	27.34
150	$C_{21}H_{20}N_8O_2S$	496.12	56.24	4.49	24.98	56.35	4.40	25.03
151	$C_{21}H_{18}N_8O_2Cl_2$	484.09	51.97	3.74	23.09	52.21	3.79	23.12
152	$C_{22}H_{20}N_8O_4$	460.16	57.39	4.38	24.34	57.62	4.35	24.51
153	$C_{21}H_{19}N_9O_4$	461.15	54.66	4.15	27.32	54.99	4.23	27.50
154	$C_{22}H_{22}N_8O_2$	430.18	61.38	5.15	26.03	61.07	5.04	26.02
155	$C_{21}H_{19}N_8O_2Br$	495.34	50.92	3.87	22.62	51.13	4.00	22.78
156	$C_{21}H_{19}N_8O_2F$	434.43	58.06	4.41	25.79	57.85	4.23	25.71
157	$C_{22}H_{19}N_8O_2F_3$	484.44	54.55	3.95	23.13	54.81	3.78	23.23
158	$C_{22}H_{22}N_8O_3$	446.47	59.19	4.97	25.10	59.00	5.01	25.05
159	$C_{22}H_{22}N_8O_3$	446.47	59.19	4.97	25.10	59.17	4.90	25.02

Tabella 24. Analisi elementare dei composti sintetizzati (110-165) (continua).

Comp	formula	MW	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
160	$C_{21}H_{19}N_8O_2Cl$	450.89	55.94	4.25	24.85	56.09	4.35	24.98
161	$C_{21}H_{19}N_8O_2Cl$	450.89	55.94	4.25	24.85	55.69	4.15	24.79
162	$C_{19}H_{15}N_7O_2$	373.12	61.12	4.05	26.26	61.35	4.12	26.42
163	$C_{20}H_{17}N_7O_2$	387.14	62.01	4.42	25.31	61.83	4.29	25.17
164	$C_{21}H_{19}N_7O_2$	401.16	62.83	4.77	24.42	63.04	4.82	24.27
165	$C_{22}H_{21}N_7O_2$	415.17	63.60	5.09	23.60	63.39	4.93	23.45

Tabella 25. Analisi elementari dei composti sintetizzati (204-209).

Comp	formula	PM	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
204	$C_{17}H_{13}N_9O_2$	375.35	54.40	3.49	33.58	54.32	3.51	33.51
205	$C_{17}H_{14}N_9O_2Cl$	411.81	49.58	3.43	30.61	50.08	3.48	30.76
206	$C_{17}H_{13}N_9O_2$	375.35	54.40	3.49	33.58	54.63	3.45	33.49
207	$C_{17}H_{14}N_9O_2Cl$	411.81	49.58	3.43	30.61	50.01	3.39	30.65
208	$C_{17}H_{13}N_9O_2$	375.35	54.40	3.49	33.58	54.57	3.47	33.43
209	$C_{17}H_{14}N_9O_2Cl$	411.81	49.58	3.43	30.61	49.47	3.42	30.55

Tabella 26. Analisi elementare dei composti sintetizzati (230-246).

Comp.	formula	MW	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
230	$C_{18}H_{23}N_7O$	353.20	61.17	6.56	27.74	60.99	6.49	27.65
231	$C_{17}H_{19}N_7O$	337.17	60.52	5.68	29.26	60.49	5.67	29.13
232	$C_{18}H_{20}N_8O_2$	380.17	56.83	5.30	29.46	56.92	5.37	29.55
233	$C_{17}H_{20}N_8O_2$	368.17	55.43	5.47	30.42	55.29	5.39	30.37
234	$C_{22}H_{21}N_8O_4$	461.17	57.26	4.59	24.28	57.32	4.63	24.35
235	$C_{22}H_{28}N_8O_2$	436.23	60.53	6.47	25.67	60.52	6.49	25.58
236	$C_{21}H_{28}N_8O_2$	424.23	59.42	6.65	26.40	59.47	6.70	26.44
237	$C_{26}H_{28}N_8O_4$	516.22	60.46	5.46	21.69	60.29	5.39	21.55
238	$C_{23}H_{24}N_8O_2$	444.20	62.15	5.44	25.21	61.98	5.39	25.20
239	$C_{25}H_{34}N_8O_2$	478.28	62.74	7.16	23.41	62.83	7.17	23.49
240	$C_{24}H_{34}N_8O_2$	466.28	61.78	7.34	24.02	61.58	7.30	23.89
241	$C_{29}H_{34}N_8O_4$	558.27	62.35	6.13	20.06	62.21	6.07	19.97
242	$C_{26}H_{30}N_8O_2$	486.25	64.18	6.21	23.03	63.99	6.18	22.89
243	$C_{24}H_{30}N_8O_2$	462.25	62.32	6.54	24.22	62.48	6.60	24.32
244	$C_{23}H_{30}N_8O_2$	450.25	66.65	5.79	21.44	66.38	5.65	21.38
245	$C_{28}H_{30}N_9O_4$	542.24	61.98	5.57	20.65	62.07	5.61	20.73
246	$C_{25}H_{26}N_8O_2$	470.22	63.82	5.57	23.81	64.01	5.63	23.95

Tabella 27. Analisi elementari dei composti sintetizzati (263-271).

Comp.	formula	PM	Teorico			Osservato		
			% C	%H	%N	%C	%H	%N
263	$C_{23}H_{23}N_7O_2$	429.48	64.32	5.40	22.83	64.18	5.29	22.75
264	$C_{26}H_{21}N_7O_2$	463.50	67.38	4.57	21.15	67.45	5.01	21.23
265	$C_{27}H_{23}N_7O_2$	477.53	67.91	4.85	20.53	67.77	4.84	20.48
266	$C_{27}H_{25}N_7O_2$	479.54	67.63	5.25	20.45	67.66	5.35	20.62
267	$C_{30}H_{23}N_7O_2$	513.56	70.16	4.51	19.09	69.95	4.42	18.95
268	$C_{31}H_{25}N_7O_2$	527.59	70.57	4.78	18.58	71.79	4.94	18.65
269	$C_{23}H_{25}N_7O_3$	447.50	61.73	5.63	21.91	61.77	5.63	21.96
270	$C_{26}H_{21}N_7O_3$	479.50	65.13	4.41	20.45	64.95	4.37	20.41
271	$C_{27}H_{25}N_7O_3$	495.54	65.44	5.04	19.79	65.37	4.92	19.64

Tabella 28. Analisi elementari dei composti sintetizzati (288-308).

Comp	formula	MW	Teorico			Osservato		
			% C	% H	% N	% C	% H	% N
288	$C_{23}H_{18}N_6SO_2$	442.50	62.43	4.10	18.99	60.53	4.15	20.05
289	$C_{17}H_{14}N_6SO_2$	366.40	55.73	3.85	22.94	57.72	3.08	24.11
290	$C_{15}H_{18}N_6SO_2$	346.41	52.01	5.24	24.26	51.57	4.70	25.14
291	$C_{22}H_{16}N_6O_3$	412.41	64.07	3.91	20.38	63.42	3.26	22.71
292	$C_{18}H_{17}N_7O_2$	363.38	59.50	4.72	26.98	55.66	4.41	28.85
293	$C_{19}H_{19}N_7O_3$	393.41	58.01	4.87	24.92	59.63	4.12	26.65
294	$C_{23}H_{18}N_6O_4$	442.44	62.44	4.10	18.99	61.89	3.94	20.78
295	$C_{28}H_{20}N_6O_3$	488.51	68.84	4.13	17.20	65.17	5.33	19.66
296	$C_{20}H_{20}N_6O_3$	392.42	61.22	5.14	21.42	60.72	6.01	25.41
297	$C_{24}H_{21}N_7O_2$	439.48	65.59	4.82	22.31	66.27	3.92	25.64
298	$C_{16}H_{21}N_7O_2$	343.39	55.96	6.16	28.55	56.31	5.00	27.73
299	$C_{16}H_{13}N_7SO_2$	367.39	52.31	3.57	26.69	53.01	3.30	27.52
300	$C_{17}H_{15}N_7SO_2$	381.41	53.53	3.96	25.71	52.66	3.15	27.29
301	$C_{17}H_{16}N_8O_2$	364.37	56.04	4.43	30.75	57.62	4.32	28.05
302	$C_{18}H_{18}N_8O_2$	378.40	57.14	4.79	29.61	58.57	3.29	25.77
303	$C_{21}H_{15}N_7O_3$	413.40	61.01	3.66	23.72	60.03	3.14	24.71
304	$C_{22}H_{17}N_7O_3$	427.43	61.82	4.01	22.94	65.33	3.67	24.03
305	$C_{18}H_{16}N_6SO_2$	380.43	56.83	4.24	22.09	53.43	4.65	20.23
306	$C_9H_8N_6SO$	248.26	43.54	3.25	33.85	44.82	3.38	29.72
307	$C_{14}H_{10}N_6O_2$	294.27	57.14	3.43	28.56	58.99	3.24	24.05
308	$C_{10}H_{11}N_7O$	245.25	48.98	4.52	39.98	46.37	4.83	37.74