



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

***Progettazione e Sintesi di nuovi Probes per il TSPO
a struttura chinazolincarbossammidica***

Relatori:

Dott.ssa Sabrina Taliani
Dott.ssa Elisabetta Barresi

Candidato:

Andrea Bargellini

Anno Accademico 2013/2014

Indice

INTRODUZIONE.....	4
TSPO e Steroidogenesi	6
TSO E Apoptosi	8
TSPO e Immunomodulazione	9
Alterazioni dei livelli di espressione del TSPO	10
TSPO e Ligandi Endogeni	12
TSPO e Ligandi Sintetici	13
Benzodiazepine	16
Derivati Isochinolin e Chinazolin Carbossiammidici	17
Benzotiazepine.....	23
Benzossazepine.....	24
Imidazopiridine e Fenossifenil-acetammidi.....	24
Pirazolopirimidine.....	29
Derivati Indolacetammidici.....	30
<i>N,N</i> -dialchil-2-fenilindol-3-ilglicosilammidi.....	31
Probes Molecolari per la caratterizzazione dei recettori con tecniche chimico -fisiche:	
Ligandi Radioattivi e Ligandi Fluorescenti.....	34
PET e Radioligandi	35
Probes Fluorescenti	39
INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	44
PARTE SPERIMENTALE	52
Materiali e metodi	53
BIBLIOGRAFIA	59

Introduzione

Il sito periferico di legame per le benzodiazepine (Bz) fu identificato nel 1977 (1) e denominato recettore periferico delle benzodiazepine (PBR), per distinguerlo dal recettore centrale per le Bz (CBR).

Il recettore centrale per le benzodiazepine (CBR) è localizzato esclusivamente nel sistema nervoso centrale e fa parte di un complesso recettoriale sovramolecolare dove sono riconoscibili il sito di legame per l'acido γ -amminobutirrico (GABA) (2), il canale per il cloro e distinti centri di modulazione allosterica sensibili a diversi composti quali le Bz, i barbiturici, ecc...

Nel 2006 Papadopoulos (3) e collaboratori hanno attribuito al PBR il nuovo nome di Proteina Traslocatrice (18 KDa), abbreviato TSPO. Le ragioni che hanno portato a questo cambiamento sono state determinate dalle nuove scoperte riguardo la localizzazione, la struttura e il ruolo fisiologico di questa proteina. E' stato osservato infatti che :

1. il termine benzodiazepine è impreciso perché il PBR lega altre molecole come, ad esempio, il colesterolo e gli intermedi per la sintesi delle porfirine. Inoltre il PBR non lega tutte le benzodiazepine.
2. Il termine "periferico" non riflette la reale distribuzione tissutale del PBR in quanto è espresso anche nelle cellule gliali e ependimali che sono nel SNC.
3. Il PBR non presenta nemmeno una struttura recettoriale nel senso tradizionale del termine. E' stato quindi pensato di attribuire come nuovo nome TSPO, in riferimento alla principale funzione svolta da questa proteina, che è appunto quella del trasporto di molecole.
4. Il TSPO ha una elevata distribuzione in molti tessuti del corpo. Il cervello ed il fegato presentano livelli relativamente bassi di TSPO, mentre i tessuti e le ghiandole coinvolte nella sintesi degli steroidi ne sono particolarmente ricchi; nel cuore, polmone e rene la sua presenza è più moderata. Il TSPO, inoltre, è espresso in concentrazioni significative anche nel sistema immunitario e nelle varie sottopopolazioni di leucociti.

Il TSPO è una proteina evolutivamente conservata, di 18kDa, altamente idrofobica, costituita da 5 domini transmembranalni ed espressa principalmente nella membrana esterna mitocondriale. Alcuni studi hanno riportato l'espressione del TSPO sulla membrana plasmatica degli eritrociti e sulle membrane nucleari di cellule cancerose. Nei mitocondri il TSPO è ritenuto essere un costituente del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mitochondrial permeability transition pore, MPTP), dove si pensa sia intimamente associato in un complesso trimerico con il trasportatore dei nucleotidi adenosinici (ANT, 30 kDa) ed il canale anionico voltaggio dipendente (VDAC, 32 kDa) (**Figura 1**). Questo complesso costituisce un canale localizzato sui siti di contatto tra le membrane mitocondriali esterna ed interna.(3)

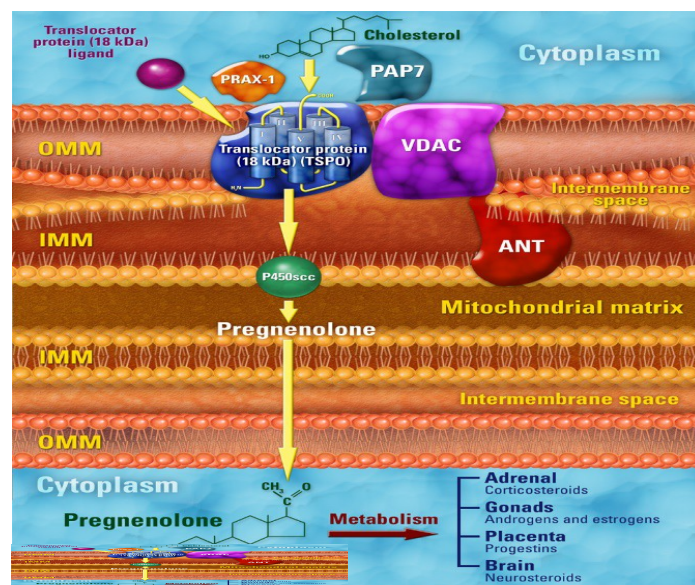


Figura 1. Proteina Traslocatrice (18kDa) (TSPO)^[4]

Fino ad oggi sono state identificate 4 proteine citoplasmatiche capaci di legarsi al TSPO (4) anche se la funzionalità di due di queste è ancora sconosciuta:

- PRAX-1, Peripheral Benzodiazepine Receptor-associated Protein 1, del peso di 240 kDa, costituita da 1857 aminoacidi;
- p10, una proteina di 10 kDa che co-immunoprecipita con il TSPO;

- Steroidogenic Acute Regulatory Protein (STAR) che lega il colesterolo e ne promuove il trasferimento mitocondriale;
- PAP7, che regola anch'essa la steroidogenesi.

Per quanto riguarda la proteina PRAX-1 è stato ipotizzato un modello di interazione con il TSPO. (4) Dati stechiometrici evidenziano che la PRAX-1, come monomero, si trova in associazione con più molecole (almeno due) di TSPO (18 kDa) che sono nelle sue vicinanze. La porzione della proteina TSPO accessibile per il legame con la PRAX-1 è probabilmente quella C-terminale, di 14 amminoacidi, esposta verso il lato citoplasmatico della membrana esterna mitocondriale. Il ruolo della PRAX-1 è ancora sconosciuto, ma si ritiene che questa sia coinvolta nel reclutamento di siti supplementari nelle vicinanze del TSPO in maniera tale da modularne le funzioni.

Il TSPO riveste un ruolo chiave nella funzionalità cellulare: ad esso viene riconosciuto un ruolo cruciale in funzioni quali la regolazione della proliferazione cellulare, trasporto di porfirine (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, emina), sintesi dell'eme, immunomodulazione, regolazione della steroidogenesi e apoptosi.

TSPO e regolazione della steroidogenesi.

La biosintesi degli steroidi inizia in tutti i tessuti steroidogenici con la conversione enzimatica del precursore colesterolo in pregnenolone. Tale conversione enzimatica è catalizzata dal citocromo P450, situato a livello della membrana mitocondriale interna (**Figura 2**). (4)

Il TSPO riveste un ruolo cruciale nel processo steroidogenico: quando viene attivato da un ligando (es. PK11195) lega il colesterolo e regola il suo trasporto dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna, aumentando la produzione di pregnenolone e la sintesi degli steroidi.

Il meccanismo ipotizzato si basa su un modello sperimentale di dinamica molecolare: il TSPO accoglierebbe nelle sue 5 eliche la molecola di colesterolo

formando un canale tramite il quale il colesterolo verrebbe trasportato attraverso la membrana.

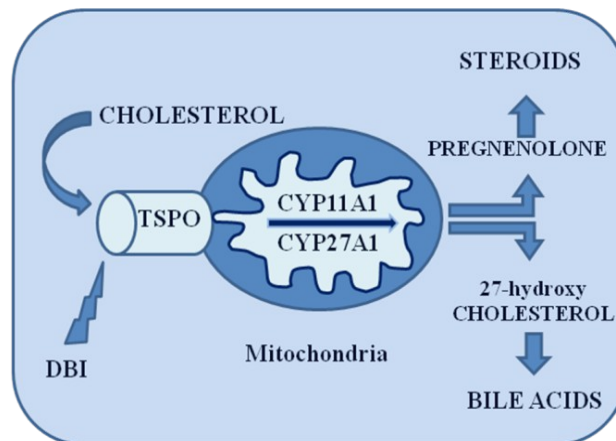


Figura 2. Metabolismo del colesterolo nelle cellule epatiche e steroidogeniche. Il colesterolo si lega al TSPO, nel sito di legame della proteina DBI (inibitore della benzodiazepina diazepam), promuovendo così l'ossidazione da parte del citocromo P450. Nelle cellule epatiche, il colesterolo viene idrossilato dal citocromo P450 (CYP27A1) per dare 27-idrossicolesterolo, mentre nelle cellule steroidogeniche, il colesterolo è scisso da un altro citocromo P450 (CYP11A1), per la formazione di pregnenolone.

E' stato inoltre osservato che i livelli sistemici di steroidi aumentano in seguito ad una lesione, ad un dolore o a febbre, in risposta alla stimolazione da parte di alcune citochine della secrezione del fattore di rilascio delle corticotropine. Il coinvolgimento del TSPO nella sintesi di steroidi può quindi contribuire a questo meccanismo difensivo.

Inoltre la relazione presente fra i bassi livelli di steroidi e l'ansia ha suggerito l'utilizzo del TSPO come un promettente target per il trattamento dei disturbi psichiatrici che sono correlati ad una disfunzione nella sintesi di steroidi.(4)

TSPO e apoptosi.

La cascata apoptotica che porta alla morte cellulare è stata ben caratterizzata e, in questo processo, l'evento critico iniziale risulta essere la dissipazione del potenziale transmembranale mitocondriale causata dall'apertura dell'MPTP-poro. L'aumentato volume nella matrice mitocondriale porta alla rottura delle altre membrane e al rilascio da parte dei mitocondri di proteine di intermembrana. Queste proteine includono il citocromo c e la flavoproteina AIF, il fattore di induzione dell'apoptosi. Quest'ultima trasloca nel nucleo dove induce condensazione della cromatina e frammentazione del DNA. Nel citosol il citocromo c interagisce con Apaf-1 (fattore attivante l'apoptosi) innescando le reazioni della caspasi che portano all'attivazione di un complesso di enzimi fondamentale nell'indurre il riarrangiamento strutturale del nucleo, del citoscheletro e della membrana plasmatica, caratteristici dell'apoptosi.(4)

Il TSPO è un modulatore endogeno di questo processo, ma l'esatto meccanismo non è ancora stato definitivamente chiarito. La sua regolazione può avvenire a diversi livelli e il meccanismo proposto include la modulazione dell'MPTP o la diretta interazione con molecole pro- o anti-apoptotiche. E' stato dimostrato che i ligandi per il TSPO modulano l'MPTP e la risposta apoptotica. PK11195 induce il rilascio mitocondriale di citocromo c e facilita l'induzione dell'apoptosi.

TSPO e immunomodulazione.

La presenza del TSPO in un gran numero di cellule immunomodulatorie come la microglia, i monociti del sangue, i linfociti e i leucociti, ha portato a pensare ad un suo coinvolgimento nella risposta immunitaria; tuttavia, il meccanismo attraverso il quale ciò avviene è ancora sconosciuto. I macrofagi presentano molti siti di legame TSPO e, in studi effettuati sui topi si è osservato che le benzodiazepine inibiscono la capacità dei macrofagi di produrre ROS e alcune citochine infiammatorie come ad esempio IL-1, TNF- α e IL-6.

Inoltre, il TSPO è coinvolto nel metabolismo ossidativo ad opera dei fagociti, processo necessario per eliminare definitivamente antigeni esterni. La funzione immunosoppressiva di alcuni ligandi che vanno ad interagire con il TSPO ha dimostrato l'importante ruolo rivestito da questa proteina nella risposta infiammatoria. Nel SNC il TSPO è espresso prevalentemente nelle cellule microgliali. L'attivazione della microglia dà inizio ad una risposta infiammatoria che può esacerbare la perdita neuronale in varie malattie infiammatorie neurodegenerative, come ad esempio l'Alzheimer.

Poiché si è osservata una sovraespressione di TSPO nella microglia attivata, si è pensato che l'infiammazione presente a livello cerebrale durante le patologie neurodegenerative coinvolga tale proteina. Si presenta così la possibilità di utilizzare ligandi specifici per il TSPO al fine di prevenire o limitare la neuroinfiammazione. Tuttavia il coinvolgimento della microglia attivata in varie patologie del SNC è differente a seconda della gravità della patologia e del ruolo che la microglia svolge nella progressione della stessa. E' plausibile quindi ipotizzare che, attraverso l'utilizzo del TSPO come marker di tali cellule, sia possibile determinare con esattezza quale ruolo la neuroinfiammazione gioca in specifiche condizioni patologiche che coinvolgono il SNC, aprendo così le porte alla cura o alla limitazione della progressione della malattia.(6)

Alterazione dei livelli di espressione del TSPO.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'espressione del TSPO risulta alterata in numerosi stati fisiologici e patologici.

TSPO e Cancro

Una elevata espressione di tale recettore è stata riscontrata nelle cellule e nei tessuti neoplastici dell'ovario, nell'adenocarcinoma, nel carcinoma del fegato, del colon e nei gliomi. Questo aumento dell'espressione del TSPO è correlabile con il grado di aggressività della forma tumorale.

Il monitoraggio dell'espressione di tale recettore, dunque, può essere una procedura rilevante in clinica per diagnosticare e/o seguire la progressione della patologia.

TSPO e Infezioni Virali

L'attività del TSPO sembra comprendere anche la modulazione della risposta cellulare nelle **infezioni virali**. Una delle strategie adottate dai virus per aggirare i meccanismi protettivi della cellula contro le infezioni, è quella di bloccare il processo di **apoptosi**. Molteplici studi hanno dimostrato che diversi virus patogeni utilizzano proprio il TSPO come target per mettere in atto il blocco dell'apoptosi. Questa scoperta offre quindi numerose prospettive per nuove strategie antivirali.

TSPO e Stress

L'attività del TSPO risulta implicata anche nello **stress**. Infatti la sua attivazione durante l'esposizione acuta ad agenti stressogeni può essere vista come una predisposizione neuronale e metabolica per un migliore adattamento allo stress. Una **down-regulation** di tale recettore è stata al contrario osservata in pazienti affetti da ansia, da stress post traumatico e stress cronico. (4)

TSPO e Malattie Neurovegetative

Il TSPO è sovraespresso anche nelle cellule microgliali attivate ed in generale nelle aree in cui è in corso una significativa risposta infiammatoria. Una **up-regulation** della proteina è osservabile anche in vari disturbi neurodegenerativi come ad esempio il morbo di Alzheimer e di Huntington, e nella sclerosi multipla. (3,4)

La comprensione dei meccanismi attraverso i quali il TSPO modula le risposte cellulari, costituisce la base razionale per un uso terapeutico dei ligandi di tale recettore. D'altro canto, l'osservazione che l'espressione di tale proteina risulta alterata in numerose fatto si che il TSPO suscitasse un notevole interesse come possibile target diagnostico.

TSPO e ligandi endogeni.

Una grande varietà di molecole endogene mostra alta affinità per il TSPO.

Una delle prime molecole identificate, isolata sia a livello centrale che nei tessuti periferici (ghiandola surrenale, rene e testicoli), è un residuo di neuropeptide di 11 kDa composto da 86 amminoacidi che inibisce il legame del diazepam con il sito recettoriale delle Bz, chiamato “inibitore del legame del diazepam (DBI)”.

Oltre a questa molecola e ai suoi metaboliti, sono stati isolati altri ligandi endogeni come le porfirine (protoporfirina IX, mesoporfirina IX ed emina) e il colesterolo.

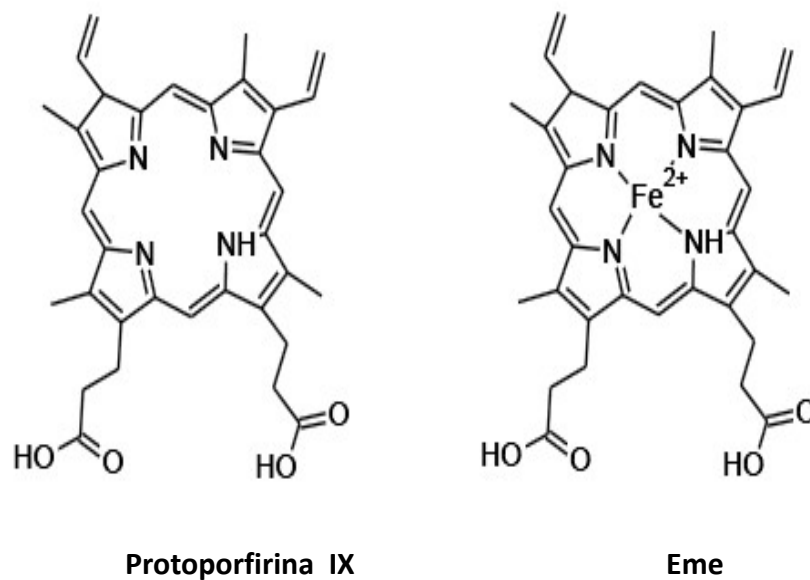


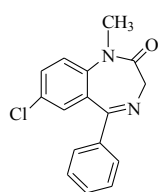
Figura 3. Strutture chimiche della Protoporfirina IX e Heme

TSPO e ligandi sintetici.

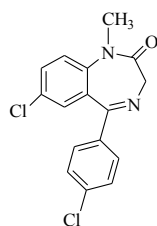
Le principali classi di ligandi sintetici descritti in letteratura sono ^(4,6) **(Figura 4)**:

- ³⁵₁₇ benzodiazepine (es. diazepam, Ro5-4864)
- ³⁵₁₇ derivati isochinolin- e chinazolin-carbossamidici (es. PK11195)
- ³⁵₁₇ benzotiazepine (es. THIA-66, THIA-67, THIA-4i)
- ³⁵₁₇ benzoxazepine (es. Oxa-17f, Oxa-17j)
- ³⁵₁₇ derivati fenossi fenil-acetamidici (DAA1106)
- ³⁵₁₇ midazopiridine (Alpidem)
- ³⁵₁₇ derivati indolacetamidici (FGIN-1, SSR180575)
- ³⁵₁₇ pirazolopirimidine (DPA713)
- ³⁵₁₇ N,N-dialchil -2-fenilindol-3-ilgliossilammidi.

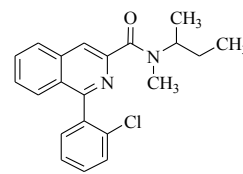
Tutti questi ligandi, che mostrano un'alta affinità di legame per il TSPO, con valori di K_i nell'ordine del nanomolare, sono stati utilizzati come strumenti farmacologici di ricerca per caratterizzare le proprietà e le funzioni del TSPO.



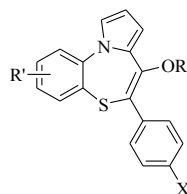
Diazepam



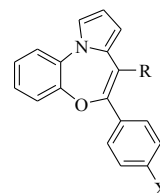
Ro 5-4864



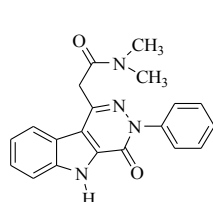
PK 11195



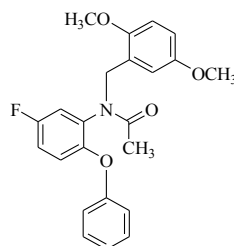
THIA-66: R=COCH₃, R'=H, X=OCH₃
THIA-67: R=SO₂CH₃, R'=H, X=OCH₃
THIA-4i: R=CON(Et)₂, R'=4-Cl, X=H



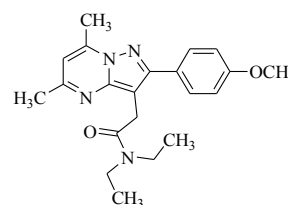
OXA-17f: R=OCON(Et)₂, X=H
OXA-17j: R=OCON(Et)₂, X=CH₃



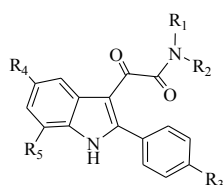
SSR 180575



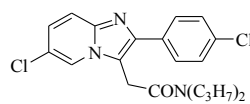
DAA 1106



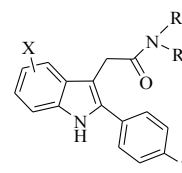
DPA 713



IND-18: R₁=R₂= n-C₆H₁₃, R₃=F, R₄=H



Alpidem



FGIN-1
FGIN-1-27: R₁=R₂= n-C₆H₁₃; R₃=F

I ligandi FGIN-1-27 e PK11195 hanno mostrato, in vitro, attività antitumorale, inducendo l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare in linee cellulari di cancro esofageo, colon-rettale e in colture primarie di cancro.

L'ipotesi che il TSPO partecipi allo sviluppo della malattia è supportata dalla sua localizzazione anche a livello nucleare e perinucleare in alcune linee cellulari cancerose: in questa sede il recettore regolerebbe la proliferazione cellulare facilitando il trasporto del colesterolo nel nucleo.

Inoltre studi di imaging diagnostico non invasivo, mediante l'utilizzo di ligandi marcati per il TSPO ($[^3\text{H}]$ PK11195), hanno fornito dati di notevole interesse nella visualizzazione dei tumori in test come la tomografia a emissione di positroni (PET). Ligandi come il Ro5-4864 ed il PK11195 limitano la gravità e la progressione di diversi processi infiammatori. Ciò è stato dimostrato utilizzando questi ligandi in studi sperimentali come il test della carragenina e nella terapia di patologie infiammatorie (infiammazione e iperplasia sinoviale, degenerazione del tessuto osseo e cartilagineo). SSR180575 è risultato efficace nella terapia dell'artrite reumatoide. Ulteriori sperimentazioni hanno dimostrato l'efficacia del SSR180575 e del PK11195 nella terapia del Lupus erythematosus (patologia autoimmune).⁽⁴⁾

Recentemente è stata sintetizzata una nuova classe di farmaci, le pirazolopirimidine, affini e selettive per il TSPO ed in particolare il composto DPA713, in grado di aumentare la steroidogenesi dell'80% rispetto ai livelli fisiologici. È stato osservato che i livelli sistemici di steroidi risultano significativamente aumentati a seguito di una lesione, di un dolore o di una febbre, a causa della stimolazione da parte di alcune citochine sulla secrezione del fattore di rilascio delle corticotropine. L'utilizzo di ligandi in grado di interagire con il TSPO e stimolare la sintesi di steroidi può quindi contribuire ad una risposta difensiva e anti-infiammatoria. Altri ligandi in grado di stimolare la sintesi di steroidi sono i derivati fenossifenilacetamidici (DAA1106).^[6]

Come descritto in precedenza, a livello cerebrale il TSPO è localizzato principalmente nelle cellule gliali. È stato riscontrato un elevato aumento della sua densità in caso di lesioni o situazioni patologiche a livello del sistema nervoso centrale, in modo particolare negli stati acuti e cronici di patologie neurodegenerative. Da ciò è nata l'ipotesi che la regolazione delle funzioni del TSPO possa avere un ruolo neurotrofico e neuroprotettivo nelle lesioni neuronali. I risultati sperimentali hanno suggerito che l'espressione del TSPO poteva essere regolata da segnali provenienti da assoni in via di rigenerazione. Un recente studio ha dimostrato come il ligando SSR180575 manifesti proprietà neuroprotettive in diversi modelli di patologie degenerative

progressive del sistema nervoso centrale e periferico. Precisamente sia il ligando SSR180575 che il Ro5-4864 promuovono la sopravvivenza del neurone e la riparazione successiva ad assotomia. I meccanismi ipotizzati per tale azione sono:

- (i) regolazione del processo apoptotico che favorisce la sopravvivenza delle cellule gliali;
- (ii) produzione di mediatori come neurosteroidi, citochine o altri fattori neurotrofici che supportano la sopravvivenza del nervo.

Benzodiazepine

Il diazepam, che rappresenta la benzodiazepina classica, è stata a lungo utilizzata come ansiolitico e come efficace anticonvulsivante. La sua capacità di aumentare l'affinità del GABA per il suo recettore legandosi ad uno specifico sito modulatorio è stata ben caratterizzata.

Nel 1977, Braestrup e Squires (1) durante uno studio sulle proprietà di legame del [³H]Diazepam, hanno individuato un alternativo, saturabile e specifico sito di legame che si trova sulle membrane del cervello e sulle frazioni mitocondriali di rene, fegato e polmoni di ratto. (7) Partendo da questa scoperta, i siti di legame per le benzodiazepine sono stati suddivisi in 2 tipi, siti centrali (CBR) e siti periferici (TSPO). Il Diazepam si lega con affinità simile ad entrambi i recettori, ma altri derivati benzodiazepinici mostrano una maggior selettività.

La benzodiazepina Ro5-4864 (4'-clorodiazepam), clinicamente inattiva, mostra un'elevata affinità per il TSPO, ed è incapace di spiazzare il [³H]Diazepam dal sito di legame centrale. Il principale svantaggio del Ro5-4864 è la sua dipendenza dalla specie, che determina risultati nettamente differenti tra ratti e uomini, limitando il suo utilizzo a solo strumento di studio del TSPO. (8)

Derivati Isochinolin- e chinazolin-carbossammidici

L' isochinolincarbossammide PK11195 è stato il primo composto di tipo non-benzodiazepinico ad essere risultato capace di legare il TSPO con un'elevata potenza, ed oggi è lo standard più comunemente utilizzato per questo recettore. Alla fine degli anni '90, era (insieme ad una serie di analoghi strutturalmente correlati) ampiamente utilizzato per studi rivolti a definire e mappare il sito di legame.

Cappelli ed il suo gruppo di ricerca, hanno progettato una serie di derivati conformazionalmente correlati al PK11195 per studiare il loro legame all'interno del sito del TSPO (**II-IX, figura 5**).⁽⁹⁾ La maggior parte di questi derivati ha mostrato un'affinità di legame per il TSPO nel range del nanomolare, (**tabella 1**). E' stato confermato che la funzione carbonilica risulta essere l'elemento farmacoforico primario per il riconoscimento del TSPO. I ligandi con maggior affinità (**III-V, VII-IX**) sono caratterizzati da un ristretto range di orientamento del carbonile (compreso tra 80° e 110°), suggerendo così il coinvolgimento di questa porzione nella formazione di legami a idrogeno con determinati amminoacidi della proteina recettoriale.

Studi quantitativi di relazione struttura-attività (QSAR) hanno evidenziato che i derivati portanti un'ammide secondaria mostrano una affinità per il TSPO più bassa rispetto ai derivati portanti un'ammide terziaria, e sostituenti come il gruppo benzilico ed il sec-butilico sono risultati ottimali per l'interazione col recettore. Anche l'anello fenilico pendente ha una funzione farmacoforica essenziale.

Alcuni anni dopo, lo stesso gruppo ⁽¹⁰⁾ di ricerca ha studiato la radiomarcatura di tre derivati chinolinici (**N-[¹¹C]-III, N-[¹¹C]-IV, N-[¹¹C]-V**), con l'obiettivo di sviluppare potenziali strumenti per una valutazione non-invasiva del TSPO *in vivo* mediante PET, in diverse condizioni patologiche tra le quali sclerosi multipla, glioma umano, infarto cerebrale e anomalie dei canali del calcio nelle malattie cardiache.

Da questi studi è risultato di particolare interesse il derivato **N-[¹¹C]-V** per l'imaging *in vivo* del TSP0, grazie alla sua specificità di legame, come indicato dall'alta riduzione dell'uptake del radioligando osservato nello studio di inibizione con PK11195 freddo nella ripartizione sangue-tessuto. La valutazione di questi ligandi nella misurazione *in vivo* dell'espressione del TSP0 in un modello preclinico nella malattia di Huntington, ha indicato che **N-[¹¹C]-V** è un candidato promettente per monitorare i processi neurodegenerativi *in vivo* con la PET.

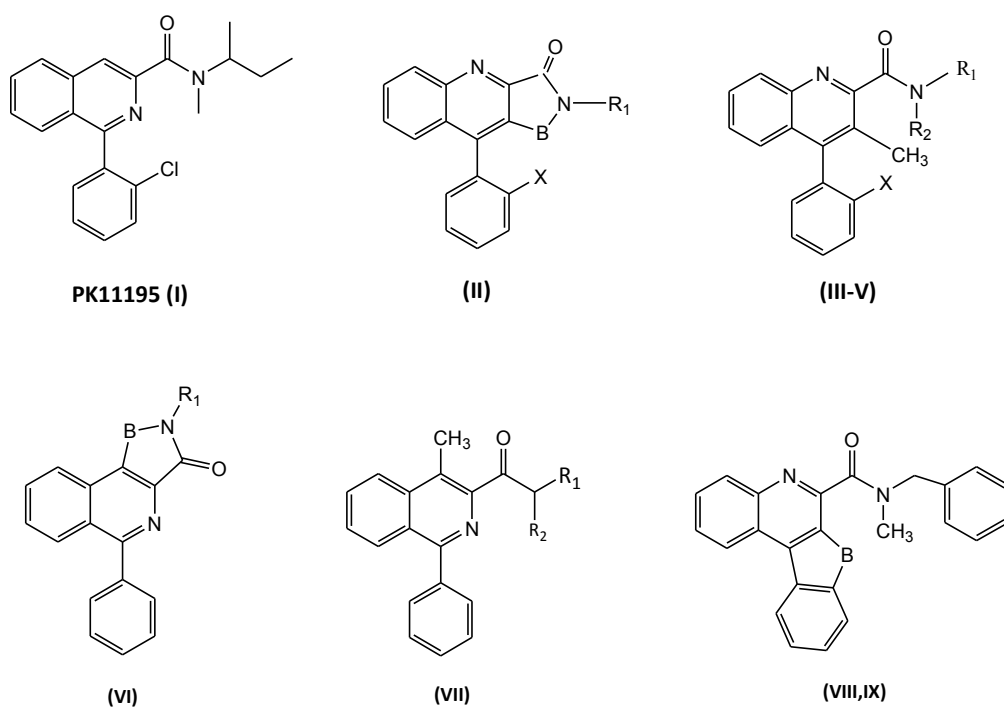


Figura 5.

Tabella 1. Strutture e affinità per il TSPO del PK11195 come composto II-IX.

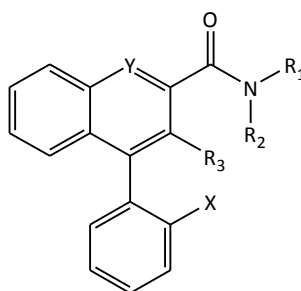
Composti	Ponte(B)	X	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM) ^a
I ^b	-	-	-	-	2.2
II ^b	CH ₂	H	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-	>10 ⁴
III ^b	-	H	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH ₃	2.1
IV ^b	-	F	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH ₃	2.9
V ^b	-	H	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	2.1
VI ^b	CH ₂	-	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-	620
VII ^b	-	-	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	3.1
VIII ^b	CH ₂ CH ₂	-	-	-	8.9
IX ^b	OCH ₂ CH ₂	-	-	-	10

^aAffinità di legame inibitorio di [³H]PK11195 nella corteccia del ratto. ^bDati presi da rif.9

Incoraggiati da questi risultati, sono stati effettuati ulteriori studi fra i derivati chinolincarbossamidici, con lo scopo di ottimizzare l'interazione con il TSPO e sviluppare nuovi candidati per studi con la PET.(11)

E' stata così sintetizzata una nuova serie di composti con lo scopo di ottenere un ligando per il TSPO adatto ad essere poi marcato con diversi radionucleidi e potenzialmente utile nella terapia a cattura di neutroni del boro (BNCT). Tra i nuovi composti, le ammidi terziarie portanti un gruppo clorometilico o 2-fluorofenilico (**XI-XIII**) hanno mostrato un'affinità subnanomolare per il TSPO e si sono mostrate più potenti del composto di riferimento PK11195, risultando quindi interessanti per la radiomarcatura, **tabella 2**.

Inoltre, la potente attività dei composti **XI-XII** nello stimolare la biosintesi steroidea ha dimostrato che questi derivati chinolincarbossamidici sono in grado di raggiungere ed interagire con il TSPO *in vivo* e stimolare il trasporto di colesterolo sia nel cervello che nei mitocondri dei tessuti periferici.

Tabella 2. Strutture e affinità per il TSPO dei composti **X-XIV**.**(X-XIV)**

Composti	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (nM) ^a
X	H	N	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	4.6
XI	F	N	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	2.2
XII	H	N	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	11
XIII	H	N	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₂ Cl	0.45
XIV	H	N	CH ₂ C(B ₁₀ H ₁₀)CH	CH ₃	CH ₃	73

^aDati presi dal rif. 11

Come estensione delle SAR sui ligandi per il TSPO strutturalmente correlati al PK11195, Anzini ed il suo gruppo di ricerca, hanno progettato una serie di derivati carbossamidici dotati di sistemi aromatici o eteroaromatici planari diversamente sostituiti.⁽¹²⁾ L'obiettivo principale era quello di ottenere ulteriori informazioni sui requisiti topologici del carbonile e sulle porzioni aromatiche per l'interazione con il TSPO. E' stata quindi progettata e testata una nuova serie di composti (**XV-XIX**, **Figura 6**). La maggior parte di questi derivati ha mostrato affinità per il TSPO nel range submicromolare.

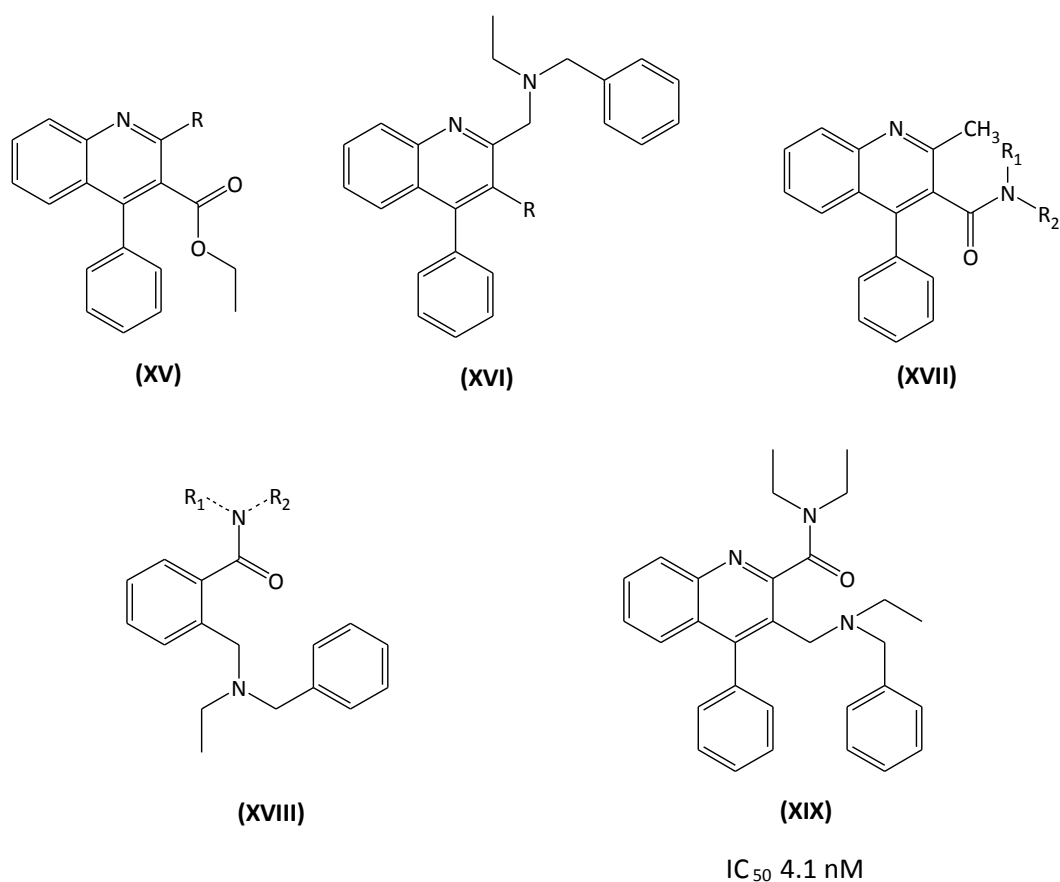


Figura 6. Strutture dei derivati carbossamidici (XV-XIX).

Le informazioni ottenute hanno quindi permesso di individuare i requisiti strutturali fondamentali per l'interazione con il TSPO:

- (i) la presenza di un dipolo carbonilico opportunamente posizionato e orientato;
- (ii) sostituenti lipofili in posizione 2;
- (iii) la presenza di un sistema biciclico aromatico o etero-aromatico portante un anello pendente fenilico adeguatamente collocati.

Inoltre, la posizione 3 del nucleo chinolinico sembra interagire con una zona del sito del TSPO capace di tollerare sostituenti ingombranti (**Figura 7**).

Il composto più potente tra quelli di nuova sintesi, **XIX**, ha mostrato un'affinità nanomolare per il TSPO (IC₅₀ 4.1 nM) simile a quella del PK11195. Inoltre, la presenza di un gruppo basico *N-etil-N-benzilamminoetilico* in posizione 3 del nucleo chinolinico, conferisce al composto **XIX** la possibilità di formare sali solubili in acqua.

L'alta affinità di questo composto ha suggerito che il sito di legame del TSPO sembra tollerare bene la carica positiva portata presumibilmente sull'azoto amminico terziario a pH fisiologico.

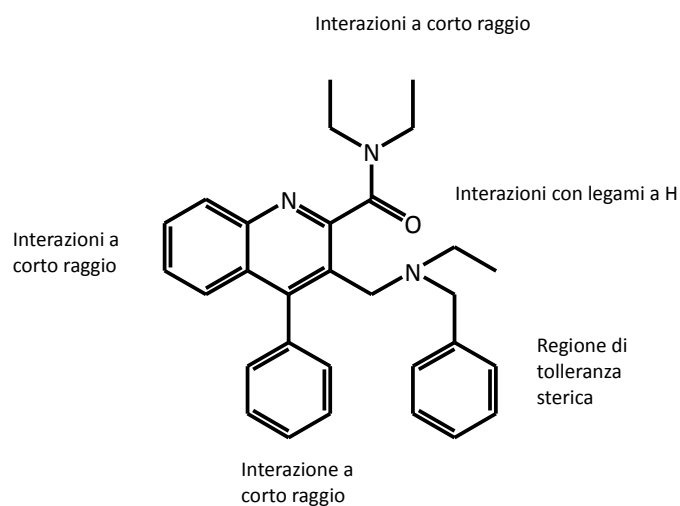


Figura 7. Rappresentazione dello schema di interazione del composto XIX con il sito di legame^[12] del TSPO.

Con l'obiettivo di identificare un nuovo chemiotipo per i ligandi al TSPO, sono stati sintetizzati una serie di derivati chinazolincarbossammidici. Sebbene strutturalmente correlati alla isochinolincarbossammide PK11195, questi derivati chinazolinici dovrebbero avere un miglior carattere drug-like, avendo una maggior idrofilicità e potenziale solubilità in acqua rispetto ai derivati isochinolincarbossammidici che, al contrario, risultano piuttosto lipofili. Infatti, calcoli preliminari di diversi parametri fisico-chimici e farmacocinetici condotti sulle strutture del PK11195 e del suo aza-isostero supportano queste ipotesi.

Tenendo conto dei requisiti strutturali necessari per ottenere un'alta affinità e selettività per il TSPO, sono stati sintetizzati (13) numerosi composti portanti diverse combinazioni di sostituenti R₁-R₅. In particolare, sono state sintetizzate strutture chinazoliniche-N,N-disostituite simmetricamente o asimmetricamente con catene lineari, ramificate, alchiliche o alicicliche. Inoltre, per valutare l'importanza di una

doppia sostituzione sull'azoto ammidico per conferire un'elevata affinità per il TSPO, sono stati studiati alcuni derivati *N*-monosostituiti. Infine, un atomo di cloro è stato inserito in differenti posizioni (2', 4', 6') dello scaffold 4-fenil-chinazolinico.

Tutti i nuovi composti sono stati testati per la loro affinità al TSPO in membrane di rene di ratto. Le SAR sono state razionalizzate alla luce del modello farmacoforico di interazione ligando-TSPO precedentemente pubblicato (**Figura 8**),(14,15) permettendo di definire i principali requisiti strutturali per un'interazione ottimale con la proteina bersaglio, che sono:

- (i) una *N,N*-disostituzione sulla porzione carbossiammidica;
- (ii) almeno uno dei due gruppi *N*-alchilici con un numero di atomi di carbonio compreso tra 4 e 6.

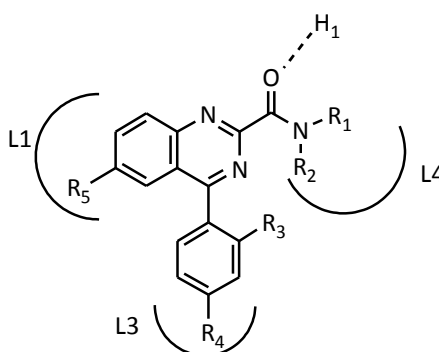


Figura 8. Struttura generale dei derivati chinazolin carbossammidici.

Benzotiazepine

I ligandi benzotiazepinici, tra cui THIA-66 e THIA-67, (**Figura 4**) mostrano un'affinità nel range nanomolare e una notevole selettività per i siti di legame del TSPO; tuttavia, risultano meno potenti del PK11195. Ad oggi, il THIA-4i è riportato come il ligando più potente di questa classe per il TSPO con un'affinità paragonabile a quella del PK11195. Sebbene questi ligandi possono essere usati come sonde utili per studi *in vitro*, è necessaria un'ulteriore valutazione per chiarire il loro profilo farmacologico *in vivo*.(16)

Benzossazepine

Le benzossazepine (**Figura 4**) sono state sintetizzate sulla base dello scheletro pirrolo-benzossazepinico. È stata valutata poi la capacità di questi ligandi di spiazzare [³H]PK11195 dal sito recettoriale. Un certo numero di questi composti hanno valori di K_i nel range subnanomolare. I composti OXA-17f e OXA-17j sono riportati come i più potenti ligandi per il TSPO di questa classe con valori di K_i compresi tra 0.26 e 0.36 nM, rispettivamente al valore di K_i di 0.78 nM del PK11195, nello stesso saggio. Tutti questi composti benzodiazepin-simili hanno dimostrato di essere in grado di stimolare la produzione di neurosteroidi, con una potenza simile al PK11195 e al Ro5-4864 nelle cellule adrenocorticali Y-1 del topo.(16)

Imidazopiridine e fenossifenil-acetammidi

L'Alpidem (6-cloro-2-(4-cloro-fenil)-*N,N*-dipropilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-acetamide) (**Figura 4**) è considerato il capostipite della classe delle imidazopiridine. Questo composto è in grado di legarsi sia al TSPO e che al CBR con affinità nanomolare (rispettivamente K_i 0.5-7 nM e 1-28 nM).

L'Alpidem possiede attività ansiolitica con un profilo che è sostanzialmente diverso da quello delle benzodiazepine. L'Alpidem è stato immesso in commercio nel 1991 (Ananxyl[®], Sanofi-Aventis) come agente ansiolitico ad alta attività, generalmente prescritto a pazienti con uno stato di ansia da moderata a grave, in particolare in casi di una marcata sensibilità o resistenza alla terapia con le benzodiazepine. L' Ananxyl[®] è stato ritirato dal mercato nella maggior parte del mondo, a seguito di segnalazioni di grave tossicità epatica. (8)

Nel 1997, Trapani ed il suo gruppo di ricerca ha descritto un ampio studio delle SAR dell'Alpidem, sviluppando una serie di derivati 2-fenilimidazo[1,2- α]piridinici (CB) che hanno mostrato diversi gradi di affinità e selettività per il TSPO rispetto al CBR,

relativamente al valore di n e alla natura dei vari sostituenti R_1 , R_2 , X , Y , Z , (17) (**Figura 9**).

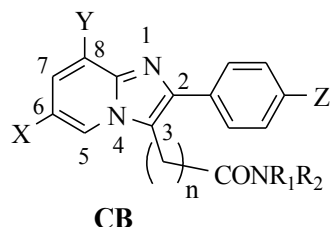


Figura 9. Formula generale dei derivati 2-fenilimidazo[1,2-*a*]piridinici (CB).

Tre composti di questa serie, *N,N*-di-*n*-propil-[2-(4-clorofenil)-6,8-dicloroimidazo[1,2-*a*]piridin-3-ilacetammide CB34, *N,N*-di-*n*-propil-[2-fenil-6,8-dicloroimidazo[1,2-*a*]piridin-3-ilacetammide CB50, and *N,N*-di-*n*-propil-[2-fenil-6-bromo-8-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-ilacetammide CB54 sono stati studiati per la loro capacità di stimolare la steroidogenesi centrale e periferica e di produrre un'azione anti-conflitto nei ratti, (20)(**Figura 10**).

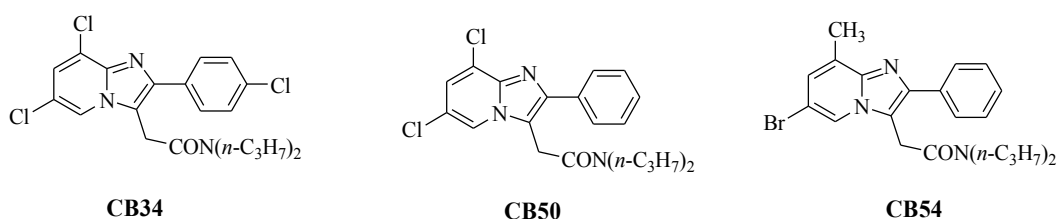


Figura 10. Imidazopiridine testate *in vivo* come ansiolitici

Negli esperimenti *in vitro* in membrane di corteccia cerebrale, tutti e tre i composti inibiscono fortemente il legame di [3 H]PK11195 nell'ordine CB34 (IC_{50} 1.03 nM) > CB54 (IC_{50} 1.54 nM) > CB50 (IC_{50} 3.04 nM), senza influenzare il legame di [3 H]flunitrazepam al CBR.

La somministrazione intraperitoneale di composti CB nei ratti ha provocato un significativo aumento dose-dipendente delle concentrazioni di steroidi neuroattivi, come pregnenolone, progesterone, allopregnanolone e

allotetraidrodeossicorticosterone (THDOC) nel plasma e nel cervello. L'effetto di questi ligandi sulla concentrazione dei neurosteroidi è attribuibile all'aumento della steroidogenesi nel cervello, piuttosto che da fonti periferiche.

In questa prospettiva, il CB34 sembrava essere un composto promettente, visto che in qualità di agonista del TSPO, aumentava la concentrazione di steroidi neuroattivi; si è inoltre dimostrato utile per il trattamento di disturbi da stress e ansia.(8)

Nel 2004, il gruppo di ricerca di Nakazato della Taisho Pharmaceutical Co. ha descritto una nuova classe di ligandi selettivi per il TSPO che derivano da una semplificazione della struttura biciclica della benzodiazepina Ro5-4864, che consiste nell'apertura dell'anello della diazepina. I risultanti derivati fenossifenilacetamidici con formula generale DAA, sono stati sintetizzati e valutati per la loro affinità e selettività per il TSPO in un ampio studio SAR (18) (**Figura 11**).

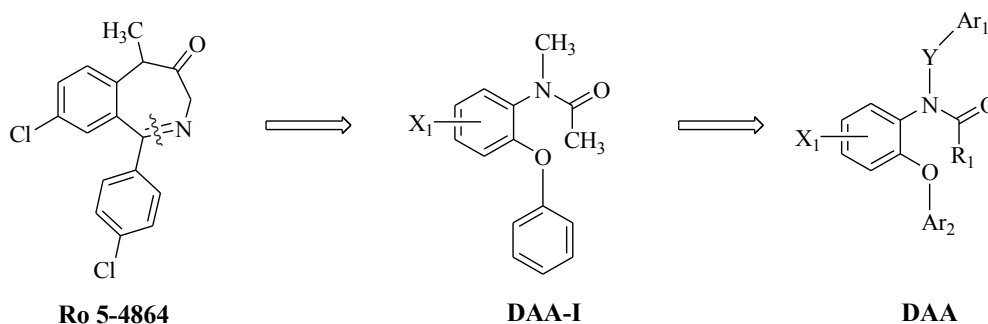


Figura 11. Strutture dei derivati DAA a partire da Ro5-4864.

Modificando i sostituenti Ar_1 , Ar_2 , R_1 , X_1 e Y sono stati ottenuti molti composti con notevole affinità e selettività, e sono state definite le più importanti caratteristiche strutturali di questa classe di composti per il legame al TSPO.

Due derivati fenossifenilacetamidici, *N*-(2,5-dimetossibenzil)-*N*-(5-fluoro-2-fenossifenil)acetammide (DAA1106) e *N*-(4-cloro-2-fenossifenil)-*N*-(2-isopropossibenzil)acetammide (DAA1097), (**Figura 12**), sono stati caratterizzati per il

loro legame al recettore, per il loro profilo comportamentale, nonché per il loro effetto sulla steroidogenesi.

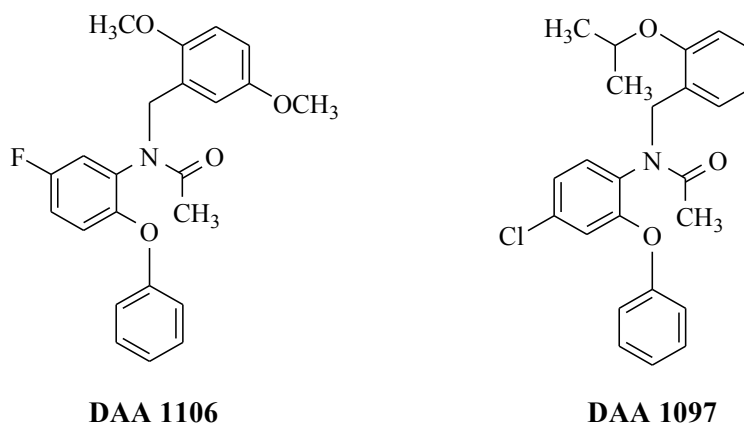


Figura 12. Struttura dei derivati DAA1106 e DAA1097.

Sia il DAA1106 che il DAA1097 inibiscono il legame di [³H]PK11195 e [³H]Ro5-4864 in preparati mitocondriali del cervello di ratto con valori di IC₅₀ nel range subnanomolare (rispettivamente di 0.92 e 0.28 nM, 0.64 e 0.21 nM). (19)

Questi composti sono anche risultati altamente selettivi in quanto non inibiscono il legame di [³H]flunitrazepam al CBR (IC₅₀ > 10000 nM) nella stessa preparazione, e hanno dimostrato una debole o trascurabile affinità (IC₅₀ valori approssimati 10000 nM) per altri 58 recettori, compresi quelli per neurotrasmettitori correlati, canali ionici, uptake/trasportatori e secondi messaggeri.

In un altro studio, lo stesso gruppo di ricerca ha eseguito una esaustiva caratterizzazione del legame di DAA1106 nelle frazioni mitocondriali del cervello di ratto mediante il suo analogo triziato. Il legame del [³H]DAA1106 si è rivelato saturabile, con una costante di dissociazione (K_d) di 1.2 nM. Il legame è stato inibito da diversi ligandi del TSPO in un ordine simile a quello osservato per il [³H]PK11195, con DAA1106 che è risultato essere il più potente inibitore.

Inoltre, il [³H]DAA1106 è altamente selettivo per il TSPO, essendo il suo legame non influenzato da diversi composti neurotrasmettitori correlati, tra cui adrenergico,

GABA, dopamina, 5-idrossitriptamina (5-HT), acetilcolina, istamina, glutammato e ligandi al CBR anche ad una concentrazione di 10 μ M.

Quando testato sulle frazioni mitocondriali di corteccia cerebrale di scimmia, [³H]DAA1106 ha mostrato una elevata affinità per il TSPO (Kd 0.426 nM), ed il suo legame risulta inibito da DAA1106 e PK11195, ma non da Ro5-4864, anche ad una concentrazione 1 μ M.

I risultati hanno indicato che questo ligando non era specie dipendente, similmente al PK11195 e contrariamente al Ro5-4864.

Studi autoradiografici e biochimici sul cervello di ratto hanno mostrato che la maggior zona di legame di [³H]DAA1106 è localizzata nel bulbo olfattivo e nelle strutture ventricolari correlate alla secrezione del fluido cerebrospinale (plesso corioideo), seguito dal cervelletto e dalla corteccia cerebrale. (8)

Negli studi *in vivo*, DAA1106 e DAA1097 hanno dimostrato potenti proprietà ansiolitico-simili negli animali da laboratorio, sia nel light/dark test nei topi sia nel plus-maze test per i ratti.(20) Anche se questi due composti fenossifenilacetamidici hanno struttura simile, e si legano potentemente al TSPO esercitando effetti ansiolitici, i loro effetti sulla steroidogenesi sembravano essere opposti. Culty e colleghi (21) hanno esaminato gli effetti di questi due ligandi in base alla risposta steroidea, utilizzando cellule tumorali di Leydig MA-10, cellule di glioma C6-2B e mitocondri cerebrali di ratto. È stato osservato che il DAA1097 attiva la steroidogenesi in modo simile a quello descritto per il PK11195 in tutti e tre i preparati, ed è più efficiente nel cervello che nelle cellule di Leydig. Sorprendentemente, il DAA1106 non attiva la steroidogenesi, nonostante la sua alta affinità per il TSPO. È stato suggerito che i siti di DAA1097 e di DAA1106 per il TSPO condividano un dominio con quello del PK11195, ma sembrano anche interagire con un dominio addizionale che non interagisce in modo efficiente con il PK11195.

Il diverso effetto sulla steroidogenesi è stata razionalizzato ipotizzando che, il legame di DAA1097 induce cambiamenti nel recettore simili a quelli innescati dal PK11195, consentendo l'attivazione della steroidogenesi. Al contrario, il legame con DAA1106

porta a cambiamenti conformazionali che non permettono o antagonizzano la funzione steroidea del TSPO.

Pirazolopirimidine

Le pirazolopirimidine (**Figura 4**) sono bioisosteri dei derivati imidazopiridinici e sono perciò strutturalmente correlate all'Alpidem. Saggi di binding su membrane di tessuto renale di ratto usando il [³H]PK11195 come radioligando hanno dimostrato che un sottoinsieme di ligandi di questa serie pirazolopirimidinica mostra un'alta affinità di legame (K_i) per il TSPO con un range compreso tra 0.8-6.1 nM.

Alcuni di questi composti sono in grado di stimolare, nelle cellule C6 di glioma di ratto, la biosintesi degli steroidi ed alcuni sono anche in grado di aumentare la sintesi di pregnenolone con una potenza simile a Ro5-4864 e PK11195.(22)

Derivati Indolacetamidici

I derivati indolacetamidici, altamente selettivi per il TSPO, si sono dimostrati capaci di aumentare la steroidogenesi. Il composto principale di questa classe è *N,N*-di-*n*-esil-2-(4-fluorofenil)indolo-3-acetammide (FGIN-1-27,(23) **Figura 4**). FGIN-1-27 ha un'alta affinità (K_i 5.0 nM) ed è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. E' stato inoltre dimostrato anche che il composto FGIN-1-27, somministrato per via endovenosa, è in grado di indurre sedazione e atassia a dosi micromolari. Le azioni farmacologiche di questo composto sono, molto probabilmente, dovute alla sua azione indiretta sui recettori del GABA attraverso la stimolazione della produzione di neurosteroidi. (16)

Studi di SAR hanno permesso agli Autori di individuare le caratteristiche strutturali essenziali dei derivati FGIN-1 per il legame al TSPO:

- (i) la presenza di due gruppi alchilici sull'azoto ammidico ;
- (ii) la lunghezza delle catene alchiliche, con il gruppo *N,N*-di-*n*-esilico che conferisce un'ottima affinità, venti volte superiore rispetto ai corrispondenti analoghi *N,N*-dimetilici.
- (iii) l'alogenazione del gruppo pendente 2-arilico e dell'anello indolico benzofuso (X e $R_3 = Cl, F$).

Importanti studi di screening rilevano che questi derivati FGIN-1 sono altamente selettivi per il TSPO e che non sono in grado di legarsi, con alcuna affinità significativa ($K_i > 1000$ nM), ad altri sistemi recettoriali, compresi quelli di GABA_A, GABA_B, glicina, glutammato, dopamina, serotonina, oppiacei, colecistochinina, beta adrenergici, cannabinoidi, e recettori sigma.(8)

Un altro ligando altamente affine per il TSPO, con struttura simile, è il 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-osso-3-fenil-3,5-diidro-4*H*-piridazin[4,5-*b*]indol-1-acetammide (SSR180575, **Figura 4**), che si è mostrato capace di promuovere la riparazione e la sopravvivenza neuronale. SSR180575 presenta un'affinità nanomolare per il TSPO sia

nel ratto che nell'uomo, quattro volte maggiore di quella di Ro5-4864. Inoltre, SSR180575 aumenta l'accumulo di pregnelolone nel cervello e ciò suggerisce che gli effetti terapeutici siano dovuti alla sua capacità di stimolare la steroidogenesi.(16)

N,N-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliossilammidi

Negli ultimi dieci anni, sono stati sviluppati una nuova serie di ligandi potenti e selettivi per il TSP0, che rappresentano una variazione della struttura base dell'alpidem. Questi composti sono noti come *N,N*-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliossilammidi (**XX**, **Figura 13**)^[8]. Le SAR di questa classe di composti sono state razionalizzate sulla base di un modello farmacoforico costituito da tre tasche lipofile (L1, L3 e L4) e da un sito donatore capace di formare un legame a idrogeno (H1)^[24].

Figura 13.

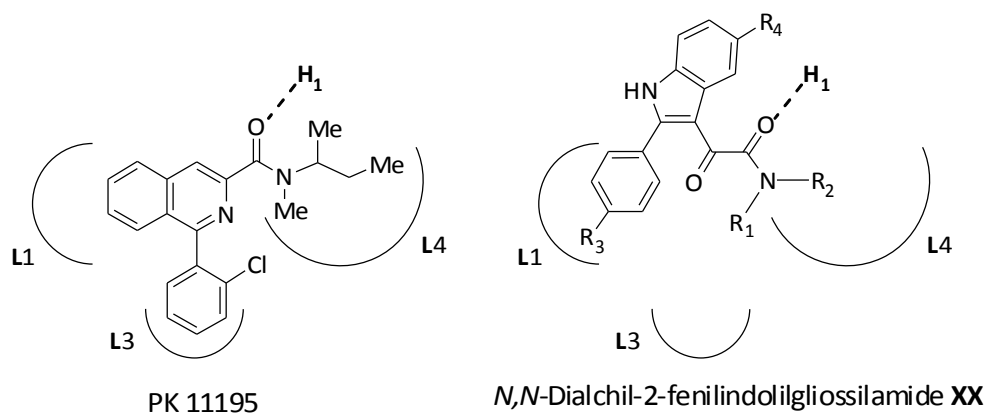


Figura 13. Rappresentazione dello schema di interazione della *N,N*-dialchil-2-fenilindoligliossilammidi con il recettore, paragonato con le modalità di legame del derivato isoquinolinico PK11195.

Per le *N,N*-dialchil-2-fenilindoligliossilammidi si può ipotizzare che il fenile in posizione 2 sia coinvolto in una interazione con un anello aromatico elettrone-ricco

presente nell'area lipofila L1 e che questa interazione sia rafforzata da sostituenti elettronattrattori come gli alogeni o il gruppo nitro in posizione 4'.

I sostituenti alchilici R1 ed R2 interagirebbero rispettivamente con le aree lipofile L3 e L4, mentre il secondo carbonile del ponte ossalilico della catena laterale svolgerebbe il ruolo di accettore nella formazione di un legame a idrogeno con il sito H1 presente sul recettore. Le più importanti considerazioni sulle relazioni struttura-attività, sono emerse dall'esame dei dati di affinità secondo i quali per quanto riguarda la natura dei sostituenti R1 ed R2 sull'azoto della catena gliossilammidica in posizione 3 i risultati migliori, in termini di affinità, sono stati ottenuti attraverso la disostituzione con catene alchiliche lineari ed uguali tra loro, di lunghezza compresa tra 3 e 6 atomi di carbonio; si sono inoltre dimostrati altamente affini composti con sostituzione asimmetrica dell'azoto ammidico, in particolare *N*-etil-*N*-benzilammidi e *N*-metil-*N*-butilammidi.

Considerando la posizione *para* sul fenile in posizione 2, i composti recanti un sostituito elettronattrattore (F, Cl, NO₂) si sono dimostrati essere i più attivi, con valori di K_i subnanomolari. Tra questi derivati, quelli con catene *n*-esiliche e con un sostituito in posizione 4' come un alogeno, fluoro e cloro, o un gruppo nitro, risultano particolarmente potenti con valori di K_i rispettivamente 0.37 nM, 0.55 nM e 0.27 nM. E' interessante notare che l'affinità mostrata è simile, se non superiore, a quella dell'alpidem, preso come riferimento (K_i=0.5-7nM). Al contrario l'inserzione di un gruppo elettron-donatore come il metile nella posizione 4' non ha determinato un aumento significativo di affinità: infatti questi composti sono equipotenti ai corrispondenti non sostituiti.

Infine, per quanto riguarda la posizione 5 del sistema indolico, prodotti recanti un sostituito di tipo elettronattrattore come F, Cl, NO₂, hanno mostrato una buona attività, che risulta ulteriormente potenziata se è contemporaneamente presente un secondo sostituito elettronattrattore in posizione 4'.

La maggior parte dei nuovi composti ha un'elevata affinità per il TSPO, con valori di K_i compresi tra il nanomolare ed il subnanomolare; inoltre alcune

indolgliossilammidi sono capaci di stimolare la biosintesi del pregnenolone in cellule C6 di glioma di ratto.

Inoltre, nella prova EPM, il derivato indolico con $R_1=CH_2CH_3$, $R_2=CH_2C_6H_5$, $R_3=R_4=Cl$, e $R_5=H$, ha mostrato attività ansiolitica.

Considerandoli nel loro insieme, i risultati di questo studio suggeriscono che i nuovi derivati *N,N*-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliossilammidici rappresentano strumenti farmacologici promettenti e adatti a trattare i disturbi legati all'ansia.

Probes molecolari per la caratterizzazione dei recettori attraverso tecniche chimico-fisiche: ligandi radioattivi e ligandi fluorescenti.

Negli ultimi anni il ***molecular imaging*** si è dimostrato un utile strumento biomedico che consente la visualizzazione, la caratterizzazione e la quantificazione dei processi biologici che si verificano a livello cellulare e subcellulare applicabile direttamente su organismi viventi, incluso l'uomo. I processi biologici possono così essere studiati nel loro autentico ambiente fisiologico.

Il ***molecular imaging*** permette di monitorare la progressione di una patologia in uno specifico paziente consentendo un approccio di terapia personalizzata. La risposta ad un trattamento farmacologico è differente da individuo a individuo e dipende da vari fattori (per esempio, dal proprio corredo genetico, qualità di vita, dieta). L'utilizzo di una terapia personalizzata è quindi utile nella diagnosi, nel trattamento e nella prevenzione di una patologia. Una terapia personalizzata è resa possibile da queste nuove tecniche che consentono il monitoraggio di eventi che avvengono a livello molecolare prima ancora che si verificano i primi sintomi.

Il ***molecular imaging*** è anche un utile strumento non invasivo nella diagnosi e nel monitoraggio di patologie cardiache, di varie forme tumorali e di alcuni disturbi neurologici. Comprende differenti modalità e tecnologie come ad esempio la medicina nucleare (PET, CT/PET, SPECT), la risonanza magnetica nucleare, gli ultrasuoni. Alcune di queste tecniche prevedono l'utilizzo di probes molecolari. Con il termine di ***probes molecolari*** si indicano ligandi utili per la determinazione o caratterizzazione di un recettore mediante varie tecniche chimico-fisiche. Esempi di probes molecolari sono i ligandi radioattivi e i ligandi fluorescenti, oppure ligandi in grado di formare un legame covalente con opportuni costituenti recettoriali (affinity labels).

PET e Radioligandi

Lo sviluppo della tomografia ad emissione di positroni (PET), grazie all'utilizzo dei radioligandi, ha facilitato la localizzazione e lo studio dell'espressione del TSPO nei topi, nei primati e anche nell'uomo.

La PET è una delle principali tecniche di imaging nel campo della radiologia e della medicina nucleare. Questa tecnica fornisce informazioni solo di tipo fisiologico e si basa sull'emissione di radiazioni gamma dal corpo del paziente a seguito dell'iniezione di opportuni radioligandi.

Pur essendo una tecnica efficiente nella determinazione della presenza di tumori, la PET fornisce informazioni solo di tipo *qualitativo*. Per rendere quantitativa l'indagine PET occorre una precisa mappatura dei coefficienti di assorbimento all'interno del corpo del paziente e ciò è possibile ricorrendo alla fusione dell'immagine CT (Computed Tomography) e di quella PET (CT/PET).

Il campo di applicazione della PET è la Medicina Nucleare. La diagnostica PET si basa sulla somministrazione al paziente di un radiofarmaco, che si distribuisce nel corpo a seconda della sua composizione chimica e dell'attività metabolica nei vari organi di quella particolare sostanza. La PET è costituita da una matrice circolare di rivelatori sintonizzati per rilevare fotoni a livello di energia specifica creata dalla annichilazione positrone/elettrone (**Figura 14**).

Software topografici assemblano questi segnali in immagini che mostrano la localizzazione e la concentrazione dei radiofarmaci iniettati nel paziente. Alcune molecole del farmaco iniettato contengono radioisotopi marcatori nei cui nuclei si ha un'eccessiva presenza di protoni rispetto ai neutroni: ciò causa un decadimento. Il nucleo finale può trovarsi in uno stato metastabile (contrassegnato dall'asterisco) con conseguente emissione di un fotone per decadimento. Ogni positrone emesso, dopo aver subito un raffreddamento dovuto a successive interazioni coulombiane nel tessuto, annichilisce con un elettrone emettendo due fotoni con direzione di

volto opposte formando un angolo di 180° a 511 keV. I due fotoni emessi vengono rivelati da opportune matrici di rivelatori, le quali possono essere arranziate in modo planare su un supporto rotante, o su anelli. Tramite coincidenza elettronica, è possibile determinare se due fotoni, incidenti su due rivelatori opposti, sono stati emessi nell'annichilazione della medesima coppia elettrone-positrone.

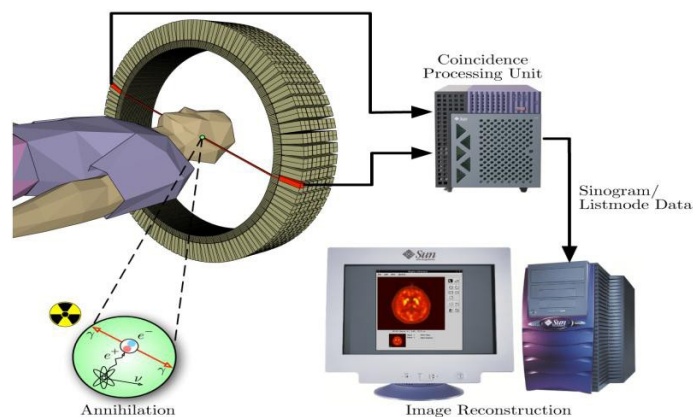


Figura 14.

Alcuni dei traccianti radioattivi utilizzati in PET sono:

^{11}C ($T_{1/2} = 20$ min), ^{13}N ($T_{1/2} = 10$ min), ^{15}O ($T_{1/2} = 2$ min), ^{18}F ($T_{1/2} = 110$ min).

La brevità della vita media di questi isotopi garantisce un basso livello di dose rilasciata al paziente, ma causa la necessità di un ciclotrone in-loco, o comunque non lontano, per la loro utilizzazione. Per studi che necessitano di diversi giorni di osservazione, si usa l'isotopo ^{124}I ($T_{1/2} = 4.1$ gg).

Questi radioligandi sono incorporati in composti normalmente usati dall'organismo come il glucosio (o analoghi del glucosio), acqua o ammoniaca o in molecole che si legano ai recettori o in altri siti di azione dei farmaci. Tali composti marcati sono conosciuti come **radioligandi**. Una delle caratteristiche che rende così importante la PET per gli studi fisiologici, è la sua capacità di individuare variazioni metaboliche nanomolari, tipiche degli organismi e delle funzionalità cellulari.

Le maggiori applicazioni dell'imaging PET sono la detezione dei tumori al cervello, seno, cuore e polmoni. In neurologia, la PET è particolarmente indicata per la sua

capacità di mostrare l'attività dei neurorecettori, i quali hanno una concentrazione troppo bassa (μmol , o inferiore) per essere investigata con altre tecniche diagnostiche.

La PET presenta però anche alcuni limiti. Il range medio percorso dai positroni prima di annichilire è, in acqua (che è il maggior componente dei tessuti biologici), di circa 1-2 mm, e varia a seconda del particolare radionuclide usato. Ciò comporta una degradazione nella risoluzione spaziale dell'immagine, poichè la rivelazione dei fotoni in coincidenza elettronica porta alla determinazione del punto di annichilazione della coppia, e non del punto in cui il positrone viene emesso. Questo è il cosiddetto *effetto range*. Inoltre l'emissione dei fotoni di annichilazione non avviene esattamente back-to-back, ma si ha una piccola deviazione angolare.

Tenendo conto del solo moto termico delle particelle si dovrebbe avere emissione dei fotoni a $180^\circ \pm 0.25^\circ$ ma ciò non concorda con i risultati sperimentali. In effetti, la deviazione angolare è maggiore ed è dovuta all'instaurarsi di uno stato legato elettrone-positrone, chiamato positronio. Tale stato legato può interagire con elettroni esterni, annichilando con essi (pick-off) e provocando l'aumento della dispersione angolare dei fotoni.

Le distorsioni dell'immagine dovute all'effetto range e alla deviazione angolare non sono matematicamente rimovibili, e costituiscono una limitazione fondamentale della PET. Tuttavia, la loro entità è tale da essere trascurata se non si usano tomografi con elevata risoluzione spaziale, o distanze elevate tra rivelatori e paziente.

La tecnica PET può essere utilizzata per marcare il TSPO attraverso specifici radioligandi consentendo così il controllo della progressione delle malattie ad esso associate e la determinazione dell'effetto che esercita la terapia in tali patologie (ad esempio patologie neuroinfiammatorie). L'utilizzo di radioligandi specifici per il TSPO e della tecnica PET consente la visualizzazione di una eventuale perdita neuronale e della gravità della neuroinfiammazione e ciò può essere un valido strumento per determinare un differente trattamento per uno specifico paziente. Inoltre grazie alla

localizzazione della microglia attivata è possibile anche determinare lo stadio della malattia.^[6]

Il PK11195 è stato il primo ligando radiomarcato ad essere utilizzato per il diagnostic imaging per evidenziare alcune patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, di Huntington, il Parkinson e la sclerosi multipla; tuttavia, la visualizzazione del recettore a livello cerebrale nel primate si è dimostrata spesso insoddisfacente in quanto l'uptake del radioligando a questo livello non è sufficiente per un'analisi quantitativa.

Nel 1998 è stata sintetizzata una nuova classe di composti acetamidici altamente affini per il TSPO. Fra questi sono stati scelti due ligandi, il DAA1106 e il DAA1197, in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica nel ratto, e sono stati radiomarcati con ^{11}C , con lo scopo di indagare sulla distribuzione del recettore a livello cerebrale grazie all'utilizzo della tecnica PET. È stato osservato sul ratto che questi [^{11}C]ligandi si distribuiscono soprattutto nel bulbo olfattorio e nel cerebellum, due regioni con un'alta densità di tale recettore. Questo legame si è dimostrato selettivo in quanto la co-somministrazione di composti non radiomarcati affini per il TSPO, riduce il legame dei [^{11}C]ligandi in entrambe le regioni. Attraverso l'utilizzo di questi ligandi radiomarcati e della PET è stato possibile effettuare studi di binding *in vivo* su cervello di primate e valutare la percentuale non metabolizzata dei composti presente sia a livello cerebrale che plasmatico.^[25]

Come già descritto in precedenza, i composti pirazolopirimidinici, in particolare DPA713 e DPA714, sono altamente affini al TSPO, in misura maggiore del PK11195. In un recente studio è stato pensato di radiomarcare il DPA713 con ^{11}C per valutare *in vivo* sul primate la distribuzione del TSPO. Esperimenti su modelli di ratto affetti da neurodegenerazione hanno evidenziato che questo composto possiede proprietà di imaging migliori rispetto al [^{11}C]-PK11195, esibendo inoltre un signal-to-noise maggiore che consente una quantificazione più precisa del recettore.^[26]

Probes Fluorescenti

L'utilizzo di ligandi fluorescenti combinati con la microscopia confocale permette di:

- (i)** determinare la presenza e la distribuzione di un recettore all'interno di una preparazione multicellulare e localizzare il binding su singole cellule;
- (ii)** fare misure di binding in presenza ed in assenza di competitori non marcati;
- (iii)** caratterizzare la localizzazione del segnale a livello della membrana e l'estensione della penetrazione del probe all'interno della cellula.

La fluorescenza consiste nell'emissione, da parte di una molecola che ha assorbito una radiazione, di un'altra radiazione di lunghezza d'onda maggiore.

La maggior parte delle molecole organiche, a temperatura ambiente, si trova nello stato fondamentale (S_0V_0). In queste molecole, per assorbimento di fotoni, un elettrone passa ad un livello energetico superiore (S_1, S_2, \dots) in un tempo inferiore a 10^{-15} secondi. L'energia assorbita viene in parte velocemente dissipata per collisione (come calore), per cui l'energia della molecola eccitata decade rapidamente al livello minimo di energia vibrazionale nello stato energetico eccitato ($S_1V_0, S_2V_0 \dots$). Molecole capaci di emettere fluorescenza tornano allo stato fondamentale (occupando uno qualsiasi dei livelli vibrazionali) in un tempo inferiore a 10^{-8} secondi ed emettono energia sottoforma di un picco di fluorescenza. In altre parole, quando un elettrone molecolare viene investito da un'onda elettromagnetica della radiazione ultravioletta e ne assorbe l'energia, si sposta su un orbitale più esterno, ma l'eccessiva energia vibrazionale improvvisamente acquisita dalla molecola viene dispersa in brevissimo tempo nell'ambiente. L'elettrone resta così in un particolare stato di instabilità dal quale tornerà nella posizione originaria emettendo un fotone di luce visibile, nel giro di una frazione infinitesima di secondo. La radiazione emessa ha una energia inferiore (lunghezza d'onda maggiore) rispetto alla radiazione incidente. Una sostanza può quindi assorbire nell'ultravioletto ed emettere una

radiazione nel visibile: l'aumento della lunghezza d'onda è detto spostamento (o shift) di Stokes. Poche molecole danno origine a fluorescenza.

Gli spettri di fluorescenza sono spettri a banda, dal momento che nella radiazione emessa vi sono livelli energetici che dipendono dai livelli finali di energia vibrazionale e rotazionale raggiunti. Questi spettri inoltre non dipendono, di solito, dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita e sono in genere simili allo spettro di assorbimento (con andamento speculare), ma spostati a lunghezza d'onda maggiori. E' evidente che gli spettri di fluorescenza forniscono dati solo su tempi inferiori a 10^{-8} secondi. La resa quantica del processo di fluorescenza è data dal rapporto tra il numero di molecole che fluoresce rispetto al totale di molecole eccitate, e cioè dal rapporto tra il numero di fotoni emessi ed il numero di fotoni assorbiti:

$$\text{resa quantica di fluorescenza} = n^{\circ} \text{ fotoni emessi} / n^{\circ} \text{ fotoni assorbiti}$$

La resa quantica è un numero compreso tra 0 e 1 ed è indipendente dalla lunghezza d'onda della luce di eccitamento; influisce però fortemente sulla sensibilità del metodo, dal momento che l'intensità della radiazione emessa ad una certa lunghezza d'onda è proporzionale ad essa.

L'intensità di fluorescenza (I_f) è direttamente proporzionale alla concentrazione (c) dell'analita, secondo la relazione:

$$I_f = 2.3 \cdot K' \cdot \varepsilon \cdot d \cdot c \cdot I_0$$

dove:

K' è una costante che dipende dalla resa quantica di fluorescenza, ε è il coefficiente di estinzione molare, d è il cammino ottico e I_0 è l'intensità del raggio incidente.

Se I_0 è costante, l'equazione diventa:

$$I_f = K \cdot c$$

con $K = 2.3 K' \varepsilon d I_0$.

Esiste così una relazione lineare tra il potere fluorescente di una soluzione e la sua concentrazione. Questa relazione vale solo per soluzioni diluite, che mostrano valori

di assorbanza inferiori a 0.05. All'aumentare della concentrazione, la linearità viene meno essenzialmente a causa di due fattori :

- (i) l'autoestinzione, cioè la collisione tra molecole eccitate;
- (ii) l'autoassorbimento o self-quenching, fenomeno secondo il quale le molecole di analita assorbono la radiazione fluorescente emessa da altre molecole di analita, così che la fluorescenza diminuisce man mano che il fascio attraversa la soluzione e la lunghezza d'onda della radiazione emessa si sovrappone a quella di assorbimento.^[27]

Attraverso uno spettrofluorimetro è possibile effettuare le seguenti rilevazioni:

- ³⁵₁₇ **spettri** - elementi caratterizzanti della molecola e relazionati alla polarità dell'ambiente in cui si trova il probe;
- ³⁵₁₇ **misura del tempo di decadimento della fluorescenza** – legato al tipo di ambiente in cui si trova il probe: per esempio se in seguito all'interazione del probe con il recettore non si modifica il tempo di vita della fluorescenza, significa che la molecola del fluoroforo non è coinvolta nell'interazione recettore-ligando;
- ³⁵₁₇ **anisotropia di fluorescenza** – rappresenta la misura della polarizzazione della luce emessa e permette di misurare i movimenti rotazionali del probe: il probe libero corrisponde a movimenti veloci, il probe legato corrisponde a movimenti ristretti; è quindi possibile calcolare la frazione legata rispetto a quella libera. Inoltre, l'anisotropia misurata con il probe completamente legato permette di valutare il grado di rigidità del legame recettore-ligando;
- ³⁵₁₇ **misure di quenching** – “quenching” letteralmente significa smorzamento, ed indica il fenomeno per cui una quota di energia che potrebbe essere emessa come fluorescenza viene invece trasferita ad un'altra molecola, determinando così una diminuzione della fluorescenza stessa; queste misure permettono di valutare l'esposizione del fluoroforo, per esempio nei casi in cui la natura del legame può cambiare a seconda

della condizioni sperimentali;

³⁵₁₇ **misura dello spettro di fluorescenza in funzione del legame** – dà indicazione sul tipo di ambiente visto dal probe; si possono effettuare esperimenti sia con il probe libero che con il probe legato.

Considerando tutti questi aspetti, risulta quindi evidente quanto la versatilità della tecnica della fluorescenza la renda uno strumento particolarmente utile nella caratterizzazione di un recettore.^[28]

Tra i fluorocromi più studiati si ricordano il dansile, il 7-nitrobenzofurazano (NBD), e la naftalimmide (**Figura 15**).

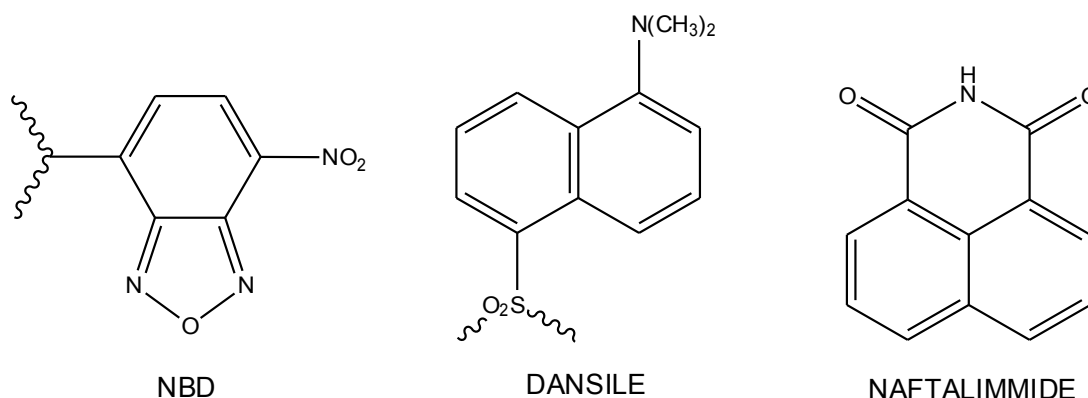


Figura 15.

Lo studio della variazioni delle proprietà di fluorescenza di un composto in seguito al legame con il suo recettore in diverse condizioni di soluzione (per esempio pH e polarità del solvente), può fornire dati interessanti sulle caratteristiche del sito di legame e sull'interazione ligando-recettore.

Introduzione alla parte sperimentale

La Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) rappresenta probabilmente la tecnica di elezione nell'ambito dell'Imaging Molecolare. Come precedentemente accennato, si basa sull'utilizzo dei radiofarmaci, molecole marcate con un radioisotopo a breve emivita, che vengono iniettate nel paziente o nell'animale per via endovenosa per eseguire l'analisi tomografica.(32) La PET ha assunto negli ultimi anni un ruolo di primo piano nella diagnostica clinica, in quanto, grazie ai traccianti marcati, permette di studiare in modo non invasivo e soprattutto in vivo i processi biochimici e fisiologici che avvengono nei tessuti e negli organi; tra l'altro, la recente diffusione di questa tecnica è da attribuire principalmente alla evoluzione dei tomografi utilizzati per l'esame, in grado di fornire in tempi relativamente brevi immagini total body con una risoluzione spaziale ottimale (anche di pochi millimetri).(33). Il campo di applicazione principale resta quello oncologico, anche se diversi traccianti trovano impiego nello studio di alterazioni cardiologiche e di patologie del Sistema Nervoso Centrale e Periferico.

Poiché il radiofarmaco, una volta somministrato, si distribuisce nel tessuto o nell'organo di interesse, con la PET è possibile misurare e valutare il grado di malignità o aggressività di un tumore e l'eventuale presenza di metastasi a distanza, tutto questo mediante analisi di immagini delle sezioni anatomiche coinvolte. In generale, la perfusione e il metabolismo tissutali, la neurotrasmissione e il binding recettoriale, l'espressione genica, la farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci sono alcuni tra i meccanismi che possono essere analizzati in vivo mediante PET.

E' bene ricordare che gli studi PET si basano essenzialmente su due differenti strategie:

- valutazione dell'effetto dei farmaci su funzioni quali perfusione e metabolismo regionale;
- sviluppo di traccianti selettivi per determinati target molecolari, come recettori, enzimi, trasportatori di membrana da utilizzare come marcatori specifici.

Dal momento che la materia organica è formata in modo principale da idrogeno, carbonio, azoto ed ossigeno, i traccianti utilizzati nella PET sono comunemente

marcati con radioisotopi naturali emittenti positroni, quali Carbonio-11, Azoto-13, Ossigeno-15 e Fluoro-18. Quest'ultimo è generalmente considerato un radioisotopo pseudo naturale, in quanto, pur non trovandosi come tale nelle molecole organiche, può tuttavia fungere da sostituito di atomi di idrogeno, ossidrili o altri gruppi funzionali all'interno delle molecole stesse.

L'ampio spettro di applicazione del TSPO per gli studi di imaging in vivo di differenti condizioni patologiche nel cervello e in periferia, ha determinato un sempre maggior interesse nello sviluppo di radiofarmaci usati proprio nell'imaging di questo recettore mediante PET o SPECT.

Questo lavoro di tesi sperimentale si inserisce in un progetto di ricerca volto allo sviluppo di un nuovo probe molecolare per il TSPO radiomarcato col Fluoro-18 caratterizzato dal nucleo chinazolinico (composto **11** Figura 15).

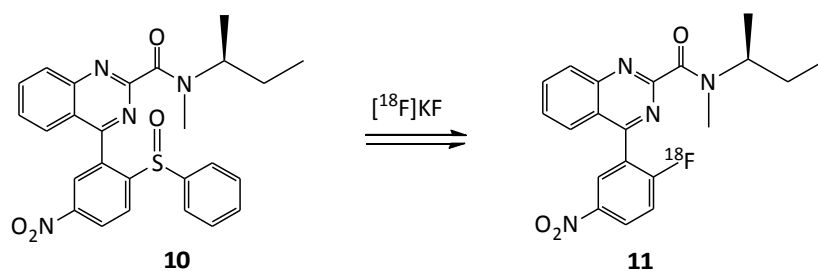


Figura 15

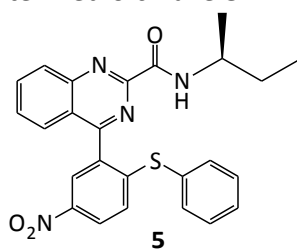
Il Fluoro 18 ($t_{1/2} = 109,7$ min; $\beta^+ = 97\%$) può essere considerato il radioisotopo di elezione in ambito PET, grazie ai numerosi vantaggi rispetto alla marcatura con carbonio-11. Primo tra tutti l'elevata attività del fluoro-18, come ione fluoruro $[^{18}\text{F}]^-$ può essere prodotta da una moderata energia del ciclotrone dalla reazione nucleare $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ in acqua arricchita con $[^{18}\text{O}]$. Secondo, la più lunga emivita ne consente il trasporto anche su lunghe distanze e inoltre permette una più lunga e accurata sessione d'immagini. Infine il Fluoro 18 emette un positrone a bassa energia durante il decadimento e questo consente di utilizzare a pieno l'elevata risoluzione spaziale delle moderne camere PET (≈ 2 mm). Chimicamente, essendo in grado di formare legami covalenti piuttosto forti con i composti del carbonio, può essere introdotto in

un numero alquanto grande di molecole organiche, poichè, può fungere da sostituyente di atomi di idrogeno o di gruppi ossidrilici.

Recentemente è stato dimostrato che semplici *para*-nitrosolfossidi reagiscono prontamente con lo ione fluoruro [¹⁸F]⁻ per ottenere i corrispondenti [¹⁸F]nitrofluoro areni con buone rese (34).

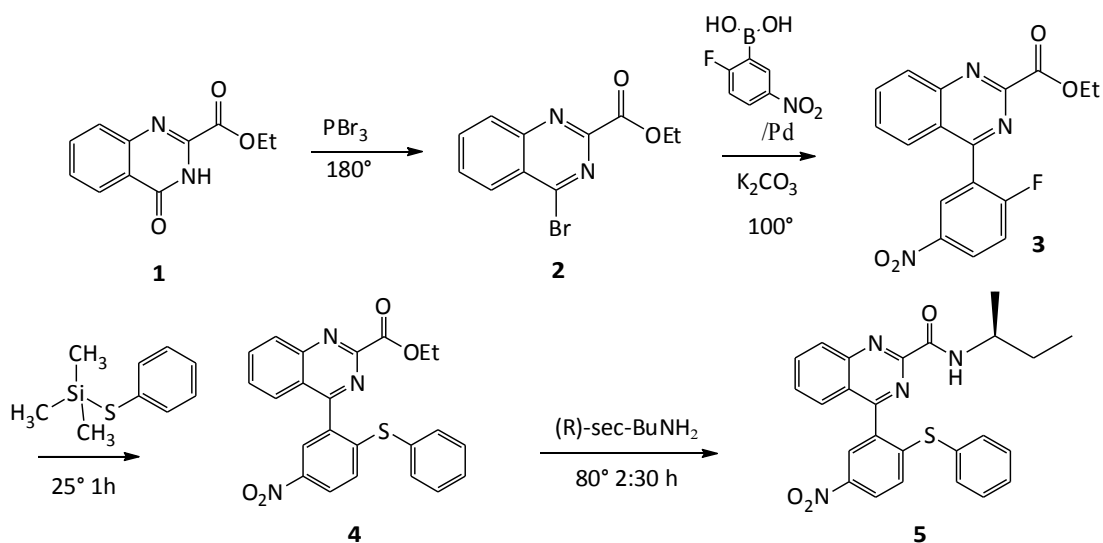
Sulla base di queste considerazioni, lo scopo della mia tesi è stato quello di progettare uno schema di sintesi adatto alla preparazione del derivato chinazolinico (composto **10 figura 15**) da utilizzare quale prodotto di partenza per la radiomarcatura che fornirà il probe desiderato **11**.

La procedura utilizzata per la sintesi di tale derivato è riassunta negli **Schemi 1-3** e prevede la preparazione dell'intermedio chiave **5**.



Per l'ottenimento di tale derivato sono state ideate due vie di sintesi alternative (**Schemi 1 e 2**). Le diverse procedure sono state messe a punto in parallelo, al fine di valutare quale delle due risultasse più efficiente in termini di tempo, consumo di solventi e reagenti, resa totale del prodotto finale.

Schema di Sintesi 1

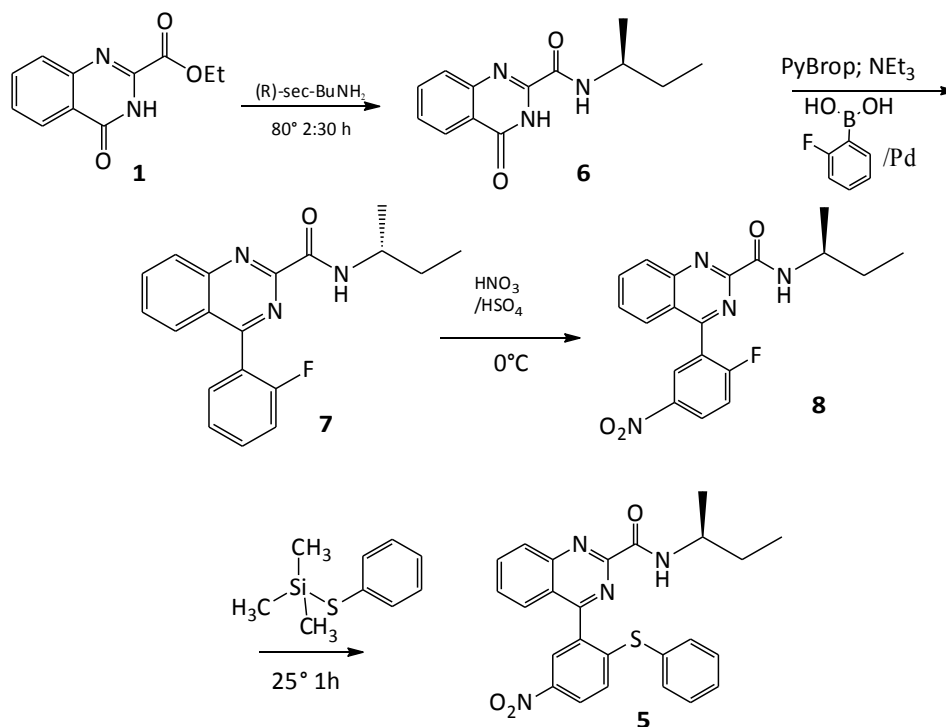


Lo **Schema di sintesi 1** prevede, come primo step, la bromurazione dell' Etil 3,4-diidro-4-oxochinazolin-2-carbossilato **1** con tribromuro di fosforo per l'ottenimento del rispettivo Etil bromochinazolin estere **2**. In letteratura la bromurazione del nucleo chinazolinico è riportata con una resa del 5% dovuta all'instabilità del prodotto. Nel corso di questo lavoro siamo riusciti ad ottenere un incremento della resa portandola fino al 20% apportando alcune migliorie alla procedura sintetica come: l'uso della fiala al posto del pallone, una minore quantità di ghiaccio nel trattamento e l' aver velocizzato i tempi di reazione e di purificazione del composto. Il composto **2** è purificato tramite cromatografia flash (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Il bromoderivato **2** così ottenuto è sottoposto ad una reazione di cross coupling con acido 2-fluoro-5-nitrofenilboronico, in presenza di Palladio Tetrakis come catalizzatore e K_2CO_3 come base. Il composto **3** così ottenuto è purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4) ed è ottenuto con una resa pari al 50%. In seguito l'estere etilico **3** viene fatto reagire con trimetil-fenil-tiosilano in presenza di due gocce di fluoruro di tetra n-butilammonio in THF (TBAF) come catalizzatore, ottenendo così il corrispondente solfuro **4**, purificato con flash

Introduzione alla parte sperimentale
cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4) ed ottenuto con una resa del 60%. Nello step successivo il solfuro **4** viene fatto reagire con (R)-*Sec*-butilammina per circa 2 ore e mezzo a 80 °C in fiala chiusa. Al termine il grezzo di reazione è solubilizzato in diclorometano e la fase organica è lavata con HCl al 10%. Dopo essiccamento su Na₂SO₄ il solvente viene evaporato eliminato a p.r., fornendo l'ammide **5** che viene purificata mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5) ed è ottenuta con una resa del 60%.

La resa totale dello **Schema di sintesi 1** è del 4%.

Schema di Sintesi 2

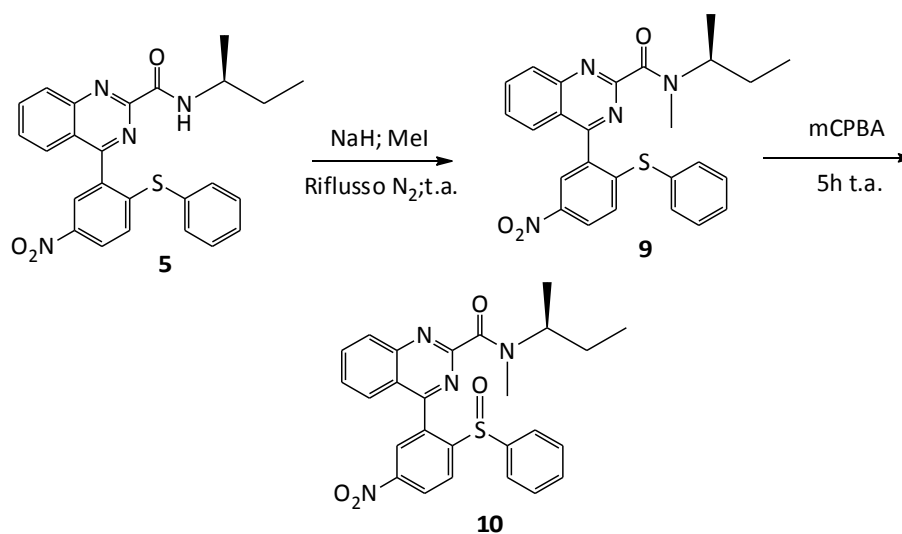


Nello **Schema di sintesi 2**, l'etil 3,4-diidro-4-oxochinazolin-2-carbossilato **1** viene trasformato nella corrispondente ammide **6** per trattamento con (R)-Sec-butilammina a 80°C per due ore e mezzo in fiala chiusa. Al termine della reazione il prodotto è solubilizzato in diclorometano e lavato con HCl al 10%. La fase organica è seccata su Na₂SO₄, filtrata e la soluzione ottenuta evaporata a p.r., fornendo il composto **6** in un grado di purezza adeguato per essere utilizzato nello step successivo senza ulteriore purificazione. Ad una soluzione del composto **6** in 1,4-diossano, sono aggiunti Bromo-tris-pirrolidinio fosfonioesafluorofosfato (PyBrop) e NEt₃. La miscela risultante è mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa 4 ore. In seguito viene aggiunto l'acido 2-fluorofenilboronico, dicloruro di Bis(trifenilfosfino)palladio(II) come catalizzatore, K₂CO₃ come base e acqua. Questa soluzione viene lasciata reagire a 100° per 1 ora. Al termine il solvente viene evaporato, il grezzo ottenuto ripreso con etile acetato. La fase organica è lavato con

acqua, seccata su Na_2SO_4 , filtrata ed evaporata a p.r.. Il composto **7** viene purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5) ed ottenuto con una resa di circa il 43%. Nello step successivo il composto **7** viene sottoposto a nitratura per aggiunta, in bagno di ghiaccio, di H_2SO_4 conc e successivamente di HNO_3 . Il corrispondente nitro derivato **8** è ottenuto con una resa del 93%. In seguito ad una soluzione del composto **8**, in acetonitrile, viene addizionato trimetil-fenil-tiosilano e due gocce di fluoruro di tetra n-butilammonio (TBAF) in THF come catalizzatore, ottenendo così il corrispondente solfuro **5**. Il composto **5** viene purificato con flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5) ed ottenuto con una resa del 80%. La resa totale dello **Schema di sintesi 2** è del 24%.

Secondo quanto riportato nello **Schema 3**, il composto **5** viene quindi metilato per trattamento con sodio idruro e successiva aggiunta di un eccesso di iodometano. La miscela di reazione è fatta reagire a temperatura ambiente per tutta la notte. Al termine il solvente viene eliminato a p.r.. In seguito viene versato del ghiaccio nel pallone e il precipitato ottenuto viene filtrato. Il composto **9** è ottenuto con una resa del 91%. A questo punto il solfuro **9**, solubilizzato in diclorometano, viene ossidato per trattamento con acido-*meta*-cloroperbenzoico per l'ottenimento del solfossido **10**. Al termine la soluzione viene lavata prima con una soluzione satura di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ e successivamente con una soluzione satura di NaHCO_3 . In seguito la fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata ed il solvente evaporato a p.r.. Il composto finale viene purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5) ed ottenuto con una resa di circa il 50%.

Schema di sintesi 3



Presi in considerazione i due schemi di sintesi per l'ottenimento dell'intermedio chiave **5** e le rispettive rese totali del 4% per lo **Schema 1** e del 24% per lo **Schema 2** siamo giunti alla conclusione, che è preferibile utilizzare la procedura riportata nello **Schema 2**. Infatti, bypassando la bromurazione dell'etil-3,4-diidro-4-oxochinazolin-2-carbossilato, reazione con resa inferiore al 20%, principalmente a causa dell'instabilità del bromo derivato **2** otteniamo delle rese di reazione complessivamente migliori.

Il prodotto finale **10** verrà inviato presso il laboratorio del Dr. W.Pike, presso il Molecular Imaging Branch del National Institute of Health (Bethesda Maryland) dove verrà sottoposto a marcatura radioattiva con ¹⁸F.

Parte sperimentale

Materiali e Metodi

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare di routine sono stati registrati in soluzione DMSO-d₆ o CDCl₃-d₆ su un Bruker operante a 400 Mhz.

L'evaporazione è stata eseguita sotto vuoto (evaporatore rotante).

L'analisi TLC è stata effettuata in Merck 0,2 millimetri con fogli di alluminio priverstati in gel di silice (60-F-254).

Gel di silice 60 (230-400 mesh) è stato usato per cromatografia su colonna.

Etil-4-bromochinazolin-2-carbossilato 2. Il composto commerciale etil-3,4-diidro-4-oxochinazolin-2-carbossilato (2,5 mmoli) e tribromuro di fosforo (50 mmoli) sono scaldati a 180°C per circa 2-3 ore (TLC di controllo Esano : Acetato di etile in rapporto 5:5). La soluzione è stata poi versata in ghiaccio e alcalinizzata con NH₄OH fino a pH 8-9; successivamente estratta con AcOEt. La fase organica viene seccata su Na₂SO₄, filtrata ed infine evaporata a p.r.. Il composto è purificato con flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Resa: 20%. ¹H-NMR (CDCl₃-d₆, ppm): 1.52 (t, 3H, CH₃, J= 7,2 Hz); 4.63 (q, 2H, CH₂, J= 10,2 Hz); 7.91-7.87 (m, 1H, ArH); 8.10-8.06 (m, 1H, ArH); 8.34-8.38 (m, 2H, ArH).

Etil-4-(2-Fluoro-5-Nitrofenil)chinazolin-2-carbossilato 3. Ad una soluzione del composto **2** (0,27 mmoli) in 10 ml di toluene anidro, è aggiunto Tetrakis (trifenilfosfina) Palladio (0,014 mmoli) e carbonato di potassio (0,4 mmoli) sotto atmosfera di azoto. In seguito, l'acido 2-fluoro-5-nitrofenilboronico (0,4 mmoli) solubilizzato in etanolo assoluto, viene aggiunto goccia a goccia; la soluzione è riscaldata a 100°C per 24 ore (TLC di controllo Acetato di etile:Esano in rapporto 4:6). La soluzione è evaporata a p.r ed il residuo ottenuto ripreso con diclorometano e lavato con acqua. Infine la fase organica viene, seccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata. Il prodotto è poi purificato con flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4). Resa:50%. ¹H-NMR (CDCl₃-d₆, ppm): 1.52 (t, 3H, CH₃, J= 7,2 Hz); 4.66 (q, 2H, CH₂, J= 10,2 Hz); 7.48 (t,1H, ArH, J= 8,8 Hz); 7.83-7.81 (m, 2H ArH); 8.12-8.08 (m, 1H, ArH); 8,43 (d, 1H, ArH, J= 8,4 Hz); 8.54-8.50 (m, 1H, ArH); 8.65-8.63 (m, 1H, ArH).

Etil-4-(5-Nitro-2-(feniltio)fenil)chinazolin-2-carbossilato 4. Ad una soluzione del composto **3** (0,15 mmoli) e trimetil(feniltio)silano (0,18 mmoli) in 10 ml ACCN sono

aggiunte 2 gocce di fluoruro di tetra N-butilammonio (TBAF) in THF come catalizzatore. La miscela di reazione è mantenuta a 25°C per 1 ora (TLC di controllo Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4). La soluzione viene evaporata e il prodotto viene purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4). Resa: 60%. ¹H-NMR (CDCl₃-d₆, ppm): 1.54 (t, 3H, CH₃, J= 7,2 Hz); 4.66 (q, 2H, CH₂, J= 10,2 Hz); 7.22 (d, 1H, ArH, J= 9,22 Hz); 7.42-7.38 (m, 5H ArH); 7.82-7.80 (m, 2H, ArH); 8.11-8.07 (m, 1H, ArH); 8.19 (dd, 1H, ArH, J= 2,4 Hz, J= 8,8 Hz); 8.33 (d, 1H, ArH, J= 2.8 Hz); 8.42 (d, 1H, ArH, J= 8.4 Hz).

N-sec-butil-4-(5-nitro-2-(feniltio)fenil)chinazolin-2-carbossammide 5. Al composto **4** (0,12 mmoli), posto in fiala chiusa, viene aggiunta *sec*-butilammina (1,2 mmoli). La soluzione è scaldata ad 80°C per circa due ore e mezzo (TLC di controllo Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Al termine il composto è solubilizzato in diclorometano e lavato in acido cloridrico al 10%. La fase organica viene seccata su Na₂SO₄, filtrata ed infine evaporata a p.r.. Il residuo è purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Resa: 60%.

Ad una soluzione del composto **8** (0,38 mmoli) e trimetil(feniltio)silano (0,46 mmoli) in 10 ml ACCN sono aggiunte 2 gocce di fluoruro di tetra n-butilammonio (TBAF) in THF come catalizzatore. La miscela di reazione è mantenuta a 25°C per 1 ora (TLC di controllo Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4). La soluzione viene evaporata e il prodotto purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano:Acetato di etile in rapporto 6:4) . Resa: 80%.

¹H-NMR (CDCl₃-d₆, ppm): 1.04 (t, 3H, CH₃, J= 7,6 Hz); 1.34 (d, 3H, CH₃, J= 6.4 Hz); 1.72-1.68 (m, 2H, CH₂); 4.31-4.27 (m, 1H CH); 7.26 (d, 1H, ArH, J=9.2 Hz); 7.42-7.38 (m, 5H, ArH); 7.77-7.75 (m, 1H, ArH); 7.88-7.87 (m, 1H, ArH); 8.11-8.05 (m, 2H, ArH,

NH, exchD_2O); 8.21 (dd, 1H, ArH, $J = 2.8 \text{ Hz}$, $J = 8.8\text{Hz}$); 8.35 (d, 1H, ArH, $J = 2.4 \text{ Hz}$); 8.41 (d, 1H, ArH, $J = 8.4 \text{ Hz}$).

N-sec-butil-4-chinazolin-2 carbossilato 6. Al composto commerciale etil 3,4-diidro-4-oxochinazolin-2-carbossilato (2 mmoli), posto in fiala chiusa viene aggiunta sec-butilammina (20 mmoli). La soluzione è scaldata ad 80°C per circa due ore e mezzo (TLC di controllo Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Al termine il composto è solubilizzato in diclorometano e lavato con acido cloridrico al 10%. La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 , filtrata ed infine evaporata a p.r.. Resa:70%. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, ppm): 1.01 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,6 \text{ Hz}$); 1.32 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.8 \text{ Hz}$); 1.69-1.64 (m, 2H, ArH, CH_2); 4.13-4.06 (m, 1H CH); 7.62-7.60 (m, 1H, ArH); 7.69 (bs, exchD_2O , $J = 7.8 \text{ Hz}$); 7.84-7.81 (m, 2H, ArH); 8.38-8.35 (m, 1H, ArH); 10.20(bs, 1H, NH, exchD_2O)

N-sec-butil-4-(2-fluorofenil)chinazolin-2-carbossammide 7. Ad una soluzione del composto **6** (1,4 mmoli) in 11 ml di 1,4-diossano, viene aggiunto Bromo-trispirrolidinio fosfonioesafluorofosfato (PyBrop) (2,1 mmoli) e in seguito NEt_3 (4,3 mmoli). La miscela risultante è fatta reagire a temperatura ambiente per circa 4 ore. In seguito viene aggiunto acido 2-fluorofenilboronico (2,8 mmoli), dicloruro di Bis(trifenilfosfino)palladio(II) (0,099 mmoli) come catalizzatore, K_2CO_3 (6,9 mmoli) come base e 8,4 ml di acqua. La soluzione viene lasciata reagire a 100° per 1 ora. Al termine il solvente è evaporato a p.r., il grezzo ottenuto ripreso con etile acetato e lavato con acqua. La fase organica è seccata su Na_2SO_4 filtrata ed evaporata. Il composto **7** viene purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente Esano : Acetato di etile in rapporto 5:5). Resa: 43%. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, ppm): 1.02 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,4 \text{ Hz}$); 1.32 (d, 3H, CH_3 , $J = 6,8 \text{ Hz}$); 1.68-1.66 (m, 2H, CH_2); 4.29-4.25 (m, 1H CH); 7.34-7.29 (m, 2H, ArH); 7,43-7.39 (m, 1H, ArH,); 7.73-7.59 (m, 3H, ArH); 7.92-

7.88 (m, 1H, ArH); 8.03-7.99 (m, 1H, ArH); 8.12 (d, 1H, NH, exchD_2O , $J = 8,4$); 8.38 (d, 1H, NH, exchD_2O , $J = 8,4$ Hz).

N-sec-butil-4-(5-nitro-2-nitrofenil)chinazolin-2-carbossammide 8. Ad una soluzione del composto **7** (0,46 mmoli) in H_2SO_4 conc viene aggiunto in bagno di ghiaccio HNO_3 (1,5 mmoli) goccia a goccia. La miscela di reazione è lasciata a 0°C per circa un ora (TLC di controllo Acetato di etile:Esano in rapporto 7:3) . La soluzione viene gocciolata in ghiaccio ed estratta in AcOEt. La fase organica è poi lavata con una soluzione satura di NaHCO_3 , seccata su Na_2SO_4 , filtrata ed evaporata. Resa:93%. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, ppm): 1.03 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.4$ Hz); 1.33 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.6$ Hz); 1.70-1.67 (m, 2H, CH_2); 4.29-4.26 (m, 1H CH);7.49 (m, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz); 8,30-7.75 (m, 2H, ArH,); 8.09-8.02 (m, 2H, ArH, NH, exchD_2O); 8.38 (d, 1H, ArH, $J = 8,4$ Hz); 8.54-8.50 (m, 1H, ArH); 8.63-8.61 (m, 1H,ArH).

N-sec-buti-4-(5-nitro-2-(feniltio)fenil)-N-metilchinazolin-2-carbossammide 9. Ad una soluzione del composto **5** (0,15 mmoli) in DMF anidra viene aggiunto sodio idruro a 0°C (0,15 mmoli). Dopo circa mezz'ora si aggiunge goccia a goccia un eccesso di iodometano (0,30 mmoli) in 1 ml dello stesso solvente e lascio reagire a temperatura ambiente per tutta la notte (TLC di controllo in Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Il solvente viene eliminato a p.r e in seguito viene versato del ghiaccio nel pallone. Si forma un precipitato che filtro. Resa: 93%. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, ppm): 0.90-0.89-0.87 (2t, 3H, CH_3 , $J = 7,4$ Hz); 1.31-1.27 (m, 3H, CH_3 ,); 1.75-1.67, 1.49-1.42 (2m, 2H, CH_2); 3.06, 2.85 (2s, 3H NCH_3); 4.86-4.84, 3.64-3.57 (2m, 1H, CH); 7.21-7.15 (m, 1H, ArH); 7.45-7.40 (m, 5H, ArH); 7.74-7.70 (m, 1H, ArH); 7.81-7.77 (m, 1H, ArH); 8.06-8.02 (m, 1H, ArH); 8.20-8.15 (m, 1H, ArH); 8.27-8.23 (m, 1H, ArH); 8.31-8.28 (m, 1H, ArH).

N-sec-buti-4-(5-nitro-2-(fenilsolfossido)fenil)-N-metilchinazolin-2-carbossamide

10 Ad una soluzione del composto **9** (0,13 mmoli) solubilizzato in diclorometano viene addizionato acido *meta*-cloroperbenzoico (0,13 mmoli). La soluzione risultante è mantenuta a temperatura ambiente per 5 ore (TLC di controllo in Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5) . Al termine vengono effettuati due lavaggi: 1) soluzione satura di Na₂S₂O₄; 2) una soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene poi seccata su Na₂SO₄, filtrata ed evaporata. Il residuo viene purificato mediante flash cromatografia (miscela eluente di Esano:Acetato di etile in rapporto 5:5). Resa: 50%.
¹H-NMR (CDCl₃-d₆, ppm): 1.06-0.89 (2t, 3H, CH₃, *J*= 7,4 Hz); 1.31-1.27 (m, 3H, CH₃); 1.25-1.67, 1.49-1.40 (2m, 2H, CH₂); 3.03, 2.80 (2s, 3H, NCH₃); 4.85-4.83, 3.62-3.57 (2m, 1H, CH); 7.28-7.17 (m, 3H, ArH); 7.48-7.46 (m, H, ArH); 7.54-7.53 (m, 1H, ArH); 7.63-7.59 (m, 2H, ArH); 8.01-7.99 (m, 1H, ArH); 8.19-8.15 (m, 1H, ArH); 8.41-8.39 (m, 1H, ArH); 8.59-8.48 (m, 1H, ArH).

Bibliografia

1. Braestrup, C.; Squires, R.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 3805-3809
2. Gavish, M.; Bachman, I.; Shoukrun, R.; Katz, Y.; Veenman, L.; Weisinger, G.; Weizman. *Pharmacol. Rev.* 1999, *51*, 619-640.
3. Papadopoulos V.; Baraldi M.; Gilarte T. R.; Knudsen T. B.; Lacapère, J.; Lindermann P.; Noremborg M. D.; Nutt D.; Weizman A.; Zhang M.-R.; Gavish M.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 402-409.
4. Galiegue S.; Tinel N.; Casellas P. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1563.
5. Da Settimo F.; Simorini F.; Taliani S.; La Motta C.; Marini A.; Salerno S.; Bellandi M.; Novellino E.; Greco G.; Cosimelli B.; Da Pozzo E.; Costa B.; Simola N.; Morelli M.; Martini C.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5798
6. Scarf A. M.; Ittner L. M.; Kassiou M.; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 581-592.
7. Galiegue, S.; Tinel, N.; Casellas, P. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1563-1572.
8. Taliani, S.; Da Settimo, F.; Da Pozzo, E.; Chelli, B.; Martini, C. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3359-80.
9. Cappelli, A.; Anzini, M.; Vomero, S.; De Benedetti, P. G.; Menziani, M. C.; Giorgi, G.; Manzoni, C. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2910-2921.
10. Matarrese, M.; Moresco, R. M.; Cappelli, A.; Anzini, M.; Vomero, S.; Simonelli, P.; Verza, E.; Magni, F.; Sudati, F.; Soloviev, D.; Todde, S.; Carpinelli, A.; Kienle, M. G.; Fazio, F. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 579-585.
11. Cappelli, A.; Mohr, P. G.; Gallelli, A.; Giuliani, G.; Anzini, M.; Vomero, S.; Fresta, M.; Porcu, P.; Maciocco, E.; Concas, A.; Biggio, G.; Donati, A.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3568-3571.
12. Anzini, M.; Cappelli, A.; Vomero, S.; Seeber, M.; Menziani, M. C.; Langer, T.; Hagen, B.; Manzoni, C.; Bourguignon, J. J. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1134-1150.
13. Taliani, S.; Pugliesi, I.; Da Settimo, F. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 860-886.
14. Da Settimo, F.; Simorini, F.; Taliani, S.; La Motta, C.; Marini, A. M.; Salerno, S.; Bellandi, M.; Novellino, E.; Greco, G.; Cosimelli, B.; Da Pozzo, E.; Costa, B.; Simola, N.; Morelli, M.; Martini, C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5798-5806.

15. Campiani, G.; Nacci, V.; Fiorini, I.; De Filippis, M. P.; Garofalo, A.; Ciani, S. M.; Greco, G.; Novellino, E.; Williams, D. C.; Zisterer, D. M.; Woods, M. J.; Mihaj, C.; Manzoni, C.; Mennini, T. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3435–3450.
16. James, M.L.; Selleri, S.; Kassiou, M., *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1991-2001.
17. Trapani, G.; Franco, M.; Ricciardi, L.; Latrofa, A.; Genchi, G.; Sanna, E.; Tuveri, F.; Cagetti, E.; Biggio, G.; Liso, G. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3109-3118.
18. Okubo, T.; Yoshikawa, R.; Chaki S.; Okuyama S.; Nakazato A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 423-438.
19. Okuyama, S.; Chaki, S.; Yoshikawa, R.; Ogawa, S.I.; Suzuki, Y.; Okubo, T.; Nakazato, A.; Nagamine, M.; Tomisawa, K. *Life Sci.* **1999**, *64*, 1455-1464.
20. Serra, M.; Madau, P.; Chessa, M.F.; Caddeo, M.; Sanna, E.; Trapani, G.; Franco, M.; Liso, G.; Purdy, R.H.; Barbaccia, M.L.; Biggio, G. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 177-187.
21. Culty, M.; Silver, P.; Nakazato, A.; Gazouli, M.; Li, H.; Muramatsu, M.; Okuyama, S.; Papadopoulos, V. *Drug Develop. Res.* **2001**, *52*, 475-484.
22. Selleri, S., Bruni, F., Costagli, C., Costanzo, A., Guerrini, G., Ciciani, G., Costa, B., Martini, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2661-2671.
23. Kozikowski, A.P.; Ma, D.; Brewer, J.; Sun, S.; Costa, E.; Romeo, E.; Guidotti, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2908-20.
24. Primofiore G.; Da Settimo F.; Taliani S., Simorini F.; Patrizi M. P.; Novellino E.; Greco G.; Abignente E.; Costa B.; Chelli B.; Martini C.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1852-1855.
25. Zhang M.-R.; Ogawa M.; Ito T.; Noguchi J.; Kumata K.; Okauchi T.; Suhara T.; Suzuki K. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2735-2742.
26. Doorduyn J.; Klein H. C.; Dierckx R. A.; James M.; Kassiou M.; De Vries E. F. J.; *Molecular imaging and biology*, **Published online**: 28 March **2009**.
27. koog D. A.; West D. M.; Holler F. J. in *Fundamental of Analytical Chemistry*, *Sunders College Publishing*, **1992**, 604.
28. McGrath J. C.; Arribas S.; Daly C. J. *TiPS*, **1996**, *17*, 393.
29. Kozikowski A. P.; Kotoula M.; Ma D.; Boujrad N.; Tuckmantel W.; Papadopoulos V. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2435.

30. Berque-Bestel I.; Soulier J.-L.; Giner M.; Rivail L.; Langlois M.; Sicsic S. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2606.
31. Castellano S.; Taliani S.; Milite C.; Pugliesi I.; Da Pozzo E.; Rizzetto E.; Bendinelli S.; Costa B.; Cosconati S.; Greco G.; Novellino E.; Sbardella G.; Stefancich G.; Martini C.; Da Settimo F. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4506-4510.
32. Schyler D.J., *Annals Academy of Medicine* (Singapore), 2004, 146-154.
33. Derenzo S., et al., *IEEE Nucl. Sci*, 1977, 544-558.
34. Chun, J.H. Morse, C.L.; Chin, F.P.; Pike, V.W. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2151-2153