



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

SINTESI E VALUTAZIONE FARMACOLOGICA DI NUOVE
MOLECOLE DUALI PER LA TERAPIA DEL MORBO DI
ALZHEIMER

Relatori:

Prof.ssa Simona Rapposelli

Dott.ssa Giulia Nesi

Candidata:

Chiara Barbieri

Anno accademico: 2014/2015

SSD CHIM08

Fearless

*“Vivam como se acabasse amanhã,
sintam como se fosse para sempre”*

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	3
1.ALZHEIMER'S DISEASE	4
1.1.Storia e scoperta del morbo di Alzheimer	6
1.2. Diagnosi della patologia	7
1.3.Terapia farmacologica attuale	8
1.4. Caratteristiche neuropatologiche della malattia	10
1.4.1. Alterazione sistema colinergico	10
1.4.2. Aggregazione β amiloide	13
1.4.3. Grovigli neurofibrillari	16
1.4.4. Stress ossidativo	19
1.4.5. Alta concentrazione metalli pesanti	23
2. STRATEGIE TERAPEUTICHE	25
2.1. Obiettivo futuro....approccio multitarget	25
2.1.1. Inibitori colinesterasi/antiossidanti	27
2.1.2. Inibitori colinesterasi/chelanti metalli	31
INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	33
PARTE SPERIMENTALE	51
BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUZIONE

GENERALE

ALZHEIMER'S DISEASE

Il morbo di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa, irreversibile, a carico del SNC, a decorso cronico e progressivo.

È stato stimato che circa il 5% della popolazione di età superiore a 65 anni è affetto dalla sindrome di Alzheimer. [1] È la sesta causa più comune di morte negli Stati Uniti, secondo l'Associazione Alzheimer, e nel 2011 più di 5 milioni di persone sono risultate affette da tale patologia, con una insorgenza in costante crescita [2]; in linea con le aspettative di vita, è prevedibile che il numero di persone colpite da AD triplicherà entro il 2050. [3]

La sindrome di Alzheimer è un disordine multifattoriale nel quale contribuiscono diversi fattori eziologici e neuropatologici. Nonostante l'eziologia sia tutt'oggi sconosciuta è stato osservato che sono coinvolti diversi fattori: età, sesso, corredo genetico, stile di vita e fattori ambientali.

È una patologia cronica neurodegenerativa associata alla perdita di cellule nervose in particolari aree del cervello che sono vitali per la memoria e per altre abilità mentali.

La malattia può essere suddivisa in tre fasi principali (Fig. 1.):

- Fase iniziale: caratterizzata da perdita della memoria con comparsa di disorientamento spazio-temporale e perdita progressiva della capacità di linguaggio;
- Fase intermedia: in cui si assiste ad un'accentuazione del danno della memoria, accompagnato da deficit di comprensione e utilizzo di parole sbagliate;
- Fase tardiva: in cui il paziente diventa incapace di sostenere rapporti relazionali in quanto possono comparire sintomi di tipo psicotico e comportamenti inappropriati assieme ad alterazioni motorie a cui segue la perdita dell'autonomia.

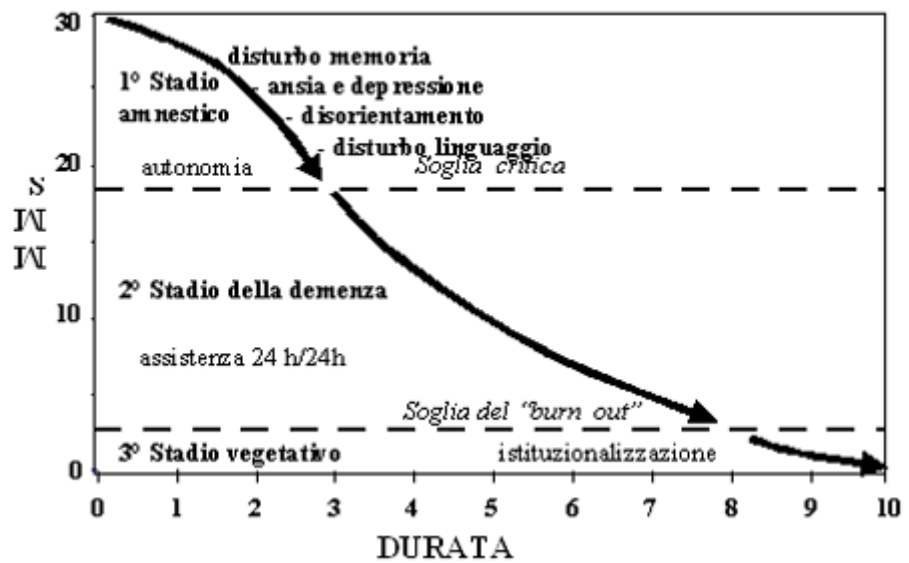


Fig.1: Storia naturale di un caso paradigmatico di demenza di Alzheimer per una durata di malattia di 10 anni. La durata della patologia è relazionata al MMSE (Mini Mental State Examination), il test più utilizzato per lo screening delle funzioni cognitive.

Le caratteristiche neuropatologiche che stanno alla base della patologia sono (Fig. 2):

1. Alterazione sistema colinergico con riduzione dei livelli di acetilcolina
2. Formazione di aggregati di beta-amiloide
3. Formazione di grovigli neurofibrillari intracellulari per iperfosforilazione delle proteine tau
4. Stress ossidativo
5. Alta concentrazione di metalli pesanti

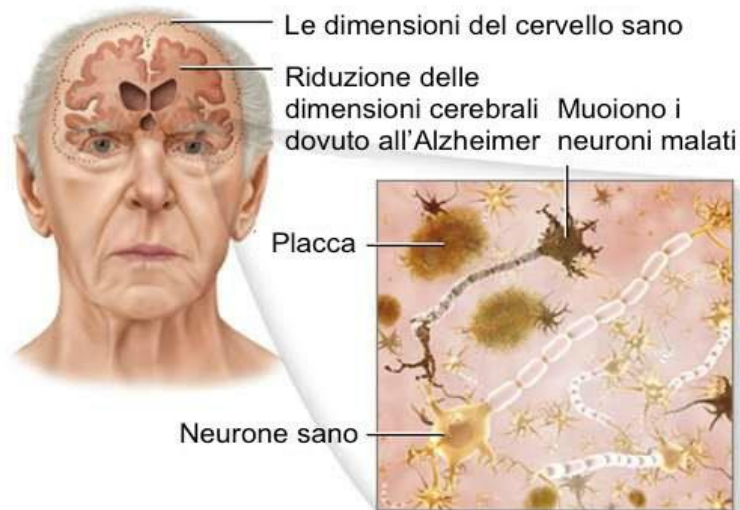


Fig.2: Caratteristiche cerebrali in pazienti affetti da AD

1.1. Storia e scoperta del morbo di Alzheimer

“Il primo evidente sintomo di malattia di questa donna di 51 anni fu la sospettosità nei confronti del marito. Talora, pensando che ci fossero persone che volessero ucciderla, Auguste cominciava ad urlare. Altre volte sembrava che avesse allucinazioni uditive”; fu così che Alois Alzheimer, nel 1906 descrisse i sintomi di una paziente di 51 anni affetta da una sconosciuta forma di demenza, presentando il caso alla Convenzione psichiatrica di Tübingen. Soltanto nel 1910 però la malattia ebbe un nome, ovvero solamente in seguito alla pubblicazione di Emil Kraepelin, psichiatra tedesco dell’epoca, il quale pubblicò un trattato, “Psichiatria”, nel quale definiva questa nuova forma di demenza, chiamandola “malattia di Alzheimer”.

Nella caratterizzazione della patologia ha rivestito un ruolo chiave anche un giovane ricercatore italiano, Gaetano Perusini (1879-1915), il quale faceva parte di un gruppo di ricercatori italiani che basavano principalmente la loro preparazione sullo studio anatomico, a discapito delle più seguite teorie non organiche del tempo che ritrovavano la soluzione a tali disordini nel trattamento psicoanalitico.

Perusini studiò 4 casi (compreso quello di Auguste, in maniera più analitica) e pubblicò il suo studio sulla rivista “Histologische und Histopathologische Arbeiten”.

1.2.Diagnosi della patologia

Diagnosticare il morbo di Alzheimer non risulta essere un compito molto semplice in quanto attualmente non esiste un modo “assoluto” per rilevare questo disordine.

La diagnosi richiede un esame medico completo:

- Anamnesi della famiglia del soggetto
- Esame neurologico
- Test cognitivi per valutare memoria e pensiero
- Esami del sangue (per escludere altre possibili cause)
- Imaging del cervello (Brain Imaging)

Nel 1984, l'Associazione dei Malati di Alzheimer ha istituito il criterio diagnostico NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological of Communicative Disorders and Stroke e Alzheimer's Disease and Related Disorder Association), aggiornato nel 2007, che prevede che i deficit di tipo cognitivo vengano riscontrati mediante test neuropsicologici atti a misurare la memoria, il grado di attenzione, la capacità di dialogare e di risolvere problemi e l'orientamento. [4]

Le valutazioni neuropsicologiche e cognitive includono otto ambiti funzionali, in particolare vengono presi in considerazione i seguenti aspetti: memoria, linguaggio, abilità percettiva, attenzione, abilità costruttiva, orientamento, risoluzione di problemi, capacità funzionali.

Tra i sistemi avanzati di imaging biomedico utilizzabili per avere informazioni utili troviamo: tomografia computerizzata (TC), risonanza magnetica (MRI), tomografia ad emissione di fotone singolo (SPECT), tomografia ad emissione di positroni (PET) (Fig. 3); tutte tecniche importanti per escludere altre patologie cerebrali o altri tipi di demenza. Nonostante ciò la conferma istopatologica della diagnosi si può definitivamente ottenere solo post-mortem, tramite un esame al microscopio del tessuto cerebrale.

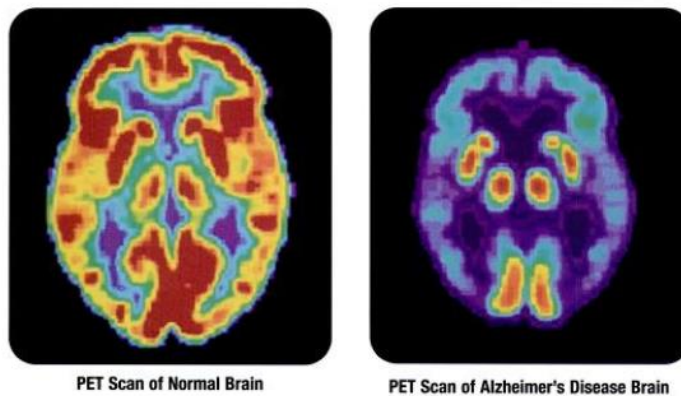


Fig. 3: Confronto scansione PET di un cervello sano e di uno affetto da AD

1.3.Terapia farmacologica attuale

Allo stato delle attuali conoscenze non si dispone di un trattamento capace di impedire la progressione della patologia, riportando il paziente alle condizioni di normalità.

Quello che troviamo in commercio sono farmaci “sintomatici” ovvero farmaci in grado di migliorare le attuali condizioni del paziente e che possono talvolta rallentare la progressione della malattia.

Sono farmaci che devono essere utilizzati nella prima fase della malattia (lieve/moderata), che non sempre risultano funzionali, e che possono avere gravi effetti collaterali.

I farmaci attualmente disponibili sul mercato sono:

- a) Inibitori dell’acetilcolinesterasi: l’AD è caratterizzato da una carenza a livello cerebrale di acetilcolina, neurotrasmettitore fondamentale nei processi di apprendimento e memoria. Questi farmaci hanno l’obiettivo di mantenere equilibrato il livello di ACh, inibendo l’idrolisi di quest’ultima. Sono purtroppo solo in grado di migliorare alcuni sintomi cognitivi e comportamentali e la loro capacità di azione diminuisce man mano che la patologia progredisce. Fanno parte di questa classe di farmaci: Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina (Fig. 4)

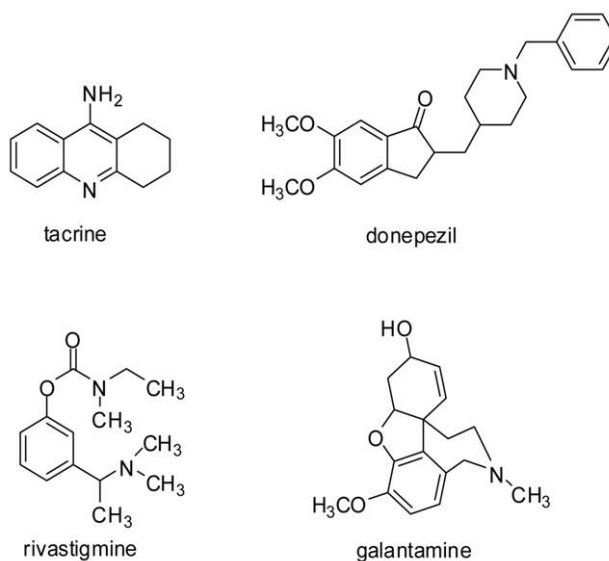


Fig. 4: Inibitori AChE

- b) Antagonisti del NMDA: tra questi troviamo principalmente la Memantina, che può essere utilizzata anche nelle fasi più avanzate; va a compensare gli effetti tossici causati da una eccessiva stimolazione delle cellule nervose (causata da glutammato, essenziale nell'apprendimento e nella memoria). La Memantina si comporta da antagonista non competitivo legandosi direttamente al recettore. La sua azione farmacologica comporta una chiusura dei canali del Ca^{2+} , un calo dei livelli di Ca^{2+} intracellulari e una riduzione degli effetti di neurotossicità ed eccitotossicità.(Fig. 5)

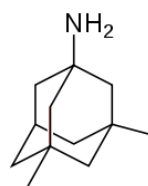


Fig. 5: Struttura Memantina

I limiti del trattamento farmacologico attualmente disponibile in commercio hanno spinto la ricerca ad orientarsi sempre più verso approcci terapeutici alternativi, atti a raggiungere obiettivi come prevenzione e cura e non solo rallentamento dei sintomi caratteristici della malattia.

1.4. Caratteristiche neuropatologiche

1.4.1. Alterazione sistema colinergico

L'acetilcolina (ACh) è un neurotrasmettitore sintetizzato a livello presinaptico a partire dalla colina e dall'acetil-CoA, ad opera dell'enzima colinacetiltransferasi (ChAT). L'ACh sintetizzata viene immagazzinata sotto due forme: una vescicolare e una citoplasmatica. Una volta rilasciata nel vallo sinaptico può andare ad agire su due classi di recettori colinergici: muscarinici e nicotinici (a loro volta suddivisi in sottotipi), questi si trovano sia a livello pre-sinaptico sia post-sinaptico e l'interazione neurotrasmettitore-recettore può avere sia effetto inibitorio che eccitatorio. A seguito dell'azione idrolitica dell'enzima cetilcolinesterasi (AChE), l' ACh viene scissa in colina ed acetato, che possono poi essere ricaptate a livello presinaptico e riutilizzate per la sintesi ex novo del neurotrasmettitore. (Fig. 6)

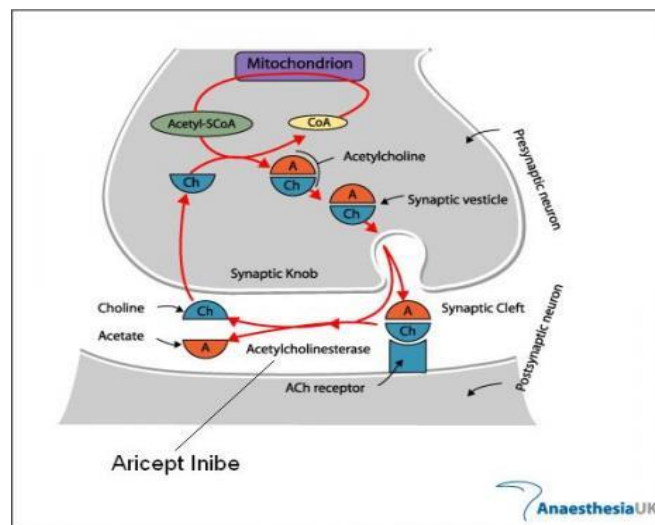


Fig. 6: Rappresentazione schematica della sintesi e della degradazione di ACh

La sindrome di Alzheimer è caratterizzata da un forte decremento della concentrazione e della funzionalità di ACh. Questo deficit e altri deficit presinaptici colinergici, come la perdita di neuroni colinergici e la riduzione dell'attività dell'AChE, sottolineano l'importanza dell'ipotesi colinergica nell'insorgenza dell'AD. [5]

L'acetilcolinesterasi (AChE) appartiene ad una famiglia di enzimi noti come colinesterasi, in cui si ritrova anche la butirrilcolinesterasi (BuChE). Questi due enzimi

sono caratterizzati da una specificità di substrato: l'AChE idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina più velocemente rispetto al tempo richiesto per idrolizzare altri esteri della colina (con catena acilica più ingombrante), mentre la BuChE è in grado di svolgere la sua azione nella stessa maniera indipendentemente dalla grandezza della catena acilica, mostrando quindi un'attività meno selettiva. Altra differenza tra i due enzimi è data dal fatto che AChE presenta una "inibizione da substrato", mentre BuChE risulta attiva solo ad elevate concentrazioni di substrato. È stato però dimostrato che BuChE può idrolizzare ACh e compensare AChE quando vengono esauriti i livelli di quest'ultima [6] (può quindi essere utilizzato anch'esso come target farmacologico nello stadio avanzato della patologia di AD).

L'enzima acetilcolinesterasi presenta due siti di legame: un sito attivo periferico (PAS) e un sito attivo catalitico (CAS) (Fig. 7). Nella struttura tridimensionale dell'enzima il sito attivo catalitico (CAS), è costituito da tre aminoacidi (Ser200, His440, Glu327) che si trovano in una gola stretta e profonda formata da 14 AA, in cui il triptofano 84 è il costituente fondamentale del sito di legame anionico [7]. La superficie della gola corrisponde invece al sito anionico periferico (PAS), il sito allosterico PAS, è localizzato all'entrata della gola ed è formato da 5 residui aminoacidi (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279, Tyr334); l'interazione del ligando con tale sito può indurre un cambiamento conformazionale del sito attivo CAS che permette al ligando stesso di raggiungere il sito esterasico dell'AChE a livello del CAS.

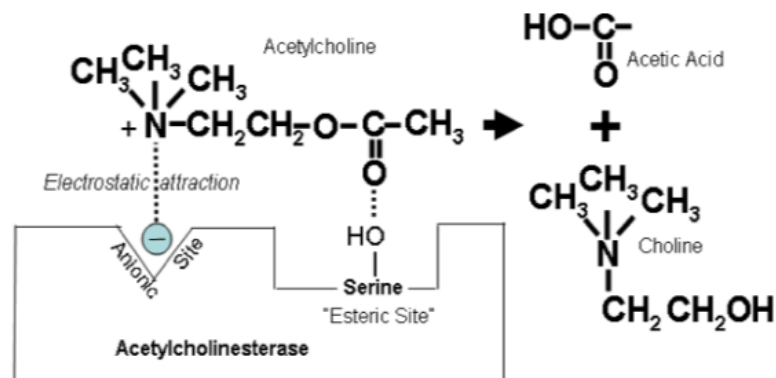


Fig.7: Interazione con il sito attivo dell'AChE e degradazione ACh

È stato recentemente osservato che AChE è coinvolta nella patogenesi dell'AD in quanto sembra influenzare, aumentandola, anche la deposizione di A β . Questo è stato dimostrato in vitro, incorporando AChE a peptidi A β , e in vivo, iniettando AChE nell'ippocampo di ratti, portando così a un significativo deterioramento cognitivo. [8]

L'utilizzo di inibitori delle colinesterasi può quindi, portare ad un aumento dose-dipendente dei livelli di ACh e questo può portare ad un miglioramento della trasmissione colinergica nel cervello dei pazienti affetti da AD e fornire sollievo dei deficit colinergici (cognitivi), caratterizzanti la patologia.

Inibitori colinesterasi: Sono stati sviluppati numerosi inibitori delle colinesterasi (ChE-I), con potenza differente nei confronti di AChE o BuChE, molti dei quali caratterizzati dallo stesso farmacoforo (Fig. 4). [6]

Il primo farmaco inibitore dell'AChE ad esser stato approvato per il trattamento dell'AD fu la Tacrina (noto con il nome commerciale Cognex, approvato nel 1993 dalla FDA) oggi però usato molto raramente a causa della sua epatotossicità. Successivamente sono stati sintetizzati altri tre inibitori dell'acetilcolinesterasi: Donepezil, Rivastigmina e Galantamina, e sono questi tre i farmaci oggi disponibili in commercio per l'attenuazione dei sintomi dell'AD. Il Donepezil, conosciuto con il nome commerciale Aricept, grazie alla sua emivita di circa 70 ore, permette una sola somministrazione giornaliera. Il Donepezil agisce nella fase iniziale della malattia, nel momento in cui è ancora considerata leggera o moderata. A questo stadio i sintomi cognitivi sono ancora lievi e la quotidianità del paziente non è ancor compromessa. La Rivastigmina, conosciuta anche come Exelon, è anch'essa utilizzata per il morbo di Alzheimer, ed è stato osservato che agisce in maniera maggiore per determinate aree cerebrali: ippocampo e corteccia. La Galantamina è stata invece approvata nel 2001. Questa molecola, conosciuta con il nome commerciale di Reminyl, è un alcaloide naturale presente nelle piante della famiglia Amaryllidaceae, in particolare nella *Galanthus Nivalis*. Fin dalla sua scoperta la Galantamina è stata utilizzata per la cura della miastenia grave (debolezza muscolare) e di altre malattie neuromuscolari. Essendo caratterizzata dalla capacità di oltrepassare la BEE e di inibire selettivamente l'acetilcolinesterasi, ne è stato suggerito l'impiego nel trattamento del morbo di Alzheimer. È un farmaco a lunga durata con attività a livello del SNC, privo di tossicità

a livello epatico e con moderati effetti collaterali, di entità simile a quella di altri inibitori dell'acetilcolinesterasi.

Il quadro dei farmaci che appartengono agli inibitori dell'acetilcolinesterasi, quindi, prevede l'utilizzo di Donepezil, Rivastigmina e Galantamina, che risultano tollerati in maniera migliore rispetto alla Tacrina. Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi risultano essere più efficaci se utilizzati subito dopo la diagnosi del morbo di Alzheimer. Per quanto riguarda la posologia per ognuno si inizia con una dose bassa per poi adattarla al singolo individuo, in base alla tollerabilità degli effetti collaterali e ai miglioramenti osservati in un periodo che va da uno a sei mesi. Il profilo degli effetti avversi dei diversi inibitori dell'AChE è simile e comprende: effetti gastrointestinali tra cui nausea, vomito, perdita di peso; oltre a ciò può causare anche effetti neurologici come insonnia, mal di testa, vertigini, sudorazione.

Questi farmaci sono indicati per la fase lieve e moderata della malattia; tuttavia i piccoli benefici che comportano, dal punto di vista dei sintomi cognitivi e comportamentali, diminuiscono con la progressione della malattia [9].

1.4.2. Aggregazione β amiloide

Molte delle ricerche sull'AD sono oggi focalizzate sull'ipotesi della cascata amiloide, studiata per la prima volta nel 1991 dal gruppo di ricerca del Dr. Selkoe. (Selkoe, 1991). L'ipotesi beta-amiloide è nata in seguito all'osservazione post mortem di placche senili (Fig. 8) in cervelli affetti da AD. Queste placche sono costituite da aggregati insolubili di proteina A β e sono state osservate in particolari regioni del cervello come cervelletto, nucleo striato e talamo. [10]

In seguito a tale osservazione sono state ormai riconosciute tra le cause principali dell'insorgenza dell'Alzheimer un'alterazione dell'espressione della proteina APP (precursore della proteina β amiloide) e una serie di cambiamenti nella solubilità dell'amiloide β , che va di conseguenza a formare aggregati, responsabili della formazione di vere e proprie placche.

L'accumulo di A β con formazione di veri e propri aggregati, dà inizio a una serie di eventi a cascata che includono: processi infiammatori, formazione di grovigli neurofibrillari e perdita di neurotrasmettitori [11].

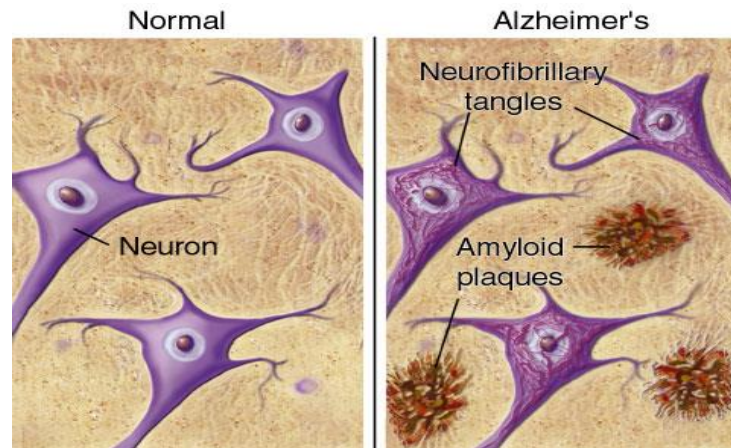


Fig.8: Confronto tra neuroni sani (a sinistra) e neuroni affetti da AD, caratterizzati dalla presenza di placche amiloidi interneuroni (a destra)

La proteina APP è espressa su diversi tipi di cellule (in particolare cervello, cuore, milza e reni) e pone l'estremità N-terminale rivolta verso il dominio extracellulare, mentre l'estremità C-terminale risulta localizzata nel dominio citoplasmatico della cellula [12]. È il precursore della proteina di membrana amiloide che ha la funzione di promuovere la crescita cellulare.

Il processo di degradazione proteolitica dell'APP avviene grazie agli enzimi denominati secretasi (α -, β - e γ secretasi).

In condizioni fisiologiche la proteolisi della APP è catalizzata dalla α -secretasi: conduce alla formazione di un frammento solubile chiamato APP α , che viene rilasciato a livello transmembranale; successivamente interviene la γ secretasi che genera il peptide p3, completamente innocuo (*pathway non amiloidogenico*).

Nei soggetti affetti da morbo di Alzheimer invece, prevale il *pathway amiloidogenico*. Quest'ultimo è caratterizzato dalla proteolisi di APP a livello della sua estremità C-terminale ad opera della β -secretasi, dell'APP. Il frammento peptidico così ottenuto subisce una nuova scissione idrolitica da parte della γ -secretasi in due peptidi di β amiloide, rispettivamente di 40 e 42 amminoacidi ($\alpha\beta 1-40$ e $\alpha\beta 1-42$); questi sono in grado di assumere la conformazione a foglietto- β e di aggregarsi a formare fibrille. (Fig. 9)

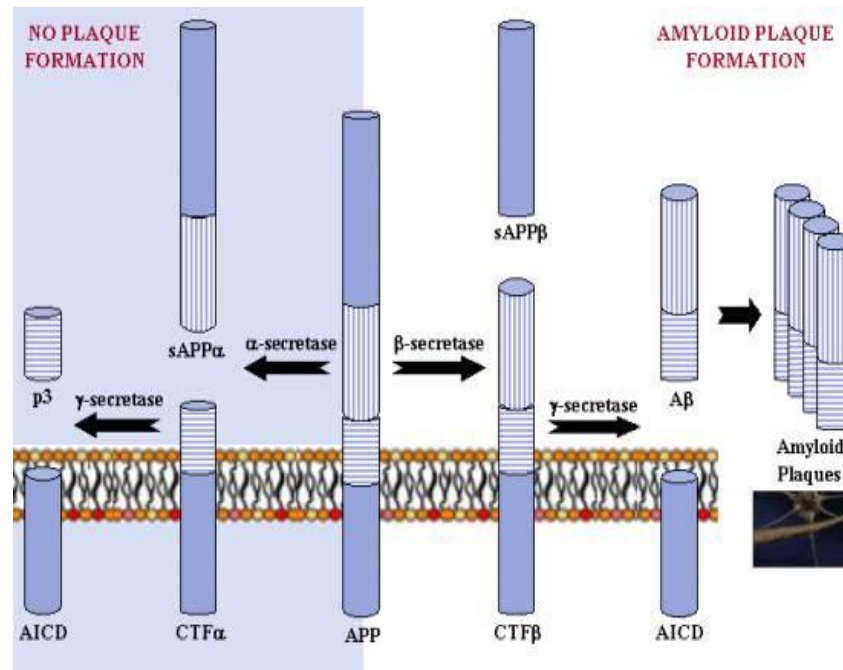


Fig.9: Taglio proteolitico dell'APP a carico dell' α -secretasi e della β -secretasi

Entrambe queste forme di beta-amiloide non presentano le caratteristiche biologiche della forma naturale ed hanno addirittura un effetto tossico sul neurone. In particolare l'A β 1-42 sembra piú neurotossico rispetto al piú abbondante peptide A β 1-40, [13]. A seguito della morte del neurone, i frammenti amiloidi vengono liberati nello spazio extracellulare e tendono a depositarsi in aggregati fibrillari insolubili che costituiscono le tipiche placche amiloidi al cui interno sono stati identificati anche metalli pesanti quali Cu, Fe e Zn. Tali placche innescano processi infiammatori ed immunitari che danneggiano irreversibilmente i neuroni.

Oggi l'attenzione della ricerca risulta essere particolarmente focalizzata sullo sviluppo di composti in grado di agire sull'aggregazione amiloide, ma sono molecole ancora in fase di sperimentazione.

Inibitori γ -secretasi: I primi composti sviluppati con l'intento di inibire l'aggregazione della β amiloide avevano come target biologico la γ -secretasi, responsabile della proteolisi di APP che porta alla produzione di frammenti A β , principali costituenti delle placche amiloidi.

Tra questi inibitori troviamo il Semagacestat, utilizzato nel IDENTITY (Interruzione Demenza Di Alzheimer, Tramite la Valutazione del Trattamento della Patologia

Amiloide). È quindi stato condotto uno studio random, in doppio cieco, controllato con placebo; lo studio clinico è stato condotto negli USA in 21 paesi, su 1500 partecipanti, per una durata di 21 mesi. Il 17 agosto 2010 è stato annunciato il fallimento delle prove di fase III. I risultati preliminari mostravano infatti non solo un mancato rallentamento della progressione della malattia, ma anche un “peggioramento delle misure cliniche di cognizione e della capacità di svolgere le attività della vita quotidiana”; inoltre era stato osservato un aumento dell’incidenza del cancro della pelle. [14]

L’utilizzo degli inibitori della γ -secretasi non ha portato agli effetti desiderati vista la natura aspecifica di tale enzima e l’interesse si è spostato sulla ricerca di inibitori delle β secretasi.

1.4.3. Grovigli neurofibrillari

I grovigli neurofibrillari (NFTs) furono descritti per la prima volta da Alzheimer.

Ogni neurone ha un citoscheletro, ovvero una struttura interna di supporto, costituita in gran parte da strutture chiamate microtubuli (MT). La proteina tau è una proteina filamentosa che ha la funzione di stabilizzare queste strutture tubulari (Fig. 10) ed inoltre permette la formazione di legami con altre componenti del citoscheletro. [10, 12].

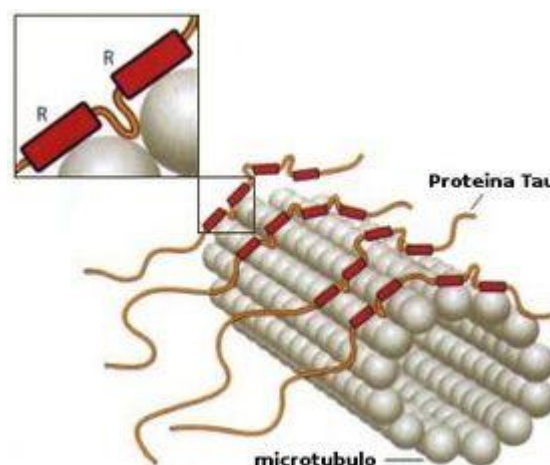


Fig. 10: Proteina tau, stabilizzazione microtubuli

Nell’AD la proteina tau subisce dei cambiamenti chimici e diviene iperfosforilata per azione di specifiche chinasi e fosfatasi. In seguito all’azione di questi enzimi la proteina subisce dei cambiamenti conformazionali che ne impediscono la stabilizzazione dei microtubuli (influenzandone la capacità di legarsi alla tubulina e quindi di promuovere

l'assemblaggio microtubulare) ed, oltre a ciò, tende ad aggregarsi con altri frammenti dando origine a grovigli neurofibrillari (Fig. 11), responsabili del deterioramento del sistema di trasporto neuronale.

Questi grovigli intraplasmatici insolubili (NFTs) infatti vanno ad avvolgere il nucleo stesso del neurone, privandolo della sua attività biologica e causando tossicità cellulare tali da condurre alla morte neuronale, con conseguente demenza cognitiva.

Le principali proteine chinasi coinvolte nella modificazione della proteina tau e nella formazione dei grovigli neurofibrillari sono GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) e CDK5 (cyclin-dependent kinase-5), la cui attività è indotta dalla sovrapproduzione di β -amiloidi e dall'aumento della concentrazione di ioni Ca²⁺.

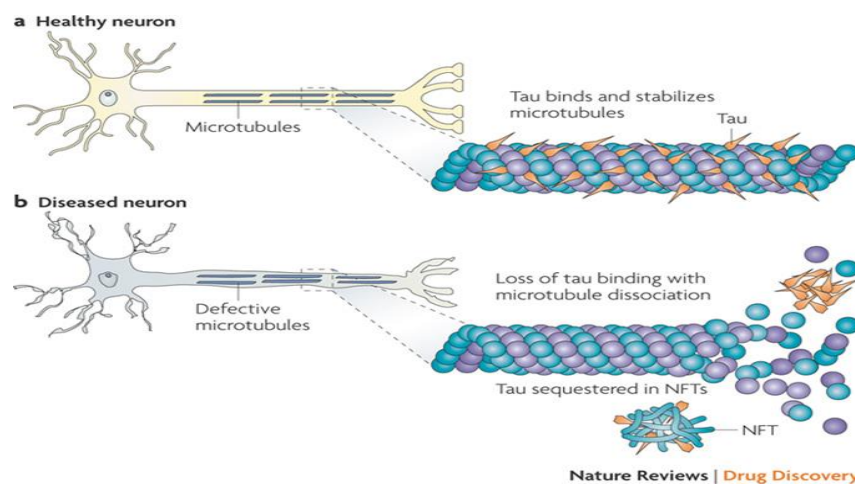


Fig. 11: Formazione grovigli neurofibrillari, confronto con neurone in condizioni fisiologiche

Lo sviluppo di tali cambiamenti a livello della proteina tau è stato osservato essere direttamente correlato all'età del paziente (una delle cause eziologiche più comuni dell'AD è infatti costituita proprio dall'età). La formazione dei grovigli neurofibrillari (Fig. 12) dà disfunzioni neuronali e morte cellulare in quanto è correlata ad alterazioni della trasmissione sinaptica, alterazioni della plasticità cellulare, eccitotossicità, stress ossidativo e neuroinfiammazione. [15]

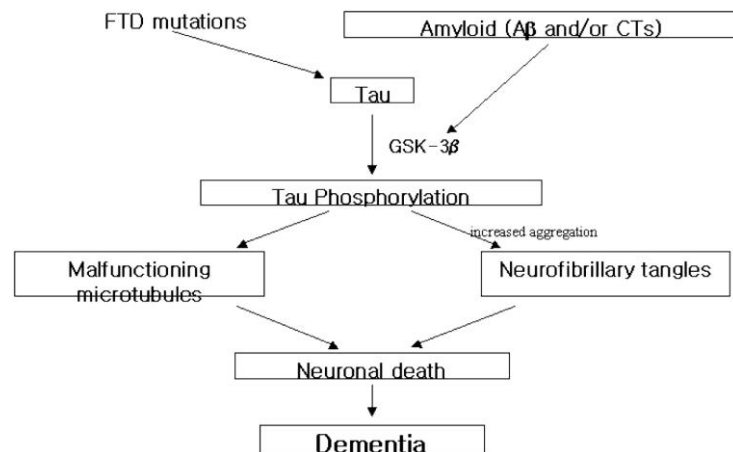


Fig.12: Alterazioni proteina tau con conseguenze correlate

Proteina tau come target: A causa della distruzione dei microtubuli e della formazione di veri e propri grovigli neurofibrillari, l'iperfosforilazione della proteina tau può influenzare l'insorgenza di sintomi caratteristici dell'AD.

È coerente quindi ipotizzare che la proteina tau possa rappresentare un target biologico interessante per lo sviluppo di composti capaci di contrastare e prevenire i sintomi dell'AD.

Tra le varie molecole capaci di interagire con questa proteina si ritrovano:

- I. Farmaci stabilizzanti i microtubuli: tra cui il Paclitaxel. Tale farmaco è stato studiato in vivo in un modello di topo affetto da disordini della proteina tau. Purtroppo però sono stati riscontrati problemi di biodisponibilità che non hanno consentito di proseguire gli studi.
- II. Inibitori della tau-chinasi: i grovigli neurofibrillari si originano a seguito della iperfosforilazione della proteina tau da parte delle chinasi CDK-5 e GSK-3, ma tale azione enzimatica è in realtà preceduta dalla fosforilazione, da parte dell'enzima MARK (Microtubule Affinity Regulating Kinase), del dominio di legame della proteina tau con i microtubuli. Sono stati quindi progettati inibitori della MARK che sono al momento in fase di studio preclinico.
- III. Attivazione fosfatasi: è stato osservato che nell'AD si ha uno squilibrio tra l'attività delle chinasi e delle fosfatasi, che può portare ad un'anormale

iperfosforilazione della proteina tau. L'attivazione di una proteina fosfatasi, come la fosfatasi 2A, può essere presa in considerazione come ipotesi per contrastare l'eccessiva fosforilazione della proteina tau (che può così essere defosforilata). [15]

Nel luglio 2008 alcuni ricercatori hanno inoltre annunciato i risultati positivi ottenuti dallo studio effettuato con il cloruro di metiltioninio (Fig. 13) (MTC), un farmaco in grado di dissolvere i polimeri tau. Dati della fase II indicano che tale farmaco è in grado di modificare il decorso della patologia nella fase lieve/moderata. [16]

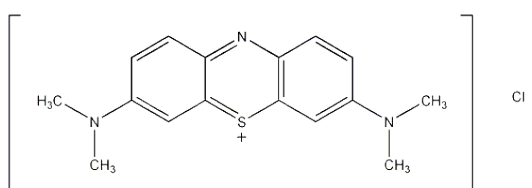


Fig. 13: Struttura metiltioninio

1.4.4. Stress ossidativo

Con il termine ossidazione si intende il processo fisiologico, che tutte le cellule prima o poi subiscono, di invecchiamento e danneggiamento; questo processo avviene per mezzo dei radicali liberi, che danno luogo a reazioni chimiche di ossidazione.

I radicali liberi sono molecole o frammenti di molecole che contengono uno o più elettroni spaiati e la presenza di questi fa sì che siano caratterizzati da un'elevata reattività e instabilità. Essendo caratterizzati dalla mancanza di un elettrone cercano di compensare a ciò "rubando" elettroni da altre specie e dando origine ad una catena di produzione di molecole secondarie che risultano dannose per proteine e DNA. La classe di radicali più importanti è quella derivante dall'ossigeno; questa classe coinvolge l'anione radicale superossido ($O_2\cdot^-$) che può derivare sia da processi metabolici che da una attivazione causata da irradiazione.

La formazione di radicali liberi non è sempre totalmente naturale e fisiologica; sono molti i fattori che possono scatenare la generazione di radicali liberi (Fig. 13). Principalmente le cause vanno riscontrate in fattori ambientali come inquinamento, fumo attivo e passivo, raggi ultravioletti, stress psicofisico prolungato, e in fattori legati al soggetto come trasporto di elettroni nel mitocondrio, metabolismo degli acidi grassi,

reazioni del citocromo p450, i sistemi ricondizionanti delle cellule fagocitarie; anche uno stile di vita non corretto ne accelera la formazione (alcol, dieta scorretta, fumo, abuso di farmaci...).

In condizioni fisiologiche la presenza di queste specie radicaliche è regolata dalla presenza di antiossidanti naturali come glutatione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi.

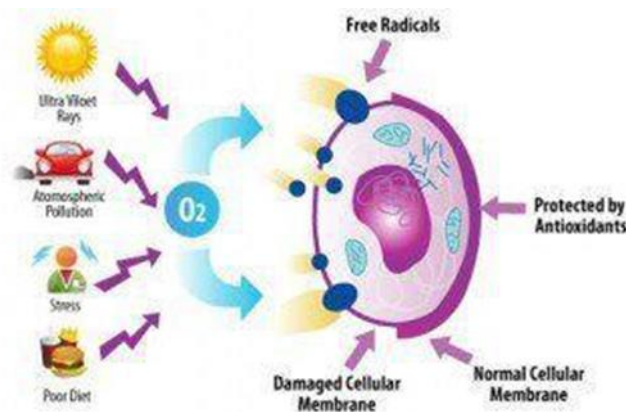


Fig. 13: Schema dei vari fattori che possono favorire la formazione di ROS

Il danno ossidativo è una condizione patologica in cui si verifica uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la presenza di antiossidanti capaci di contrastarne l'azione. Lo stress ossidativo è ritenuto essere coinvolto nella patogenesi di diverse malattie neurologiche, neurodegenerative, demielinizzanti e cerebrovascolari [17] in quanto causa gravi danni tissutali.

I tessuti però non hanno tutti la stessa suscettibilità allo stress ossidativo; il tessuto neuronale, per esempio, a causa del suo basso livello di enzimi antiossidanti e dell'elevato contenuto di substrati ossidabili, è estremamente sensibile a questa specie di danno.

Il cervello è ricco di acidi grassi facilmente perossidabili; è responsabile di circa il 20% del consumo totale di ossigeno (nonostante il suo peso sia pari al 2% del peso corporeo totale); possiede scarsi sistemi antiossidanti (l'attività della catalasi presente nell'encefalo è circa il 10% di quella epatica) ed al contrario ha un alto contenuto di ioni ferro ed ascorbato che formano potenti composti pro-ossidanti per le membrane cellulari.

Tali caratteristiche anatomiche e fisiologiche fanno sì che il cervello risenta in maniera particolare di tale stress e nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer, per esempio, si registra non solo la sovrapproduzione di ROS quali ad esempio superossido ($O_2\cdot^-$), perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicale idrossilico ($OH\cdot$), prodotte da mitocondri e metalli pesanti, ma anche un incremento delle specie reattive dell'azoto (RNS) quali ossido nitrico ($NO\cdot$) e perossinitrito (ONOO). [18]

Nell'AD inoltre sono state riscontrate concentrazioni molto più elevate di NO rispetto a quello normalmente prodotto nella microglia (dove agisce da messaggero intra e inter cellulare), e questo va a coniugarsi con specie reattive come il superossido, andando a formare i perossinitriti, specie altamente tossiche. Lo stress nitrosativo, caratterizzato dalla formazione di specie azotate reattive (RNS) parallelamente allo stress ossidativo rappresentano due processi importanti coinvolti nella fisiopatologia di AD.

Recentemente è stata dimostrata anche una stretta correlazione tra lo stress ossidativo e l'aggregazione di A β . Diversi studi indicano il ruolo centrale dell'A β amiloide nel promuovere l'accumulo di radicali liberi nei neuroni e nella glia delle regioni cerebrali vulnerabili di pazienti affetti da AD. E' stata inoltre evidenziata l'esistenza di una chiara relazione tra i marcatori dello stress ossidativo ed i depositi di amiloide e la degenerazione neurofibrillare [19].

Terapia antiossidante: Dato che il danno ossidativo sottende a diverse patologie neurodegenerative, tra cui l'AD, la ricerca neuroscientifica ha focalizzato la sua attenzione anche sull'identificazione di molecole antiossidanti come potenziali terapie per l'AD [20].

I farmaci con proprietà antiossidanti possono intervenire nei processi che caratterizzano l'invecchiamento cellulare. Sembra infatti che il loro impiego possa "rallentare" i meccanismi che portano alla perdita delle cellule cerebrali. Sono solitamente ben tollerati e tendono ad avere rari effetti collaterali; vanno però ad agire principalmente sull'autonomia dello svolgimento delle attività quotidiane e non direttamente sulla memoria o sulle altre funzioni cognitive. Studi futuri dovranno analizzare e dare maggiori conferme riguardo la loro efficacia ma i dati attualmente disponibili risultano incoraggianti.

Sono stati condotti dei primi studi su composti estratti dalle foglie di Ginko Biloba, una pianta subtropicale ad azione neurotrofica, antiossidante e antiinfiammatoria, che ne hanno documentato una modesta efficacia sulle funzioni cognitive e comportamentali. [21]

L'attenzione si è focalizzata sempre più su una varietà di composti naturali, detti nutraceutici, con capacità antiossidanti e protettive nei confronti dei sistemi neuronali.

L'importanza della nutraceutica

Il termine nutraceutica è un neologismo tra le parole “nutrizione” e “farmaceutico”, coniato da Stephen De Felice il quale definì “nutraceutico, un alimento, o parte di un alimento, in grado di produrre benefici salutari, che includono trattamento e prevenzione di particolari patologie.” [22]

Ci sono classi chimiche di nutraceutici in tutti i tipi di alimenti. Alcuni alimenti quotidianamente assunti contenenti importanti nutraceutici sono mostrati nella figura che segue (Fig. 14):


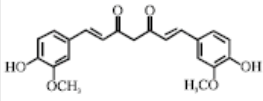

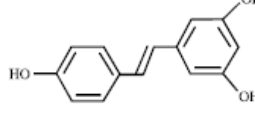

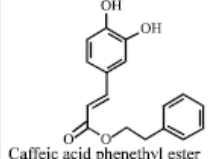

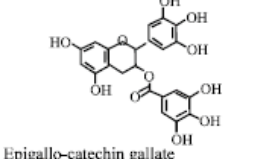

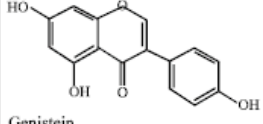

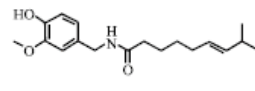

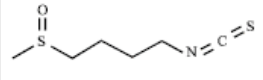

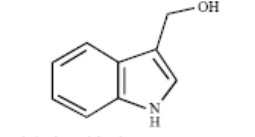

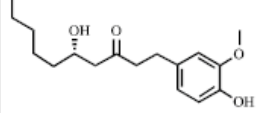

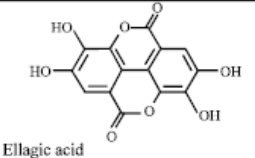
Natural source	Chemopreventive phytochemicals	Natural source	Chemopreventive phytochemicals
	 Curcumin		 Resveratrol
	 Caffeic acid phenethyl ester		 Epigallo-catechin gallate
	 Genistein		 Capsaicin
	 Sulphoraphane		 Indole-3-carbinol
	 [6]-Gingerol		 Ellagic acid

Fig. 14: Esempi di alimenti contenenti nutraceutici

Generalmente nei prodotti nutraceutici troviamo dosi molto superiori dei principi attivi rispetto a quelle che si trovano naturalmente all'interno dei cibi, considerando la loro bassa tossicità nell'organismo. Il mercato di questi prodotti ha avuto in questi ultimi anni una crescita esponenziale grazie alla propagazione sempre più allargata di questi dati. Supplementi alimentari sono fortemente raccomandati come strategia per combattere e prevenire particolari patologie: è infatti ormai accertato che una dieta non bilanciata può essere per esempio uno dei fattori che possono influenzare l'insorgenza dell'AD.

È stata riconosciuta l'attività preventiva di una dieta bilanciata nell'insorgenza di molte patologie, ma oltre a ciò lo studio di antiossidanti naturali risulta sempre più accentuato per la capacità di questi composti di contrastare la sbilanciata ed eccessiva presenza di radicali liberi (Fig. 15) in disordini come AD.

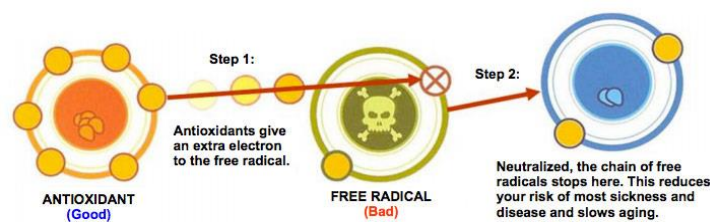


Fig. 15: Effetto antiossidanti sui radicali liberi

Il metodo utilizzato per determinare l'intrinseca attività anti-radicalica degli antiossidanti prevede l'utilizzo del DPPH (2,2- difenil-1-picridrazil); in particolare viene analizzata la capacità di questi presunti antiossidanti di catturare il DPPH (che agisce da radicale libero).

1.4.5. Alta concentrazione metalli pesanti

L'*ipotesi degli ioni metallici* nacque in seguito alla scoperta di una caratteristica disomeostasi degli ioni metallici in pazienti affetti da AD, in particolare dei livelli di ferro (Fe), zinco(Zn) e rame (Cu).

Alcuni studi hanno evidenziato la presenza di un livello particolarmente accentuato dei livelli di Fe^{3+} non-eme in particolari aree cerebrali di pazienti affetti da AD [23].

Oltre al Fe, sono protagonisti dell'insorgenza e accentuazione dell'AD, lo Zn e il Cu. Questi due metalli svolgono infatti ruoli essenziali in processi come: apoptosi, stress

ossidativo, difesa immunitaria, coordinazione motoria, processi di memoria; quindi una loro disomeostasi può indurre eventi patologici.

Lo zinco si trova nelle vescicole neuronali in forma libera o chelabile (Zn^{2+}); viene rilasciato insieme al glutammato nello spazio sinaptico in seguito all'attivazione neuronale e va quindi ad interagire con diversi recettori, canali ionici e trasportatori. Il glutammato va a stimolare il recettore NMDA, mentre lo zinco va ad inattivarlo, svolgendo un'azione modulatoria. Questo ione (Zn^{2+}) è però anche in grado di legarsi a APP: l'interazione tra Zn^{2+} e il sito di legame dell' α -secretasi porta ad un'inibizione del pathway non amiloidogenico, lasciando così APP libera per subire il taglio proteolitico ad opera della β -secretasi, e successivamente della γ -secretasi incrementando così la formazione di placche A β . Il legame tra APP e Zn implica anche un sequestro di Zn circolante a livello neuronale, compromettendo così l'omeostasi sinaptica corretta.

Il rame invece viene rilasciato dal lato post sinaptico del vallo, solo in seguito all'attivazione del recettore NMDA ed è anch'esso importante nella regolazione sinaptica. Il rame si trova principalmente nella forma Cu^+ ed è un componente essenziale di enzimi come citocromo c ossidasi, tirosinasi e superossido dismutasi, quindi uno sbilanciamento dei suoi livelli può causare danni cellulari importanti. Nelle placche β -amiloidi è stata però riscontrata anche la presenza di rame, sotto forma di ione Cu^{2+} , che sembra vada ad interagire con la proteina A β promuovendone l'aggregazione. (Fig. 16)

In generale quindi i peptidi A β , una volta aggregati tra loro, tendono a reagire con i metalli di transizione, come lo zinco e il rame, i quali inducono una rapida precipitazione di A β : il rame si lega ad A β e dà legami ossidativi incrociati tra i monomeri; le specie incrociate sono molto difficili da eliminare e vanno a causare morte neuronale. Il rame, vincolato ad A β può inoltre generare radicali liberi che producono danni e morte cellulare. [24]

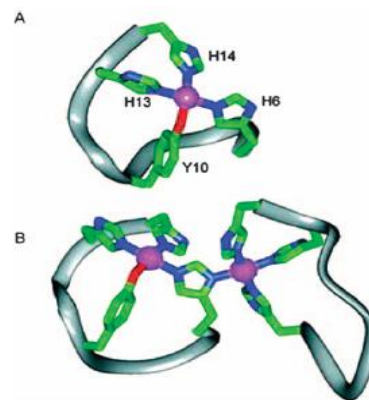


Fig. 16: (A) sito di legame del Cu_{2+} a livello di APP, (B) Aggregazione tramite ponte a His tra due atomi di rame, a formare un dimerico.

Utilizzare composti in grado di chelare i metalli pesanti presenti in maniera disequilibrata dovrebbe impedire o almeno limitare l'interazione con le proteine $\text{A}\beta$ e quindi potrebbe avere un'azione preventiva e curativa.

Studi recenti quindi si focalizzano sulla ricerca di molecole che possano svolgere tale attività.

2. STRATEGIE TERAPEUTICHE

2.1. Obiettivo futuro... approccio multitarget

Ad oggi è ormai noto che fattori come aggregazione β -amiloide, formazione di grovigli neurofibrillari, stress ossidativo, squilibrio di metalli e diminuzione dei livelli di acetilcolina, giocano un ruolo essenziale nell'eziologia dell'AD, ma ancora non risulta chiaro come riuscire a contrastare tutto ciò. Proprio per la sua complessità il morbo di Alzheimer viene descritto come un disordine multifattoriale. [25] (Fig.17)

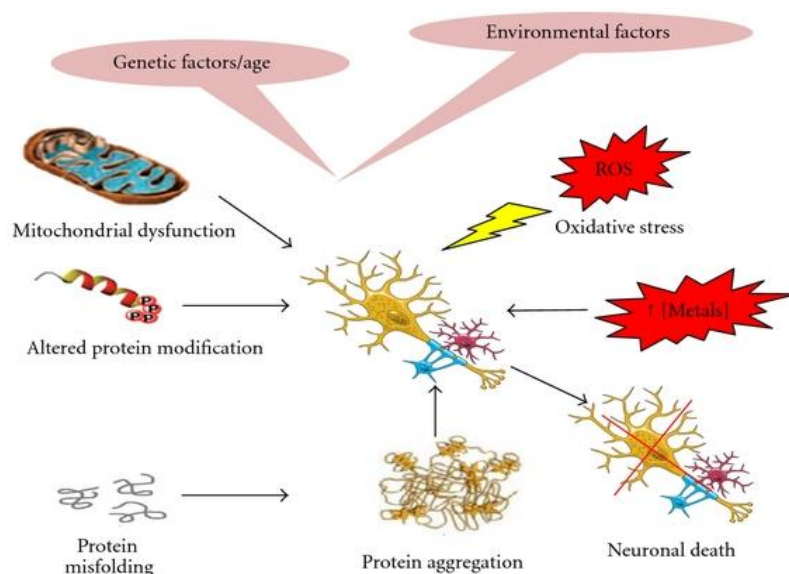


Fig. 17: Diversi fattori associati al disordine multifattoriale dell'Alzheimer

La terapia attualmente presente in commercio prevede l'utilizzo di trattamenti farmacologici costituiti da terapie sintomatiche ovvero terapie in grado di migliorare le condizioni del paziente, attenuarne i sintomi e incrementarne le aspettative di vita, cercando di ridurre la progressione della patologia. L'efficacia delle terapie attualmente disponibili rimane però ancora limitata.

Le terapie multitarget potrebbero rappresentare una alternativa alle terapie attualmente disponibili. Da un punto di vista teorico, tali composti "multitarget" dovrebbero essere capaci di agire sul sistema biologico in maniera più efficace, data la natura promiscua di questi composti.

Dato che l'AD è caratterizzato da una complessa rete di eventi patologici, l'approccio multitarget sembra essere la soluzione migliore per cercare di ottenere effetti benefici di questa malattia.

Di seguito sono elencati una serie di classi di "ibridi farmacologici" ottenuti dalla combinazione di porzioni farmacoforiche ad azione anticolinesterasica, con porzioni ad attività antiossidante e ad attività chelante.

2.1.1. Inibitori delle colinesterasi combinati con antiossidanti

Attualmente in commercio le molecole presenti per il trattamento dell'AD appartengono principalmente alla classe degli inibitori delle acetilcolinesterasi; è per questo che il più comune approccio per disegnare molecole multifunzionali consiste nel modificare gli inibitori di AChE attualmente conosciuti, dotandoli di attività aggiuntive nel trattamento dell'AD. [26] La Tacrina è stato il primo inibitore dell'AChE ad essere stato messo in commercio per il trattamento dell'AD e la sua struttura si trova in moltissime delle molecole multitarget sintetizzate negli ultimi anni, in quanto è in grado di inibire AChE con una elevata potenza ed inoltre è caratterizzata da un basso peso molecolare, che la rende un bersaglio ottimale per subire modifiche [27]. L'utilizzo di antiossidanti oltre a ridurre l'epatotossicità riscontrata nella Tacrina come ampiamente discusso in precedenza può svolgere un ruolo critico nel trattamento dell'Alzheimer dato che lo stress ossidativo rappresenta una delle principali concause neuropatologiche scatenanti AD.

- Tacrina – Silibinina [28] :

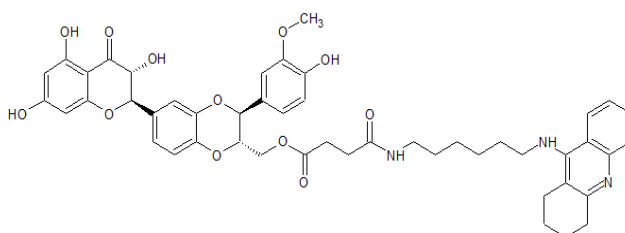


Fig. 18: Ibrido Tacrina- Silibinina

- Tacrina – Cistamina [29] :

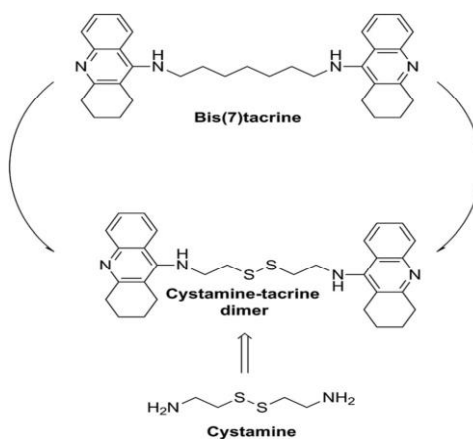


Fig.19: Ibrido tra bis-tacrina e cistamina

La figura 19 mostra una molecola ibrida ottenuta per combinazione della bis-tacrina (già di per se molecola ibrida della Tacrina, ad attività anticolinesterasica) e la cistamina (molecola di per se antiossidante). Tale composto presenta un'ottima attività inibitoria duale, in vitro, dell'AChE e della BuChE.

Le molecole indicate in figura hanno mostrato un miglioramento delle proprietà farmacologiche della molecola nativa (Tacrina) e una riduzione dell'epatotossicità. I risultati positivi hanno dato inizio alla sintesi di numerose molecole ibride AChEI-antiossidanti.

Altro antiossidante utilizzato per la formazione di composti ibridi è stato il Trolox.

Il Trolox o acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carbossilico è un potente antiossidante con diverse applicazioni biologiche/biochimiche sia in vitro che in vivo, è un analogo della vitamina E, ed è stato utilizzato per sviluppare nuovi analoghi (Fig. 20) ibridi:

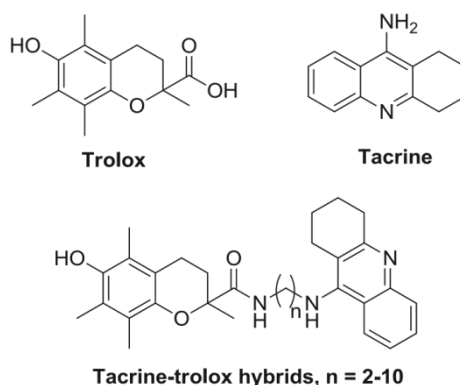


Fig. 20: Strutture Trolox, Tacrina e ibrido Trolox-Tacrina

Tra le molecole sintetizzate il composto con uno spaziatore a sei atomi di carbonio risulta quello maggiormente potente nell'inibizione delle colinesterasi, e risulta particolarmente attivo nei confronti di BuChE ($IC_{50} = 9.8$ nM per eeAChE e 23.5 nM per hAChE / $IC_{50}=20.5$ nM per hBuChE). Da studi cinetici e molecolari è inoltre emerso che il composto in figura 21 è un inibitore misto in quanto si lega sia al sito CAS che al sito PAS. Risulta meno tossico della Tacrina, ha una miglior capacità di superare la BEE e svolge un buon effetto neuroprotettivo. [30]:

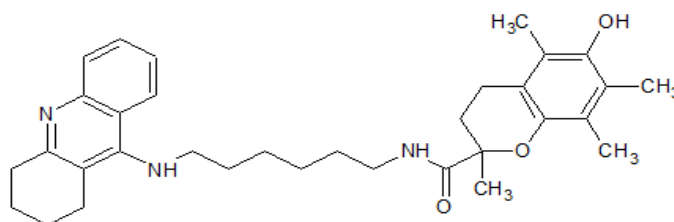


Fig. 21: Ibrido più promettente tra Tacrina e Trolox

La Tacrina è stata anche condensata con diversi antiossidanti appartenenti alla classe degli acidi polifenolici.

Tra queste risultano particolarmente rilevanti la condensazione con l'acido ferulico (Fig. 22), che ha dimostrato avere forte azione neuroprotettiva grazie alla riduzione della formazione di ROS, azione antiossidante mantenuta dell'acido ferulico originario e, oltre a ciò, ha anche mostrato di aumentare l'attività della colina O-acetiltransferasi e di inibire efficacemente AChE ($IC_{50} = 11nM$). [31]

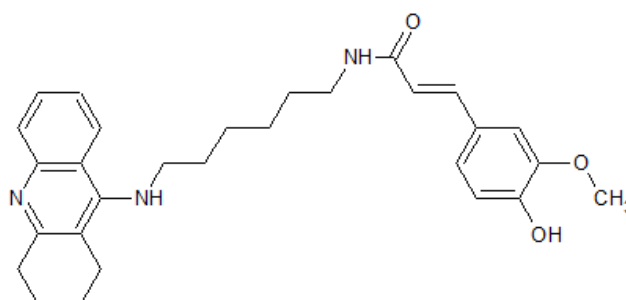


Fig. 22: Ibrido tacrina- acido ferulico (caratterizzato da linker alchilamminico)

Altra condensazione rilevante (Fig. 23) è risultata quella con l'acido caffeico [32] :

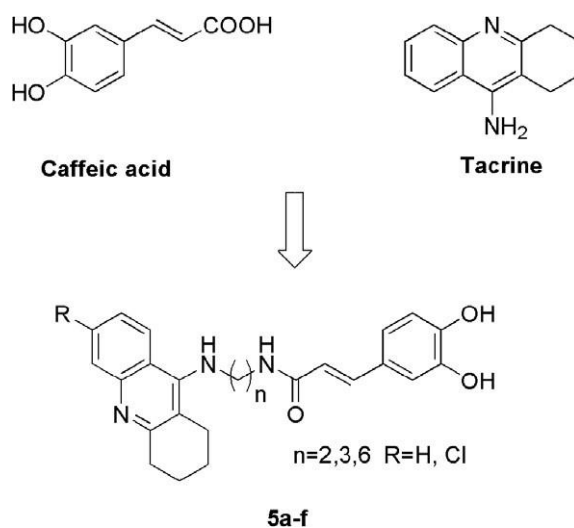


Fig. 23: Condensazione tra acido caffeico e Tacrina

Questa classe di composti ibridi della Tacrina con l'acido caffeico sono chiamati T3CA ed in vitro hanno dimostrato attività antiossidante, neuroprotettiva e chelante del rame. Il più attivo risulta quello caratterizzato da $n=3$ e $R=Cl$. [32]

Oltre alla Tacrina, basandosi sullo stesso principio, sono stati utilizzati anche altri inibitori dell'AChE come base per ottenere nuove molecole ibride AChEI-antiossidanti, con azione sinergica.

La Rivastigmina, per esempio, è un composto contenente un carbammato; è stato approvato il suo utilizzo nel trattamento dell'AD dal FDA come inibitore sia dell'AChE che della BuChE. Dai test clinici è risultata non in grado di bloccare la progressione della malattia, ma solo di attenuarne i sintomi in maniera moderata (farmaco sintomatico). Gli studi hanno dimostrato che il farmacoforo responsabile dell'inibizione colinesterasica è costituito dalla porzione carbammica e che essa si lega covalentemente all'enzima e rimane ancorato fino a che non intervengono meccanismi di idrolisi, per questo è stato ipotizzato potesse essere favorevole utilizzare tale farmacoforo per ottenere nuove molecole ibride, combinate con antiossidanti.

Tra gli antiossidanti che sono stati combinati con la Rivastigmina a tale scopo troviamo la Scutellarina.

La Scutellarina (4,5,6 triidroflavone 7 glucuronide) è il componente maggiormente attivo della breviscapina, estratta da una pianta cinese "Erigeron Breviscapus" :

possiede una serie di proprietà correlate ai disordini neurologici come azione antiradicalica, azione chelante di metalli e molecola neuroprotettiva in grado di inibire la formazione di fibrille A β . È però caratterizzata da una bassa solubilità, basso assorbimento per via orale e bassa permeabilità della BEE che ne restringono l'uso come tale nell'AD.[33]

Combinando però le due molecole (Fig. 24) sono stati ottenuti una serie di ibridi che hanno mostrato una buona inibizione colinesterasica, attività antiossidante e chelante dei metalli e un'azione neuroprotettiva. [33]

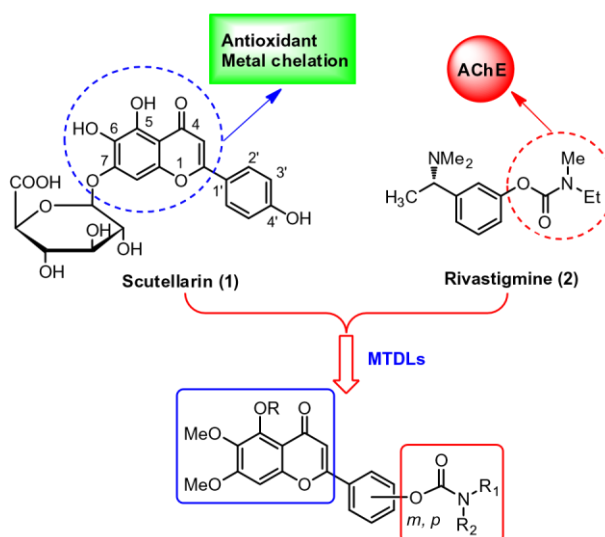


Fig. 24: Derivati Scutellarina – carbammati

2.1.2. Inibitori delle colinesterasi e chelanti di metalli

L'utilizzo di chelanti di metalli per la terapia dell'AD presenta dei limiti essenzialmente legati alla mancanza di specificità di legame. In effetti, la loro capacità di chelare i metalli essenziali in funzioni fisiologiche dell'organismo, provocava gravi effetti collaterali e citotossici.

La ricerca si è quindi focalizzata sullo sviluppo di farmaci multitarget ovvero farmaci caratterizzati da un'azione chelante con attività maggiormente specifica nei confronti di metalli pesanti addizionati di ulteriori proprietà farmacologiche.

I farmaci sviluppati sono in realtà principalmente profarmaci multifunzionale, chiamati in questo caso prochelanti, ovvero molecole che subiscono un'attivazione in vivo.

L'attivazione di questi prodrugs scaturisce in seguito allo sviluppo di uno stress ossidativo che causa un aumento del livello di ROS, l'aumento di questi provoca il rilascio del farmaco nella sua forma attiva a livello cerebrale, dove va a complessare l'eccesso di metalli pesanti, impedendone la precipitazione in aggregati β amiloidi.

Un esempio è costituito dalla combinazione tra un'amalgama dei farmacofori degli inibitori colinesterasici della Rivastigmina e del Donepezil con la struttura chelante bifunzionale HLA20. (Fig. 25)

HLA20 ha proprietà neuroprotettive e chelanti; è inoltre caratterizzato dalla capacità di ridurre lo stress ossidativo e di inibire l'aggregazione $A\beta$, fortemente correlata ad un eccesso di metalli pesanti quali Zn e Cu. [34]

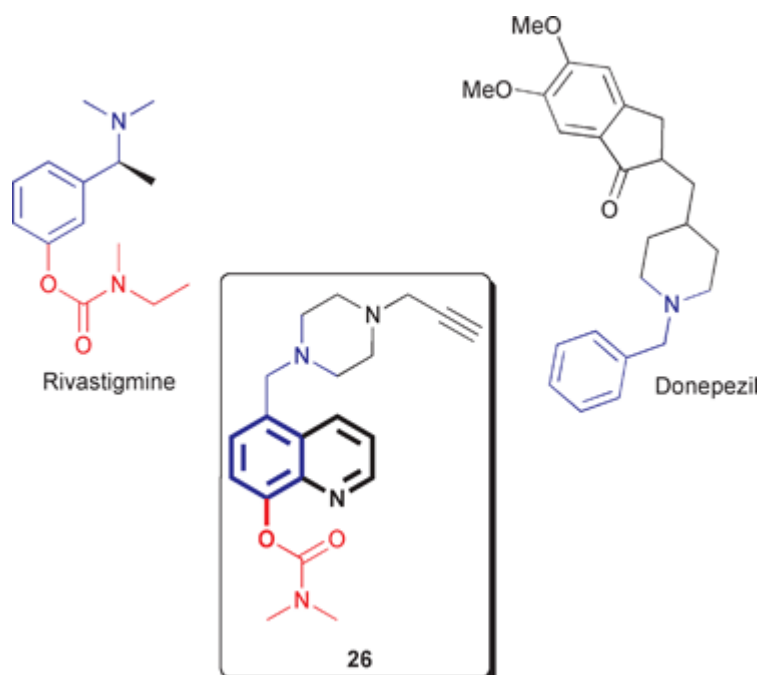


Fig. 25: Pro-chelante (struttura 26) multifunzionale ottenuto dalla combinazione tra HLA-20 e un'amalgama degli AChE inibitori Rivastigmina e Donepezil

Dagli studi in vitro [34] è emerso che il composto 26 risulta essere un potente inibitore acetilcolinesterasico, caratterizzato da un $IC_{50} = 0.5 \pm 0.06 \mu M$, più potente della stessa Rivastigmina isolata.

**INTRODUZIONE
ALLA
PARTE
SPERIMENTALE**

La malattia di Alzheimer (AD) è un disordine neurodegenerativo progressivo, incurabile, che rappresenta la più comune forma di demenza nelle persone anziane. Questa malattia è caratterizzata da perdita progressiva della memoria e del linguaggio. Le cause neuropatologiche dell'AD non sono tutt'ora completamente note. Tuttavia ci sono diversi fattori coinvolti nella patogenesi come: decremento dei livelli di acetilcolina (ACh), formazione di placche β amiloidi e di grovigli neurofibrillari, disfunzioni mitocondriali ed un esteso danno ossidativo; tutto ciò è associato a perdita di cellule nervose in diverse aree del cervello essenziali in molte abilità mentali. Le regioni del cervello maggiormente colpite dal danno sono la corteccia entorinale e l'ippocampo (Fig. 26).

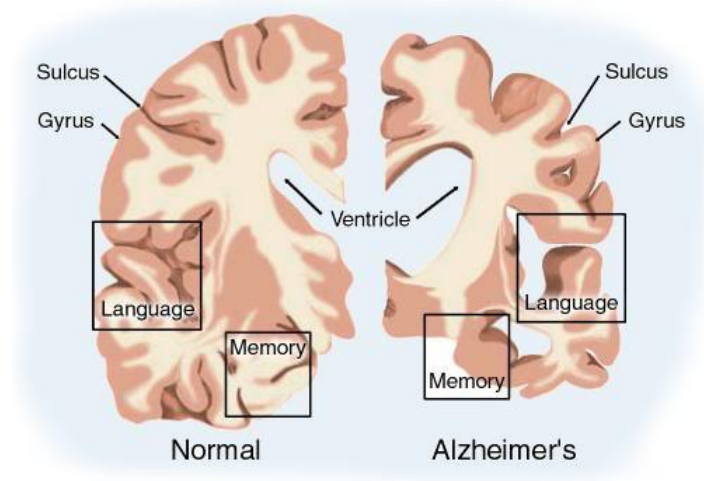


Fig. 26: Confronto tra il tessuto cerebrale di una persona sana e di una persona affetta da AD; i pazienti affetti da Alzheimer mostrano un'atrofia del tessuto cerebrale che va a compromettere funzioni cognitive, di memoria e di linguaggio.

Uno dei primi fattori studiati, ritenuti coinvolti nella patogenesi dell'AD, è un'alterata funzionalità del sistema colinergico in diverse aree cerebrali quali la corteccia cerebrale e l'ippocampo. In queste zone è stata osservata un'eccessiva attività di enzimi deputati alla degradazione dell'acetilcolina (ACh) quali l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BuChE). La riduzione del neurotrasmettitore va ad alterare l'intero circuito colinergico causando perdita di cellule neuronali e atrofia di porzioni cerebrali essenziali nei processi cognitivi e mnemonici.

L'acetilcolinesterasi sembra svolgere anche una funzione secondaria, essenziale nel promuovere la formazione di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari nel tessuto cerebrale dei pazienti affetti da AD.

La presenza di questi aggregati proteici ha portato ad una vera e propria “ipotesi della cascata amiloide”; questa teoria ritiene che alla base dell'insorgenza dell'AD ci siano alterazioni nell'espressione della APP (precursore della proteina amiloide) che portano ad uno squilibrio tra la produzione di β amiloide e la sua clearance, con conseguente accumulo di aggregati $A\beta$ che danno origine a una serie di eventi a cascata tra cui processi infiammatori, formazione di grovigli neurofibrillari e alterazioni della trasmissione sinaptica. (Fig. 27)

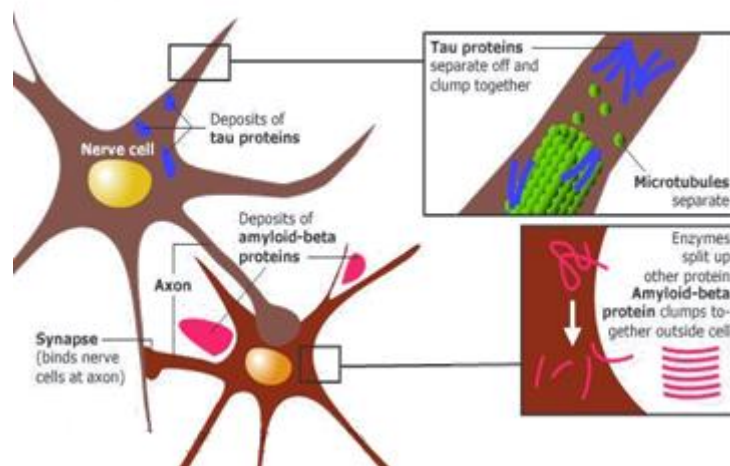


Fig. 27: Formazione di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari, caratteristici dell'AD

L'acetilcolina a livello centrale viene principalmente degradata dall'AChE. Tale reazione di idrolisi avviene anche ad opera della BuChE che, sempre a livello centrale, si trova espressa in più alte concentrazioni a livello della glia. Recenti ricerche hanno suggerito che la BuChE possa compensare AChE quando i livelli sono fortemente ridotti (fase avanzata della patologia) accelerando di conseguenza la formazione di aggregati beta amiloidi. [6]

I primi farmaci ad essere stati utilizzati in terapia per l'AD sono Tacrina, Donezepil, Rivastigmina e Galantamina, i quali hanno lo scopo di alleviare i sintomi e influenzare

il decorso della malattia, ritardando il passaggio dalle prime fasi della patologia (più lievi) a quelle finali (più avanzate). Si tratta di molecole con attività farmacologica mirata ad inibire l'attività dell'acetil- (AChE) e/o butirril- (BuChE) colinesterasi per ripristinare i livelli fisiologici di ACh. Essendo farmaci che agiscono su unico bersaglio d'azione presentano un'efficacia limitata e un più elevato numero di effetti collaterali. (Fig. 28)

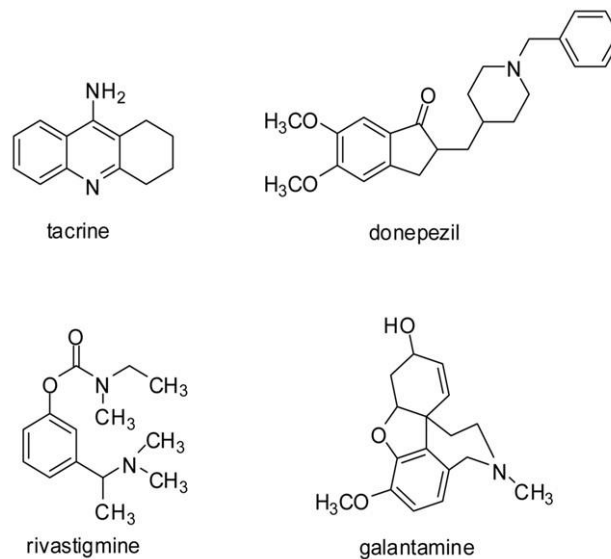


Fig. 28: Inibitori colinesterasi (AChE-I)

Altro fattore molto importante che caratterizza il morbo di Alzheimer è l'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) con una conseguente alterazione dei costituenti molecolari essenziali quali lipidi, proteine e DNA, e degli enzimi antiossidanti. Sebbene sia difficile precisare se lo stress ossidativo sia una causa o un effetto, la chiara associazione tra danno ossidativo e AD rende l'uso degli antiossidanti un'opzione terapeutica attraente.

Tra i numerosi composti ad attività antiossidante noti, risultano particolarmente rilevanti i polifenoli, metaboliti secondari prodotti dalle piante. Da un punto di vista chimico i polifenoli sono caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico sostituito da più gruppi idrossilici (OH) e la loro particolare reattività è correlata proprio all'acidità caratteristica della funzione fenolica e alla nucleofilicità dell'anello benzenico. Particolarmente rilevante risulta la loro azione antiossidante che è favorita dalla loro struttura chimica in quanto sono in grado di donare facilmente un radicale idrogeno e di

delocalizzare l'elettrone spaiato, consentendo una maggiore stabilità alla molecola. (Fig. 29) Tra i vari polifenoli si ritrova l'acido gallico, o acido triidrossibenzoico, un acido organico, a basso peso molecolare, la cui potente attività antiossidante è stata evidenziata da numerosi studi. È in grado di fornire una efficace protezione contro il danno ossidativo causato dalle specie reattive radicaliche presenti nei sistemi biologici, come il radicale idrossilico ($\text{OH}\cdot$), superossido ($\text{O}_2\cdot$) e perossido ($\text{ROO}\cdot$) e dalle specie non radicaliche, come perossido di idrogeno (H_2O_2) e acido ipocloroso (HOCl).

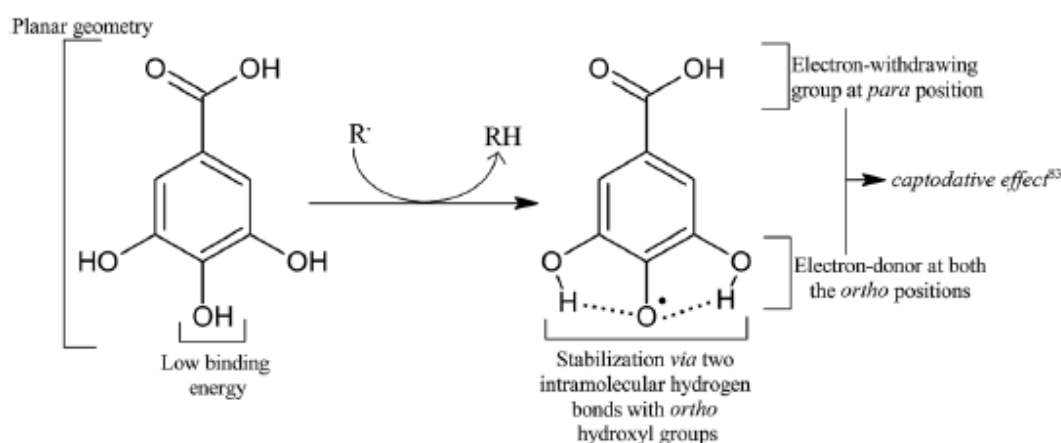


Fig. 29: Meccanismo d'azione dell'acido gallico nei confronti di un generico radicale libero.

Dato che il principale svantaggio della terapia attualmente disponibile per l'AD rimane ancora la scarsa efficacia, la ricerca di nuovi farmaci in questa area si è indirizzata allo sviluppo di molecole multifunzionali o multitarget. Tale approccio ha infatti permesso di ottenere molecole con attività "sinergiche" utili per il trattamento di numerose patologie ad eziologia complessa come ad esempio il cancro e le malattie cardiovascolari. Poiché l'AD è una patologia multifattoriale sono stati sviluppati molti ligandi multi target capaci di interagire contemporaneamente con due o più bersagli farmacologici tra i quali si evidenziano quelli coinvolti nei deficit cognitivi e della memoria (AChE e/o BuChE), la β -amiloide ($\text{A}\beta$), proteina tau, monoamino-ossidasi, ioni metallici, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e molti altri.

Sebbene i vantaggi nella progettazione di ligandi multi target siano ad oggi abbastanza chiari, la combinazione delle "funzionalità" chimiche (gruppi farmacoforici) in un

singolo agente terapeutico e l'identificazione dei bersagli terapeutici più appropriati da selezionare, rappresentano i limiti principali che ostacolano i trial clinici su molecole caratterizzate da un profilo multitarget nella patologia dell'AD.

Una eccezione è rappresentata dal Ladostigil, (Fig. 30) che combina l'azione della Rivastigmina (AChE inibitore) e della Rasagilina (MAO inibitore). Il farmaco è stato testato in fase II su 201 pazienti con AD moderata. I risultati di tale studio non sono attualmente disponibili.

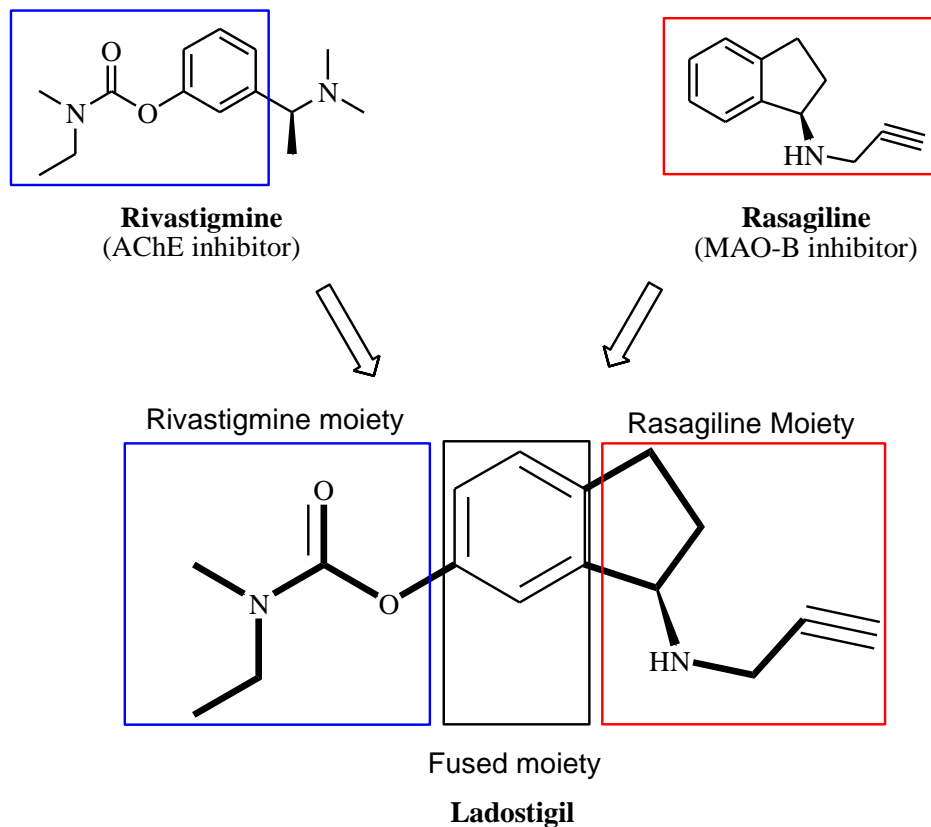


Fig. 30: Ladostigil: molecola ottenuta dalla combinazione dei farmacofori rispettivi di Rivastigmina e Rasagilina

Il Ladostigil è una molecola ad azione inibitoria duale nei confronti di MAO e AChE (Fig.31). I gruppi farmacoforici responsabili di tale attività sono il raggruppamento propargilamminico (inibitore di MAO-B) e il raggruppamento carbammico (inibitore di AChE e BuChE). Il Ladostigil presenta una significativa attività neuroprotettiva dovuta alle sue capacità di ridurre lo stress ossidativo e i conseguenti danni cellulari.

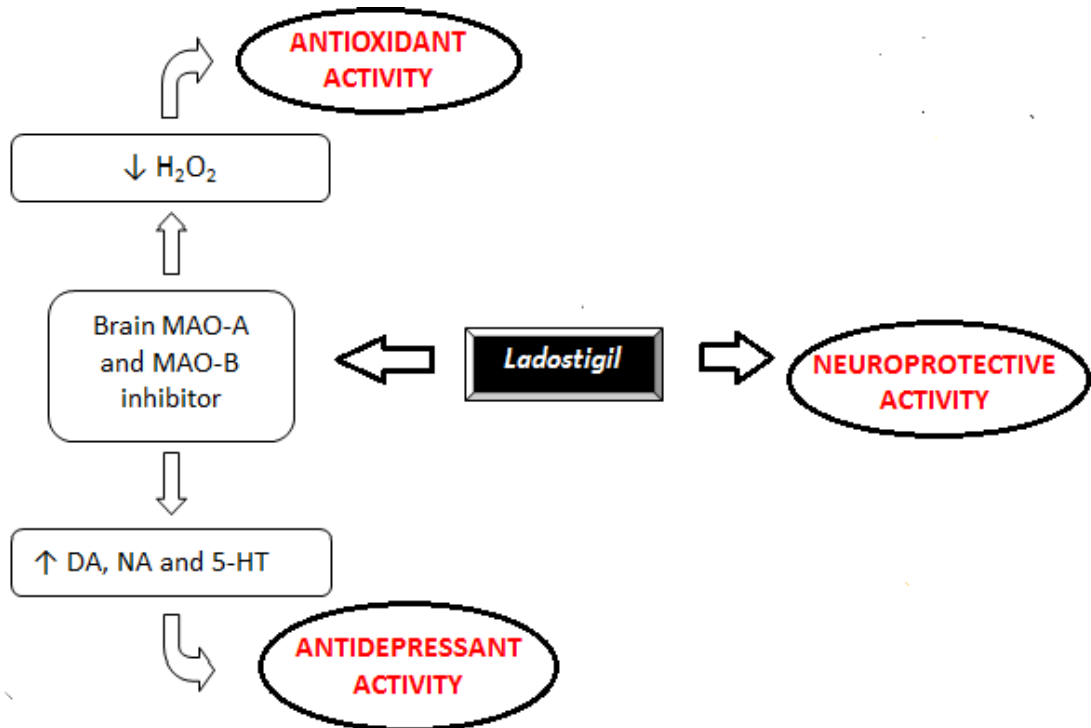
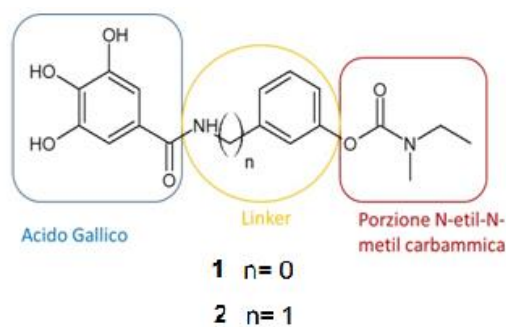


Fig. 31: Azione farmacologica del Ladostigil

Il successo del Ladostigil come unico esempio di farmaco multitarget attualmente in fase clinica per la terapia dell'AD, ha indirizzato la ricerca allo sviluppo di nuovi inibitori duali attraverso la combinazione di porzioni farmacoforiche in grado di inibire l'AChE con porzioni ad attività antiossidante.

Su questa base, in questo lavoro di tesi sono state sintetizzate le molecole duali **1-3**, ottenute dalla combinazione della Rivastigmina (N-etil-N-metilcarbamoile), con una molecola dotata di proprietà antiossidanti quale l'Acido Gallico. (Fig.32)



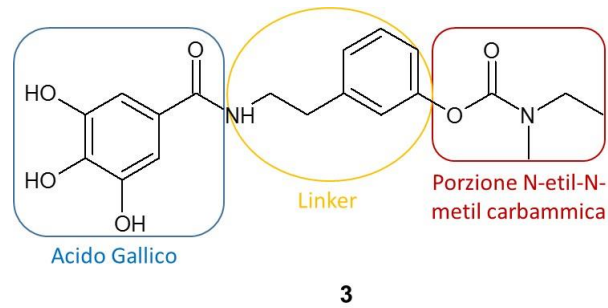


Fig. 32: Composti 1-3

In questa tesi di laurea mi sono, inoltre, occupata della sintesi della molecola **4** ottenuta dalla combinazione della porzione farmacoforica della Rivastigmina con la porzione 2-idrossibenzilamminica dotata di proprietà chelanti. (Fig. 33). [32]

Tale combinazione potrebbe infatti fornire nuovi potenziali agenti terapeutici capaci di rallentare la formazione di aggregati di proteine insolubili a livello cerebrale. E' infatti noto che nella patologia dell'AD sono stati riscontrati elevati livelli cerebrali di metalli pesanti quali rame, ferro e zinco.

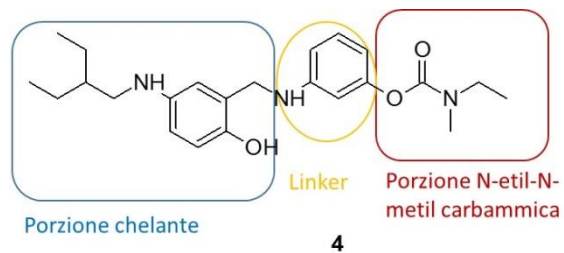
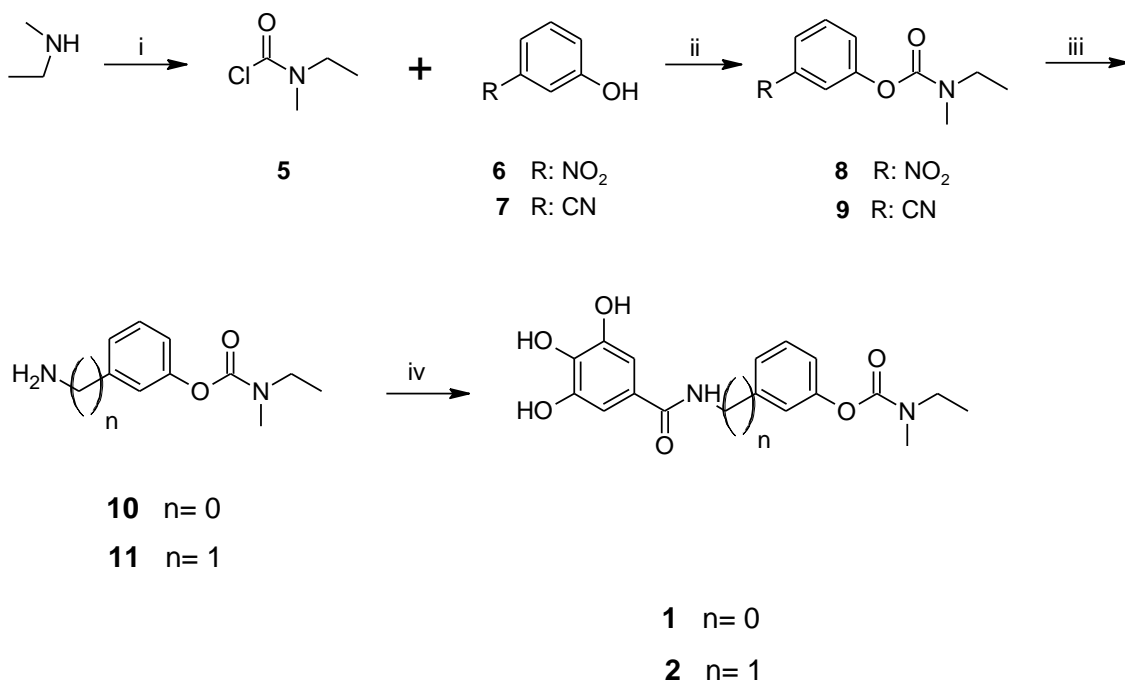
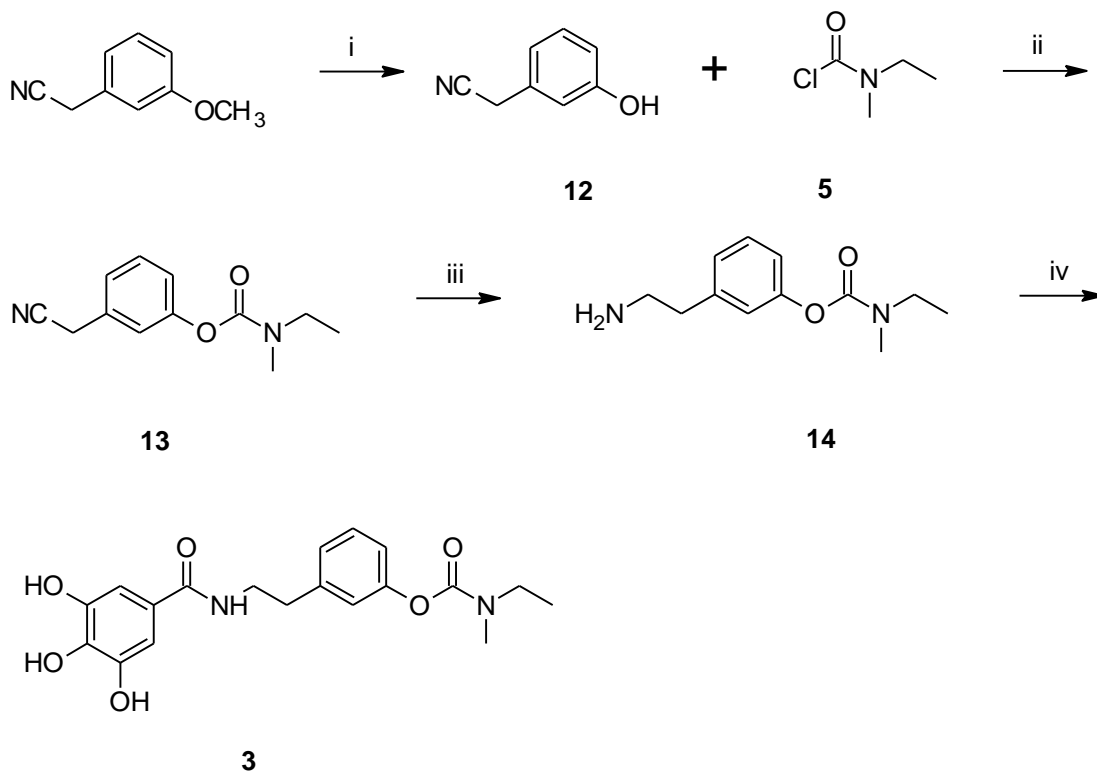


Fig. 33: Composto 4

SCHEMA 1**Reagenti e condizioni:**

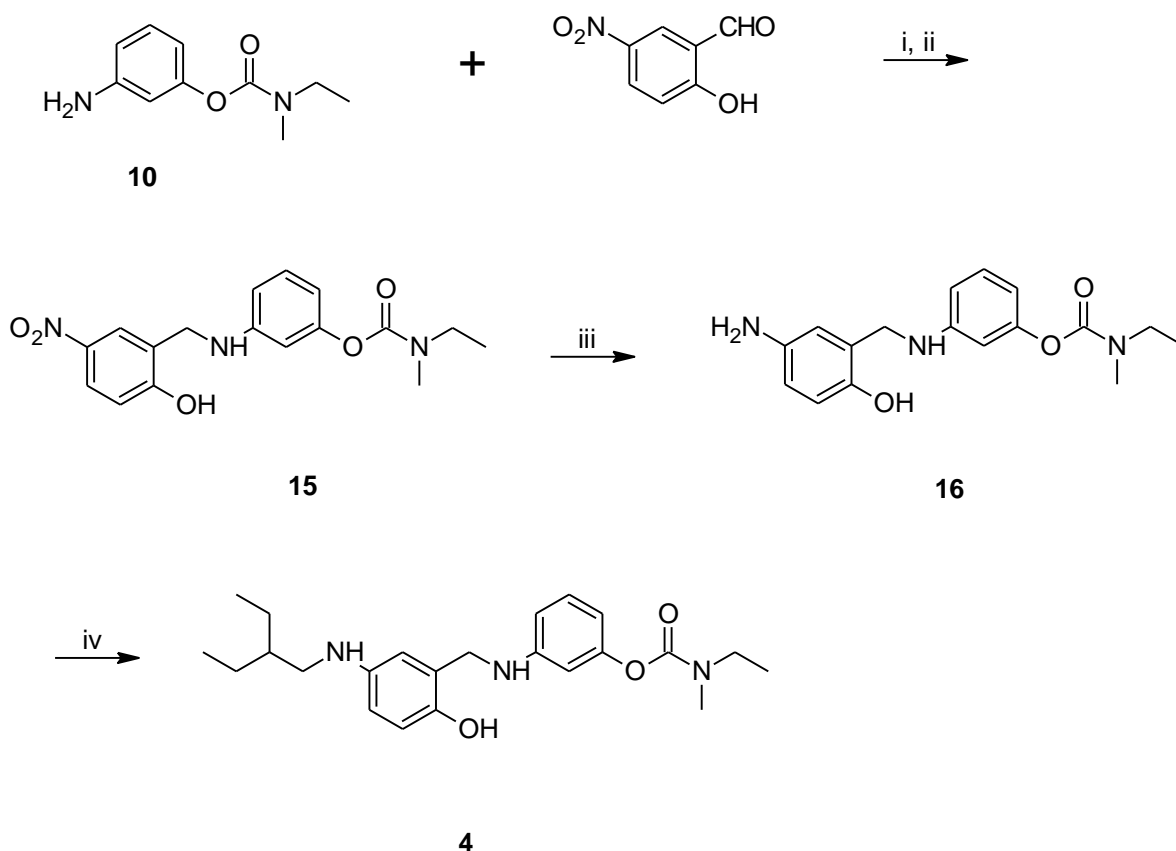
i) Trifosgene, CH₂Cl₂, NaHCO₃, 12 h; ii) Et₃N, 95°C, 15 h; iii) H₂, Pd/C, EtOH, t.a., 12h; iv) Acido Gallico, DCC, THF, 70 °C, 7h.

La sintesi dei derivati **1, 2** è stata effettuata seguendo la procedura sintetica illustrata nello **schema 1**. La reazione tra il trifosgene e la N-etil-N-metilammina in presenza di NaHCO₃ ha fornito l'N-etil-N-metilcarbamoilcloruro **5** che è stato fatto reagire con l'appropriato fenolo **6, 7** in presenza di Et₃N, a fornire i corrispondenti composti **8, 9**. L'idrogenazione catalitica dei derivati **8, 9**, in presenza di Pd/C, ha fornito le ammine **10, 11**. I composti desiderati **1 e 2** sono stati sintetizzati tramite reazioni di condensazione tra l'appropriata ammina **10, 11** e l'acido gallico, in presenza di dicicloesilcarbodiimide.

SCHEMA 2**Reagenti e condizioni:**

i) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 2h; **ii)** Et_3N , 95° , 15h; **iii)** H_2 , Pd/C, MeOH, HCl, t.a., 4h; **iv)** Acido Gallico, DCC, THF, 70° , 7h.

La sintesi del derivato **3** è stata ottenuta seguendo la procedura sintetica illustrata nello **schema 2**. La reazione di deprotezione del 3-metossifenil-acetonitrile, in presenza di BBr_3 , ha fornito l'intermedio **12**, che è stato successivamente fatto reagire con l'*N*-etil-*N*-metilcarbamoilcloruro **5**, in presenza di Et_3N , a fornire il derivato **13**. Il derivato **5** è stato preparato dall'*N*-etil-*N*-metilammina per reazione con il trifosgene e NaHCO_3 . L'idrogenazione catalitica del nitrile **13**, in presenza di Pd/C, ha fornito l'ammina **14**. Il composto desiderato **3** è stato sintetizzato tramite una reazione di condensazione tra l'ammina (**14**) e l'acido gallico, in presenza di dicicloesilcarbodiimmide

SCHEMA 3**Reagenti e condizioni:**

i) EtOH, 80°C, 2h; ii) NaBH₄, EtOH/H₂O, t.a., 12h; iii) H₂, Pd/C, EtOH, t.a., 12h; iv) 2-Etilbutiraldeide, NaBH₃CN, sotto azoto, t.a., 3h.

La sintesi del derivato **4** è stata effettuata seguendo la procedura sintetica illustrata nello **schema 3**.

La reazione di amminazione riduttiva tra il derivato **10**, precedentemente sintetizzato, e la 5-nitro-salicilaldeide commerciale, in presenza di EtOH e NaBH₄, ha fornito il composto **15** che è stato successivamente sottoposto a idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C, a dare l'ammino derivato **16**. Il composto desiderato, derivato **4**, è stato ottenuto tramite una reazione di amminazione riduttiva della 2-etilbutiraldeide e l'ammina **16**, in presenza di NaBH₃CN.

Le molecole multitarget sintetizzate in questa tesi dovranno inizialmente essere valutate per le proprietà farmacologiche intrinseche caratterizzanti le due porzioni molecolari unite negli ibridi sintetizzati e cioè per le loro capacità di inibire le colinesterasi e per le eventuali proprietà antiossidanti (1-3) e chelanti (4).

Sempre in questo lavoro di tesi ho avuto la possibilità di valutare le proprietà antiossidanti nel periodo di traineeship svolto presso il laboratorio del Departamento de Química da Universidade de Coimbra, sotto il tutoraggio della Prof.ssa Ana Paula Fonseca, docente dell'Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Durante questo periodo di attività in Portogallo ho effettuato un saggio spettrofotometrico per determinare le proprietà antiossidanti delle molecole sintetizzate presso il Dipartimento di Farmacia.

Saggio DPPH

DPPH o 2,2-dyphenyl-1-picrylhydrazyl (PM=394.32, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) è un radicale organico azotato stabile. Questa sua stabilità è dovuta al fatto che l'elettrone spaiato, presente sull'azoto, può essere stabilizzato per risonanza sull'anello aromatico; oltre a ciò la presenza di gruppi ingombranti, come quelli fenilici e nitro, conferisce al radicale un'ulteriore stabilità.

Grazie a questa sua caratteristica trova una larga applicazione nei laboratori di ricerca dove viene utilizzato per il monitoraggio di reazioni chimiche che coinvolgono radicali liberi, quindi principalmente per test antiossidanti. Il saggio DPPH [35] consiste in una reazione tra il composto sottoposto ad analisi e una soluzione metanolica di DPPH: un composto dotato di attività antiossidante (genericamente indicato con AO-H), in presenza di una specie radicalica, come il DPPH, trasferisce un radicale idrogeno su di essa, causando così una decolorazione della soluzione di DPPH. (Fig. 34)

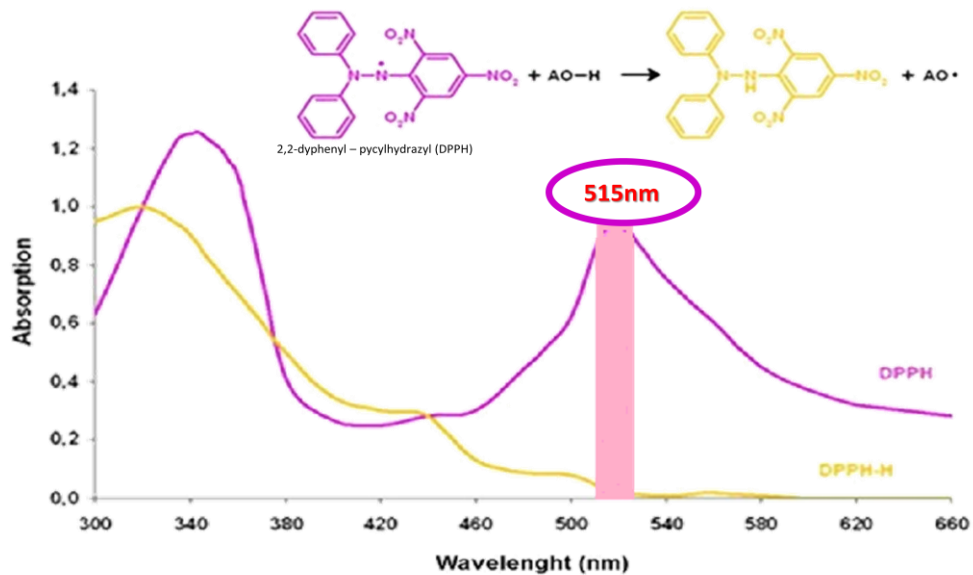


Fig. 34: Grafico che mostra la variazione di assorbanza derivante dalla reazione tra DPPH e un generico antiossidante a 515nm.

La decolorazione della soluzione è dovuta alla scomparsa della specie radicalica. La reazione viene monitorata nel tempo (ogni 10,30,45 minuti) andando ad analizzare la diminuzione del picco a $\lambda=515\text{nm}$, a diverse concentrazioni (2.5 a $100\mu\text{M}$). La diminuzione del picco, e quindi la decolorazione della soluzione, è direttamente proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione. (Fig. 35)

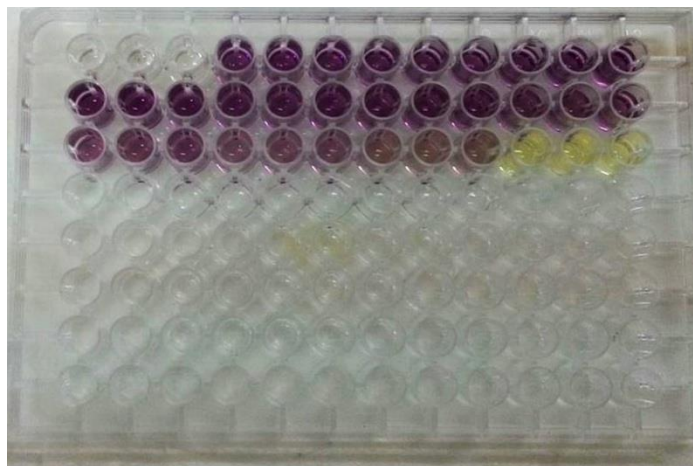


Fig. 35: Microplates di un campione analizzato: mostra la diretta correlazione tra concentrazione e attività antiossidante

Dai valori di assorbanza è poi possibile ottenere i valori di % scavenged, ovvero la percentuale di DPPH catturato dalla specie antiossidante, applicando la seguente equazione:

$$\% \text{ SCAVENGED} = \frac{A_{\text{negative control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{negative control}} - A_{\text{solvent}}}$$

A negative control = Assorbanza della soluzione metanolica DPPH
(compreso tra 0,9 e 1)

A solvent = Assorbanza del bianco, solo solvente (metanolo)

A sample = Assorbanza del campione analizzato, a 515nm

Come standard di riferimento è stato utilizzato il Trolox o acido-6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico (Fig. 36), analogo della vitamina E.

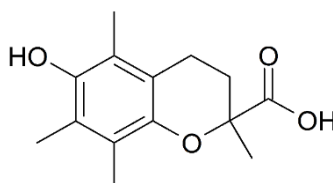


Fig. 36: Struttura Trolox

Il Trolox è una molecola ad azione antiossidante, come la vitamina E, e viene utilizzato in applicazioni biologiche e biochimiche per ridurre lo stress e il danno ossidativo.

Inizialmente sono stati misurati i valori di A_{515} relative a concentrazioni differenti di Trolox (10 a 80 μM) da cui sono stati ricavati i valori percentuali di scavenged utilizzati per costruire il grafico. Dalla curva ottenuta è stato possibile estrapolare il valore dell' IC_{50} utilizzato come riferimento antiossidante. (Fig. 37)

Il tempo di reazione scelto come riferimento è 30 minuti.

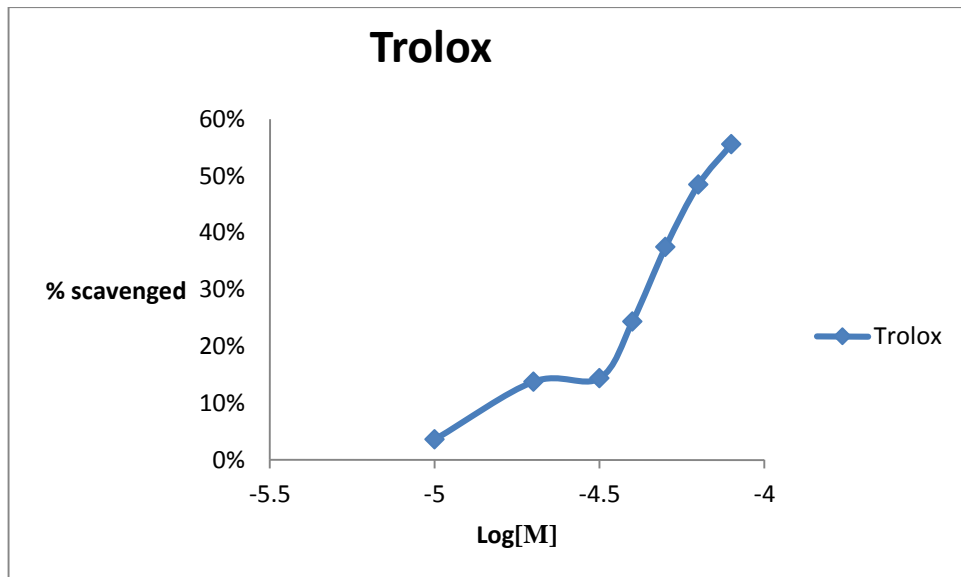
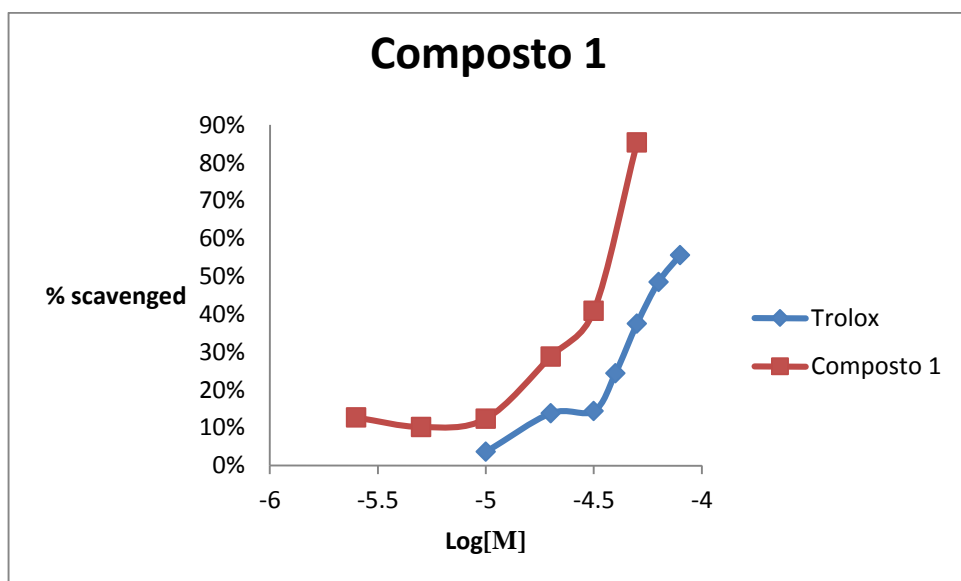
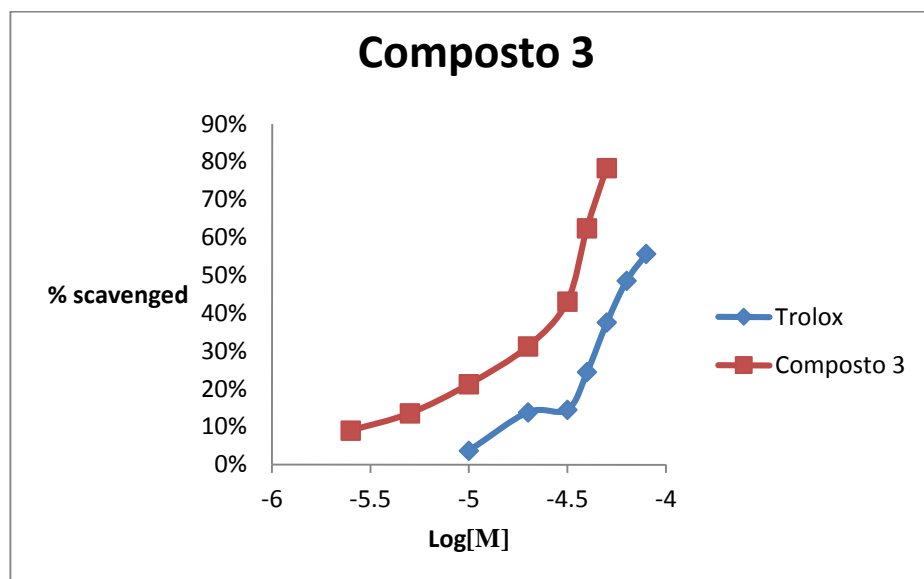
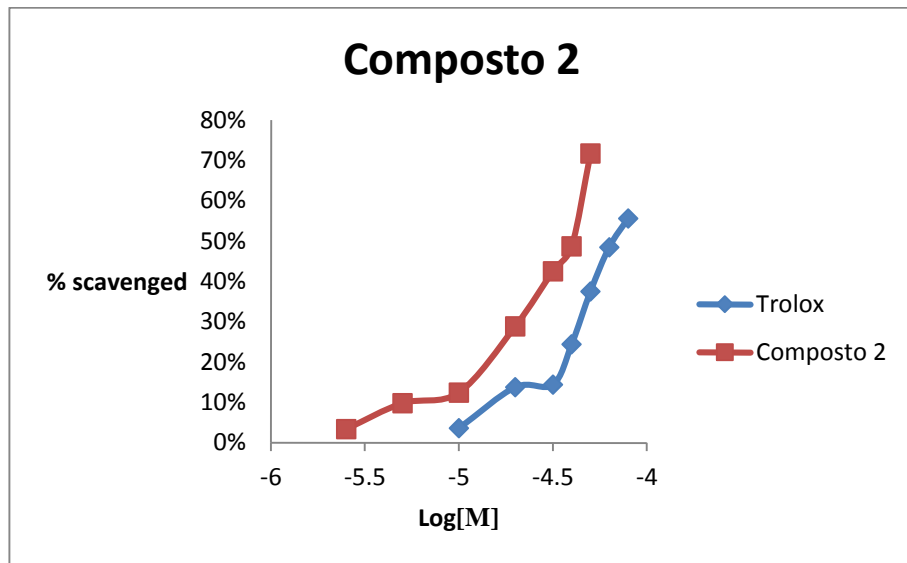


Fig. 37: Rappresentazione grafica della % scavenged del Trolox a 30 minuti nell'intervallo di concentrazioni di 10-80uM

I valori di scavenged ottenuti sono stati confrontati con i grafici ottenuti per i nuovi composti saggiati (Fig. 38). Dalle curve sono stati estrapolati i valori di IC_{50} riportati in tabella. In ogni grafico sono stati riportati anche i dati relativi al Trolox in modo da ottenere un confronto diretto.





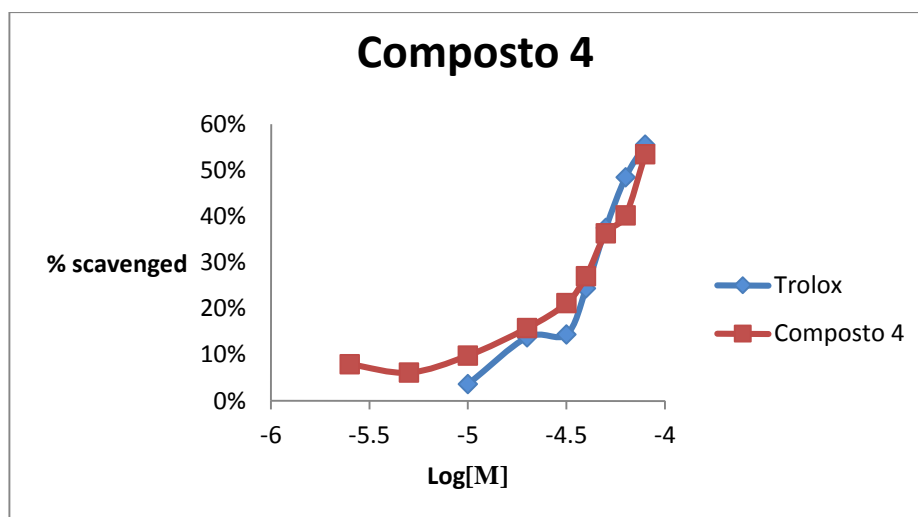


Fig. 38: Grafici che mostrano i valori % di scavenging del Trolox (azzurro), e dei composti 1-4 saggiati nell'intervallo di concentrazione compreso (2.5 – 100 μ M)

Le molecole sintetizzate a Pisa e analizzate tramite il saggio DPPH hanno dimostrato avere tutte capacità antiossidanti.

Nella seguente tabella vengono riassunti i dati ottenuti.

Composto	IC ₅₀ (μ M)
1	28.2 +/- 0.02
2	31.6 +/- 0.01
3	28.8 +/- 0.01
4	60.2 +/- 0.01
Trolox	50.1 +/- 0.01

Tabella: Valori di IC₅₀ ricavati a 30 minuti

I composti **1-3**, ottenuti dalla combinazione tra porzione della Rivastigmina e tra l'Acido Gallico, hanno mostrato valori di IC₅₀ compresi tra 28 e 32 μ M, indicando una capacità antiossidante migliore rispetto al Trolox (IC₅₀ = 50 μ M). Anche il composto **4**, ottenuto dalla combinazione della porzione N-etil-N-metil carbammica con la porzione 2-idrossibenzilamminica mostra proprietà antiossidanti anche se la sua potenza è inferiore a quella del farmaco di riferimento (IC₅₀ 60 μ M vs 50 μ M).

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi

La struttura di tutti i composti è stata controllata per mezzo della spettrometria ^1H NMR.

Degli spettri ^1H NMR sono stati riportati i particolari più significativi.

Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Bruker operante a 400 MHz in CDCl_3 , MeOD.

I chemical shift δ sono espressi in ppm (scala δ).

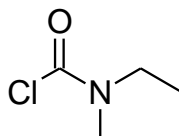
Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di analitica: la differenza tra i valori teorici e quelli calcolati è risultata essere compresa nell'intervallo di $\pm 0,4\%$.

Le evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando Na_2SO_4 .

Le TLC analitiche sono state effettuate usando lastre Merck di gel di silice G60 contenente un indicatore fluorescente $20 \times 20,2$ mm; le varie macchie sono state evidenziate da una lampada UV (256 nm).

Per le cromatografie su colonna è stato usato un gel di silice Merck 70- 230 Mesh. Per la filtrazione su celite è stata usata Celite ® 521.

Per le idrogenazioni è stato usato il generatore di idrogeno HG 2000 CLAIND®.

SCHEMA 1**Sintesi di Etil(metil)carbamoilcloruro(5)**

Ad una miscela di trifosgene commerciale (835 mg, 2.81 mmoli) e NaHCO₃ (710 mg, 8.43 mmoli) in CH₂Cl₂ (minima quantità), è stata aggiunta una soluzione di N-etil(metil)ammina (250 mg, 4.21 mmoli) in CH₂Cl₂ (2 mL) nell'arco di un'ora, mantenendo la temperatura a 15°C. La miscela di reazione risultante è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12h. Trascorso tale periodo il solido è stato filtrato e il solvente evaporato ottenendo il prodotto desiderato **5**.

Olio bianco

Resa: 98%

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.22 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 3.03 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.11 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.45 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.53 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero) ppm.

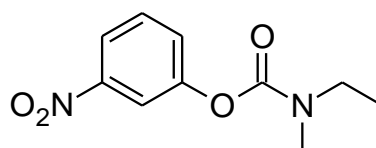
Analisi elementare:

C₄H₈ClNO	C	H	N
Calc. %	39.52	6.63	11.52
Trov. %	39.89	7.08	11.65

SCHEMA 1**Sintesi dei derivati 8, 9**

Ad una soluzione dell'etil(metil)carbamoilcloruro **5** (200 mg, 1.64 mmoli) in Et₃N (1 mL) è stato aggiunto l'opportuno fenolo commerciale (1.61 mmoli). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a 95°C per 15h. Trascorso tale periodo il residuo è stato ripreso con CH₂Cl₂ e lavato con una soluzione acquosa di NaOH 1N. La fase organica è stata essiccata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata ottenendo i prodotti desiderati **8, 9**.

- **3-Nitrofenil etil(metil)carbammato(8)**



Olio giallo

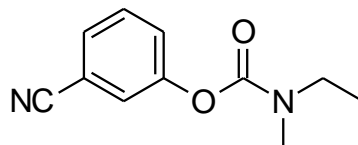
Resa: 51%

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.21 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.26 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 3.01 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.09 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.43 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.49 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 7.47-7.55 (m, 2H, Ar); 8.01-8.02 (m, 1H, Ar), 8.06-8.08 (m, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C₁₀H₁₂N₂O₄	C	H	N
Calc. %	53.57	5.39	12.49
Trov. %	53.74	5.23	12.60

- 3-Cianofenil etil(metil)carbammato(9)



Olio bianco

Resa: 70 %

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.31 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 1° rotamero); 1.20 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 2° rotamero); 3.0 (s, 1.5H, CH_3 , 1° rotamero); 3.07 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.41 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 2° rotamero); 7.37-7.39 (m, 1H, Ar); 7.43-7.49 (m, 3H, Ar) ppm.

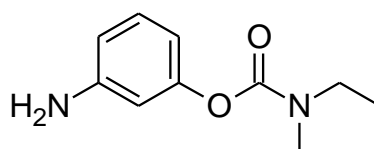
Analisi elementare:

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	C	H	N
Calc. %	64.69	5.92	13.72
Trov. %	64.47	6.03	13.54

SCHEMA 1**Sintesi dei derivati 10,11**

Ad una soluzione dell'opportuno carbammato **8,9** (0.74 mmoli) in EtOH (3 mL) è stato aggiunto Pd/C (39.2 mg). La miscela risultante è stata sottoposta a idrogenazione catalitica a temperatura ambiente per 12h. Trascorso tale periodo la sospensione è stata filtrata su setto a celite e il solvente è stato evaporato ottenendo il prodotto desiderato **10, 11**.

- **3-Amminofenil-etil(metil)carbammato(10)**



Olio giallo

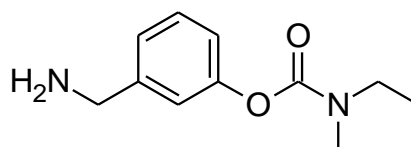
Resa: 97 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.18 (t, 1.5H, *J* = 6.4 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.25 (t, 1.5H, *J* = 6.4 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.97 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.04 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.38 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.42 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 2° rotamero); 6.48-6.52 (m, 3H, Ar); 7.11 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C₁₀H₁₄N₂O₂	C	H	N
Calc. %	61.84	7.27	14.42
Trov. %	62.01	7.48	14.31

- 3-(Amino)metilfenil etil(metil)carbammato(11)



Olio bianco

Resa: 63.1%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.19 (t, 1.5H, $J = 7.0$ Hz, CH_3 , 1° rotamero); 1.23 (t, 1.5H, $J = 7.0$ Hz, CH_3 , 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH_3 , 1° rotamero); 3.06 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.40 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH_2 , 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH_2 , 2° rotamero); 3.86 (s, 2H, CH_2NH_2); 6.99 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar); 7.08 (s, 1H, Ar); 7.13 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar); 7.26-7.33 (m, 1H, Ar) ppm.

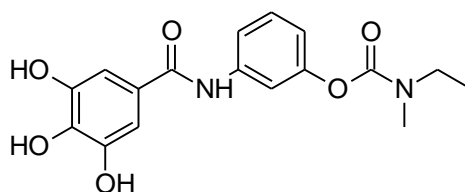
Analisi elementare:

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$	C	H	N
Calc. %	63.44	7.74	13.45
Trov. %	63.10	7.90	13.68

SCHEMA 1**Sintesi dei derivati 1,2**

Ad una soluzione di acido gallico commerciale (116 mg, 0.685 mmoli) e DCC (141 mg, 0.685 mmol) in THF (2 mL), è stata aggiunta una soluzione del corrispondente derivato amminico **10,11** (0.685 mmoli) in THF (2 mL). La miscela risultante è stata lasciata in agitazione a refluxo per 7h, quindi il solvente è stato evaporato. Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela AcOEt/*n*-Esano in rapporto 9:1, ottenendo i prodotti desiderati **1,2**.

- **3-(3,4,5- Triidrossibenzoilamino)fenil etil(metil) carbammato(1)**



Olio bianco

Resa: 20%

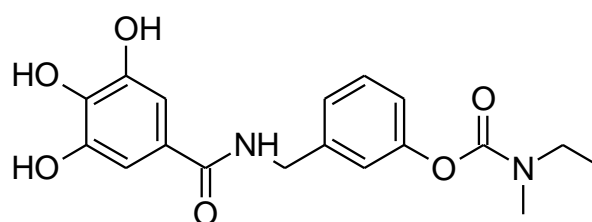
¹H NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 1.18 (t, 1.5H, *J* = 6.8 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.25 (t, 1.5H, *J* = 6.8 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.10 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.39 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.51 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 2° rotamero); 6.85 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar); 6.95 (s, 2H, Ar); 7.30-7.34 (m, 1H, Ar); 7.47 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.54 (s, 1H, Ar) ppm.

¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 169.10, 156.31, 153.02, 146.74, 141.24, 138.55, 130.24, 126.53, 118.75, 118.43, 115.51, 108.22, 45.17, 34.52 (1° rotamero), 34.28 (2° rotamero), 13.41 (1° rotamero), 12.61 (2° rotamero) ppm.

Analisi elementare:

C₁₇H₁₈N₂O₆	C	H	N
Calc. %	58.96	5.24	8.09
Trov. %	59.03	5.09	8.36

- **3-(3,4,5- Triidrossibenzoilamino)metilfenil-etil(metil) carbammato(2)**



Olio bianco

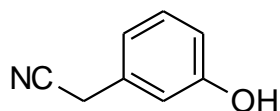
Resa: 20 %

¹H NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 1.18 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.25 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.97 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.09 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.38 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 2° rotamero); 4.52 (s, 2H, CH₂NH₂); 6.88 (s, 2H, Ar); 6.99 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar); 7.07 (s, 1H, Ar); 7.20 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.32-7.36 (m, 1 H, Ar) ppm.

¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 170.50, 156.41, 152.97, 146.82, 142.24, 138.73, 130.37, 125.63, 125.53, 121.91, 121.54, 107.82, 45.14, 44.04, 34.51 (1° rotamero), 34.26 (2° rotamero), 13.38 (1° rotamero), 12.60 (2° rotamero) ppm.

Analisi elementare:

C₁₈H₂₀N₂O₆	C	H	N
Calc. %	59.99	5.59	7.77
Trov. %	60,13	5.48	8.01

SCHEMA 2**Sintesi di (3-idrossifenil)acetonitrile(12)**

Ad una soluzione di 3-(metossifenil)acetonitrile commerciale (500 mg, 3.40 mmoli) in CH_2Cl_2 , posta sotto corrente di azoto e raffreddata a $-15\text{ }^\circ\text{C}$, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di BBr_3 1M in CH_2Cl_2 (10.8 mL, 10.8 mmoli). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ per 40min e poi a temperatura ambiente per 30min. Quindi è stata aggiunta H_2O e la fase acquosa è stata estratta con CH_2Cl_2 , essiccata, filtrata ed evaporata per dare il prodotto desiderato **12**.

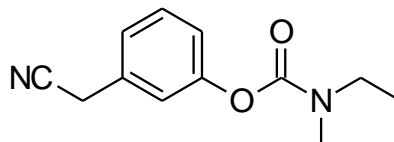
Olio bianco

Resa: 81 %

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.72 (s, 2H, CH_2CN); 6.81 (d, 1H, $J = 8.0\text{ Hz}$, Ar); 6.83-6.85 (m, 2H, Ar); 7.21-7.26 (m, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$	C	H	N
Calc. %	72.16	5.30	10.52
Trov. %	71.98	5.61	10.74

SCHEMA 2**Sintesi di 3-(cianometil)fenil etil(metil)carbammato(13)**

Ad una soluzione del derivato **12** (361 mg, 2.71 mmoli) in Et₃N (1.65 mL) è stato aggiunto l'etil(metil)carbamoil cloruro **5** (330 mg, 2.71 mmoli). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a 95°C per 15h. Trascorso tale periodo il residuo è stato ripreso con CH₂Cl₂ e lavato con una soluzione di NaOH 1N. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo il prodotto desiderato **13**.

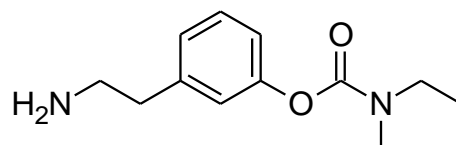
Olio bianco

Resa: 46 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.18 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.24 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.06 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.40 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.41 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 2° rotamero); 3.74 (s, 2H, CH₂CN); 7.08-7.11 (m, 2H, Ar); 7.15 (d, 1H; *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.33-7.37 (m, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	C	H	N
Calc. %	66.04	6.47	12.84
Trov. %	66.51	6.53	12.70

SCHEMA 2**Sintesi 3-(2-amminoetil)fenil etil(metil)carbammato(14)**

Ad una soluzione derivato **13** (201 mg, 0.92 mmoli) in MeOH (8.84 mL) è stato aggiunto HCl concentrato (0.1 mL) e Pd/C (70.7 mg). La miscela risultante è stata sottoposta ad idrogenazione a temperatura ambiente per 4h. Trascorso tale periodo la soluzione è stata filtrata su setto a celite, e il solvente evaporato ottenendo il prodotto desiderato **14**.

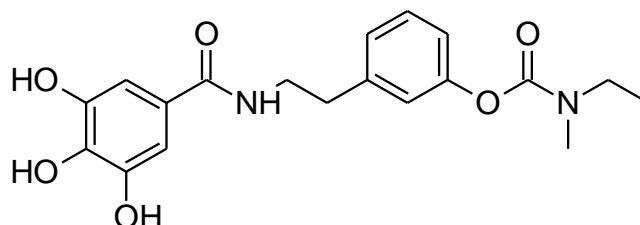
Olio giallo

Resa: 93 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.18 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃ 1° rotamero); 1.23 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃ 2° rotamero); 2.75 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂); 2.97 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂); 3.06 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.14 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.41 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 6.96-7.0 (m, 2H, Ar); 7.03 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.26-7.30 (m, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C₁₂H₁₈N₂O₂	C	H	N
Calc. %	64.84	8.16	12.60
Trov. %	65.03	8.22	12.33

SCHEMA 2**Sintesi di 3-[2-(3,4,5-triidrossibenzoilamino)etil]fenil etil(metil) carbammato(3)**

Ad una soluzione di acido gallico commerciale (146 mg, 0.859 mmoli) e DCC (177 mg, 0.859 mmol) in THF (2 mL), è stata aggiunta una soluzione del derivato amminico **14** (191 mg, 0.859 mmoli) in THF (2 mL). La miscela risultante è stata lasciata in agitazione a refluxo per 7h, quindi il solvente è stato evaporato. Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela ternaria di AcOEt/*n*-Esano/MeOH in rapporto 9:1:0.4, ottenendo il prodotto desiderato **3**.

Olio giallo

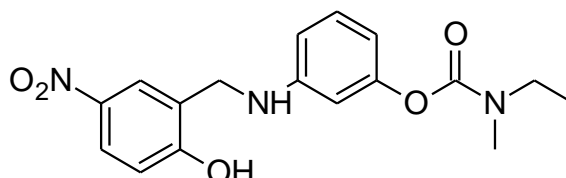
Resa: 20 %

¹H NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 1.17 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.24 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.89 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂); 2.97 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.05(t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂); 3.09 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.44 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.52 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 6.95 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 6.99 (s, 1H, Ar) 7.06 (s, 2H, Ar); 7.08 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.28-7.32 (m, 1H, Ar) ppm.

¹³C NMR (CD₃OD-*d*₄) δ: 171.14, 156.42, 152.97, 146.30, 141.98, 139.20, 130.49, 127.04, 123.38, 123.03, 120.90, 110.24, 46.13, 45.15, 32.99, 34.53 (1° rotamero), 34.27 (2° rotamero), 13.43 (1° rotamero), 12.64 (2° rotamero) ppm.

Analisi elementare:

C₁₉H₂₂N₂O₆	C	H	N
Calc. %	60.95	5.92	7.48
Trov. %	61.10	6.21	7.33

SCHEMA 3**Sintesi di 3- [(2-idrossi-5-nitrobenzil)ammino]fenil etil(metil) carbammato(15)**

Ad una soluzione del derivato **10** (252 mg, 1.30 mmoli) in EtOH, è stata aggiunta la 5-nitrosalicilaldeide commerciale (217 mg, 1.30 mmoli). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a 80°C per 2h. Trascorso tale periodo la soluzione è stata filtrata e il solido raccolto.

Il solido risultante (380 mg, 1.11 mmoli) viene solubilizzato in una miscela costituita da EtOH/H₂O (13:1) ed addizionato di NaBH₄ (271 mg, 7.17 mmoli). La soluzione è stata fatta reagire per tutta la notte a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo la soluzione viene addizionata di HCl 1N e successivamente neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO₃. La fase acquosa è stata estratta con CH₂Cl₂, essiccata, filtrata ed evaporata per dare il prodotto desiderato **15**.

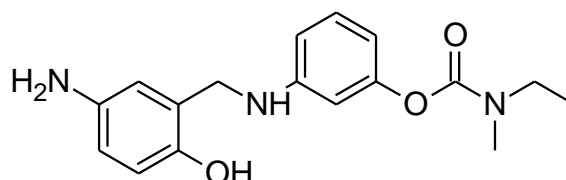
Solido giallo

Resa: 87 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.24 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH₃); 3.05 (s, 1.5H, CH₃); 3.40 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.45 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 4.41 (s, 2H, CH₂NH₂); 6.59 (s, 1H, Ar); 6.62 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 6.66 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 6.86 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.18-7.22 (m, 1H, Ar); 8.08 (dd, 1H, *J* = 2.8, 8.8 Hz, Ar); 8.09 (s, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C₁₇H₁₉N₃O₅	C	H	N
Calc. %	59.12	5.55	12.17
Trov. %	59.50	5.98	12.10

SCHEMA 3**Sintesi di 3-[(5-ammino-2-idrossibenzil)ammino]fenil etil(metil) carbammato(16)**

Ad una soluzione del derivato **15** (190 mg, 0.55 mmoli) in EtOH (2 mL) è stato aggiunto Pd/C (45.2 mg). La miscela risultante è stata poi sottoposta ad idrogenazione catalitica a temperatura ambiente per 12h. Trascorso tale periodo la soluzione è stata filtrata su setto a celite, e il solvente è stato evaporato ottenendo il prodotto **16**.

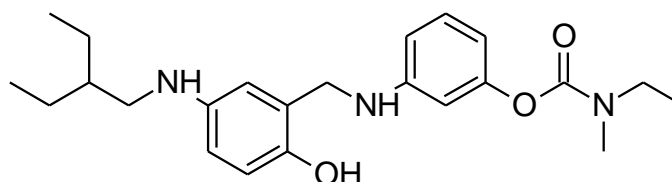
Solido giallo

Resa: 85 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.21 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.24 (t, 1.5H, *J* = 7.0 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.05 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.39 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.44 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₂, 2° rotamero); 4.27 (s, 2H, CH₂N); 6.41-6.63 (m, 5H, Ar); 6.70 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar); 7.16-7.20 (m, 1H, Ar) ppm.

Analisi elementare:

C₁₇H₂₁N₃O₃	C	H	N
Calc. %	64.74	6.71	13.32
Trov. %	64.90	7.08	12.98

SCHEMA 3**Sintesi di 3[(4-[(2-Etilbutil)ammino] 2-idrossibenzil)ammino]fenil etil (metil)carbammato(4)**

Ad una soluzione del derivato **16** (50 mg, 0.16 mmoli) in acetonitrile sono stati aggiunti NaBH₃CN (29.8 mg, 0.47 mmoli) e 2-etilbutiraldeide commerciale (0.02mL, 0.16 mmoli). La miscela risultante è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente sotto azoto per 3h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta H₂O e la fase acquosa è stata estratta con CH₂Cl₂; la fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata. Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela AcOEt/*n*-Esano in rapporto 4:6, ottenendo il prodotto desiderato **4**.

Olio giallo

Resa: 15 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.90 (t, 6H, *J* = 7.4 Hz, CH₃); 1.26 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.35 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 1.38-1.40 (m, 4H, CH₂); 1.40-1.52 (m, 1H, CH); 2.95-3.02 (m, 3.5H, CH₃ 1° rotamero, CH₂); 3.05 (s, 1.5H, CH₃ 2° rotamero); 3.42 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.46 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 4.28 (s, 2H, CH₂NH); 6.48 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar), 6.52 (dd, 1H, *J* = 2.8, 5.6 Hz, Ar), 6.59-6.64 (m, 3H, Ar); 6.72 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar); 7.16-7.20 (m, 1H, Ar); ppm.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 207.03, 155.00, 154.82, 152.65, 148.90, 148.75, 129.98, 124.14, 117.35, 114.70, 113.27, 112.30, 108.97, 48.72, 47.95, 44.23, 40.48, 34.38 (1° rotamero), 33.95 (2° rotamero), 31.02, 24.09, 13.32 (1° rotamero), 12.59 (2° rotamero), 11.03 ppm.

Analisi elementare:

$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$	C	H	N
Calc. %	69.14	8.33	10.52
Trov. %	68.88	8.51	10.56

PARTE BIOLOGICA:**DPPH assay**

La capacità di scavenged nei confronti di radicali liberi viene determinata utilizzando il radicale libero DPPH. Una soluzione metanolica (0.1 mL) del composto 1-4 saggiato a diverse concentrazioni (2.5 – 100 µM) viene addizionata a 0.1 ml di una soluzione metanolica di DPPH (preparata da 3 mg di DPPH in 15 mL di metanolo, opportunamente diluito in modo da ottenere una A_{515} compresa tra 0.9-1). Le misurazioni spettrofotometriche vengono condotte a 515 nm utilizzando uno spettrofotometro UV µQuant MQX200 microplatereader (BioTek, USA).

L'attività antiossidante viene misurata come decremento dell'assorbanza del DPPH, espressa come percentuale dell'assorbanza rispetto ad una soluzione di controllo di DPPH. La capacità di scavenged dei radicali liberi viene misurata tramite l'equazione che segue:

$$\% \text{ Scavenged} = \frac{(A_{\text{controllo negativo}} - A_{\text{campione}})}{(A_{\text{controllo negativo}} - A_{\text{bianco}})}$$

I dati ottenuti vengono espressi in funzione della concentrazione logaritmica dei composti saggiati.

Una soluzione metanolica viene presa come controllo negativo mentre il Trolox viene preso come controllo positivo.

Analisi statistica:

I dati sperimentali vengono estrapolati utilizzando funzioni di regressione non lineare e vengono comparati al composto di riferimento Trolox. Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato e ripetute almeno due volte. I risultati sono espressi come media +/- deviazione standard.

Bibliografia

- [1] **Hans-Wolfgang Klafki, Matthias Staufenbiel, Johannes Kornhuber and Jens Wiltfang.** *Therapeutic approaches to Alzheimer's disease.* Brain. 2006; 129 (11):2840-55
- [2] **Alzheimer's Association 2011** Alzheimer's Disease Facts and Figures.
- [3] **Mount, C; Downton, C.** *Alzheimer disease: progress or profit.* Nat.Med.2006, 12, 780-784
- [4] **Dubois, B.; Feldmann, H.H.; Jacova, C.** *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria.* The Lancet Neurology, 2007, 6(8), 734 – 76.
- [5] **Francis P.T.** *The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease.* CNS Spectr. 2005 Nov;10:6-9
- [6] **Nordberg A, Ballard C, Bullock R, Darreh-Shori T, Somogyi M.** *A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease.* Prim Care Companion CNS Disord. 2013; 15(2): PCC.12r01412
- [7] **Sussman, J.L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I.** *Atomic-structure of acetylcholinesterase from torpedo-californica - a prototypic acetylcholine-binding protein.* Science, 1991, 253(5022), 872-879.
- [8] **Chacon, M.A.; Reyes, A.E.; Inestrosa, N.C.** *Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus.* J. Neurochem., 2003, 87(1), 195204.
- [9] **Mayeux, R.; Sano, M.** *Treatment of Alzheimer's disease.* N England J Med., 1999, 1670 – 1679.
- [10] **Agis-Torres, A.; Söllhuber, M.; Fernandez, M.; Sanchez-Montero, J.M.** *MultiTarget-Directed Ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for Alzheimer's disease.* Current , 2014, 12(1), 2 – 36
- [11] **Golde TE, Dickson D, Hutton M.** *Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res. 2006 Dec;3(5):421-30
- [12] **Maccioni, R.B.; Munoz J.P.; Barbeito, L.** *The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.* Archives of Medical Research, 2001, 32, 367 – 381
- [13] **Mc Gowan, E, Pickford, F, Kim, J.et al.** *Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice* 2005, Neuron, 47, 191
- [14] **Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH.** *Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors.* Science 1992; 258: 304–7

- [15] **Mangesh Mahajan M, Dudhgaonkar S, Narayan Deshmukh S.** *Novel therapies for treatment of Alzheimer's Disease.* International Journal of Pharmacological Research; 2015: 150
- [16] **Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** *Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies.* Curr Drug Targets. 2004; 5:495–502.
- [17] **Montine K.S, Quinn J. F., Zhang J., Fessel J.P, Jackson Roberts L, Morrow J. D, Montine T. J.** *Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases.* Chemistry and Physics of Lipids 128 (2004) 117–124
- [18] **Uttara, B; Singh, A.V.; Zamboni, P. et al.** *Oxidative stress and neurodegenerative disease: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.* 2009, Current neuropharmacology; 65-74.
- [19] **Huang, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I., and Rogers, J. T.** *Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology.* Ann. N. Y. Acad. Sci. (2004) 1012, 153– 163.
- [20] **Linseman, D.A.** *Targeting oxidative stress for neuroprotection.* Antioxid. Redox. Signal. 2009, 11, 421-424.
- [21] **Von Gunten A, Schlaefke S, Überla K.** *Efficacy of Ginkgo biloba extract EGb 761® in dementia with behavioural and psychological symptoms: A systematic review.* World J Biol Psychiatry. 2015 Aug 27:1-12
- [22] **De Silva A, Lanerolle P.** *Nutraceuticals: concepts and controversies.* Ceylon Med J. 2011 Dec;56(4):171-3
- [23] **Kasper P. Kepp.** *Bioinorganic Chemistry of Alzheimer's Disease.* DTU Chemistry, Technical University of Denmark, DK 2800 Kongens Lyngby, Denmark
- [24] **Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M.** *Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders.* Mol Cell Biochem (2010) 345:91–104
- [25] **Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** *Alzheimer disease is multifactorial and heterogeneous.* Neurobiol Aging 2000; 21:901–902;
- [26] **Tumiatti V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C.** *Tacrine derivatives and Alzheimer's disease.* Curr Med Chem. 2010;17(17):1825-38.
- [27] **Dogterom P, Nagelkerke JF, Mulder GJ.** *Hepatotoxicity of tetrahydroaminoacridine in isolated rat hepatocytes: effect of glutathione and vitamin E.* Biochem Pharmacol. 1988 Jun 15;37(12):2311-3.
- [28] **Chen X, Zenger K, Amelie Lupp, Kling B, Heilmann J, Fleck C, Kraus B, Decker M.** *Tacrine-Silibinin Codrug Shows Neuro- and Hepatoprotective Effects in*

Vitro and Pro-Cognitive and Hepatoprotective Effects in Vivo. Med Chem 55 (2012). 5231- 5244

[29] **Minarini, A., Milelli, A., Tumiatti, V., Rosini, M., Simoni, E., Bolognesi, M.L., Andrisano, V., Bartolini, M., Motori, E., Angeloni, C., Hrelia, S.** *Cystamine-tacrine dimer: a new multitarget- directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment*. Neuropharmacology, 2012, 62(2), 997-1003.

[30] **Sai-Sai Xie, Jin-Shuai Lan, Xiao-Bing Wang, Neng Jiang, Ge Dong, Zhong-Rui Li, Kelvin D.G. Wang, Ping-Ping Guo, Ling-Yi Kong.** *Multifunctional tacrine trolox hybrids for the treatment of Alzheimer's Disease with cholinergic, antioxidant, neuroprotective, and hepatoprotective properties*. European Journal of Medicinal Chemistry 93(2015):42-50

[31] **Lupp A, Appenroth D, Fang L, Decker M, Lehmann J, Fleck C.** *Tacrine-NO donor and tacrine-ferulic acid hybrid molecules as new anti-Alzheimer agents: hepatotoxicity and influence on the cytochrome P450 system in comparison to tacrine*. Arzneimittelforschung. 2010;60(5):229-37.

[32] **Xiaojuan Chao, Xixin He, Yilin Yang, Xie Zhou, Minghua Jin, Shu Liu, Zhiyi Cheng, Peiqing Liu, Yuting Wang, Jianchen Yu, Yi Tan, Yingjuan Huang, Jian Qin, Simona Rapposelli, Rongbiao Pi.** *Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel tacrine-caffeic acid hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22 (2012)6498-50

[33] **Zhipei Sang, Yan Li, Xiaoming Qiang, Ganyuan Xiao, Qiang Liu, Zhenghui Tan, Yong Deng.** *Multifunctional scutellarin-rivastigmine hybrids with cholinergic antioxidant, biometal chelating and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23 (2015): 668-68

[34] **H. Zheng, M. B. H. Youdim and M. Fridkin.** *Synthesis and evaluation of peptidic metal chelators for neuroprotection in neurodegenerative diseases*. J. Med. Chem., 2009, 4095-4098

[35] **M. M. Dias, N. F. L. Machado and M. P. M. Marques.** *Dietary chromones as antioxidant agents—the structural variable*. Food Funct., 2011, 2, 595

Ringraziamenti

Sembrava un traguardo così lontano, a volte quasi irraggiungibile, invece eccoci qua, giunti alla fine di questi cinque anni di Università, così intensi e allo stesso tempo così fugaci...

Vorrei prima di tutto ringraziare la Professoressa Simona Rapposelli per avermi permesso di vivere questa splendida esperienza nel suo laboratorio. Grazie per la sua disponibilità e cortesia e soprattutto grazie per la fiducia mostrata nei miei confronti; tutto ciò ha incrementato la mia passione per la ricerca, stimolandomi e trasformando questo traguardo sempre immaginato come “finale” in un nuovo inizio.

Grazie a tutti i miei colleghi di laboratorio “syn-tesisti” che hanno reso questi mesi spensierati, divertenti ed emozionanti. Spero un giorno di avere la fortuna di trovare un ambiente di lavoro tanto piacevole quanto quello vissuto con voi “Rappy’s Team”.

Grazie anche a tutte quelle persone dello staff che ci hanno supportato e sopportato in queste lunghe giornate di sintesi: grazie Simona, Ketty ma in particolare grazie Giulia. Grazie per la tua costante pazienza, per la tua disponibilità ormai rivelatasi infinita, grazie per il tuo appoggio, per i tuoi sorrisi, per la tua spensieratezza, per la tua compagnia, per la tua forza... sei un esempio da seguire per me!

Obrigada a Prof.ssa Ana Paula Fonseca, prof.ssa de Escola Superior de Tecnologia da Saúde, que me fez viver uma experiência maravilhosa de laboratório e de vida em Coimbra.

Vorrei dedicare poi un particolare ringraziamento a tutte quelle persone che mi sono state vicine in questi anni in cui, nonostante gli innumerevoli momenti felici e spensierati, non sono mancati momenti di difficoltà. Non penso sia necessario fare un elenco di nomi, chi è sempre stato al mio fianco ed ha vissuto con me tutto ciò lo sa... grazie a VOI: qualcuno amico da una vita, altri amicizie più recenti ma non per questo meno profonde e intense; grazie perché la vostra presenza mi ha sostenuto ed aiutato nei momenti più duri, grazie perché mi siete sempre rimasti vicino, con affetto sincero, nonostante tutto, avete creduto in me e condiviso ogni tappa di questa tortuosa strada.

Un ringraziamento non può che prendere il volo – “direzione Coimbra”: grazie alla mia famiglia portoghese, i tre mesi vissuti in vostra compagnia rimarranno indelebili nel mio cuore.

Per ultimo lascio forse il ringraziamento più sentito: la mia famiglia. Grazie per il vostro sostegno morale, per aver sempre appoggiato liberamente ogni mia scelta, per la fiducia in me, grazie a tutti voi, zii, cugini(anzi direi fratelli)... grazie nonno per la tua dolcezza e spontaneità, sei l'uomo della mia vita e grazie anche a chi oggi non è più presente ma sono sicura sarebbe stata super-orgogliosa di me e poi più di tutti grazie a voi: babbo e mamma. Grazie perché avete rappresentato una guida costantemente presente nella mia vita, avete rappresentato un'ancora di salvezza nei momenti di difficoltà, siete stati il "timone" per ritrovare la via in balia delle onde... grazie per i valori con i quali mi avete cresciuto, per il vostro costante amore e per la vostra pazienza. Sono così innumerevoli le cose per cui dovrei ringraziarvi che alla fine questa pagina verrebbe più lunga della tesi stessa quindi riassumo il tutto in un semplice GRAZIE.

Concludo lasciando un piccolo ringraziamento anche a me stessa... alla fine me lo merito, no?!