

Università degli Studi di Firenze
Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Triennale in
Chimica

Elaborato finale

Screening e sintesi di nuovi inibitori degli
enzimi appartenenti alla famiglia delle
fosfotirosina protein-fosfatasi

Screening and synthesis of new inhibitors of
the enzymes belonging to the group of
phosphotyrosine protein phosphatase

Candidato: Fabbrini Maria Giulia

Relatore: Paoli Paolo

Correlatore: Cardona Francesca

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

1. Introduzione
2. Le Protein Fosfatasi
3. Meccanismo catalitico delle PTP
4. LMW-PTP nei procarioti
5. Inibitori PTP-selettivi
6. Scelta dell'inibitore per la nostra ricerca
7. Materiali e metodi
 - 7.1. Dosaggi di attività con p-nitrofenilfosfato (pNPP)
 - 7.2. Determinazione dei valori di IC_{50} , K_i e del tipo di inibizione
8. Parte Sperimentale
9. Modifiche sintetiche a partire dalla pirrolidina **3**
10. Discussione
11. Materiali
12. Metodi
 - 12.1. Purificazioni
13. Sintesi
 - 13.1. Sintesi del composto **43**
 - 13.2. Sintesi del composto **47**
14. Bibliografia
15. Ed infine i ringraziamenti...

1 Introduzione

Quasi tutte le funzioni cellulari sono modulate da complicati meccanismi di trasduzione del segnale, per cui stimoli extracellulari, quali fattori di crescita e sollecitazioni ambientali, sono percepiti, convertiti in segnali intracellulari, integrati e trasmessi al nucleo, al fine di generare risposte cellulari adeguate. Una delle strategie più utilizzata per regolare varie vie di segnalazione, è la fosforilazione reversibile delle proteine. L'aggiunta o la rimozione del gruppo fosfato (PO_4^{3-}) da una proteina può favorire l'interazione proteina-proteina, modulare la funzione degli enzimi e, soprattutto, regolare l'attività enzimatica (Figura 1). La fosforilazione reversibile delle proteine è regolata dall'azione coordinata ed antagonista di due classi di enzimi: le chinasi e le fosfatasi. La prima classe comprende differenti famiglie in grado di catalizzare il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP ad alcuni residui aminoacidici, quali la serina, la treonina o la tirosina. Al contrario, le fosfatasi sono in grado di catalizzare la rimozione di tali gruppi fosfato favorendo l'idrolisi dei legami esterei tra i vari residui ed la molecola di fosfato inorganico. Le fosfotirosina chinasi (PTK) e gli enzimi antagonisti, le fosfotirosina protein fosfatasi (PTP), sono essenziali per le cellule dal momento che sono coinvolti nella regolazione della maggior parte delle vie di segnalazione attivate dai fattori di crescita. La loro azione coordinata permette di regolare numerose attività cellulari fisiologiche fondamentali, come ad esempio la crescita, il differenziamento, la sopravvivenza, la migrazione, il metabolismo, l'adesione cellulare, la risposta immunitaria, e la trascrizione.¹

1 Maccari R.; Ottanà R.; (2012) *J. Med. Chem.* , 55, 2–22.

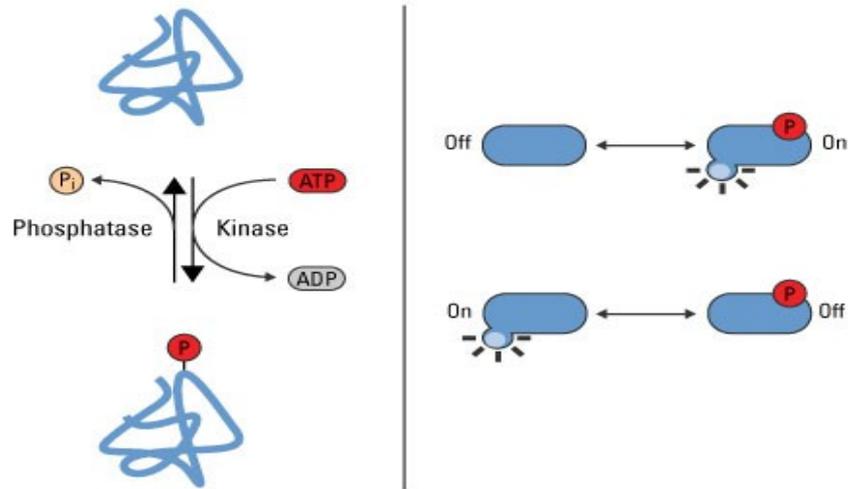


Figura 1: Modulazione dello stato di fosforilazione delle proteine mediata dall'azione antagonista di chinasi e fosfatasi

2 Le protein fosfatasi

Tutte le PTP hanno caratteristiche strutturali comuni nel sito attivo, infatti condividono un caratteristico dominio catalitico altamente conservato di circa 240-250 aminoacidi, ed agiscono attraverso un meccanismo analogo, ma la loro alta specificità deriva dall'intorno del sito, che varia a seconda del tipo di enzima. Sono composte da strutture terziarie di β -sheet twisted affiancate da α -eliche su entrambi i lati. Il sito attivo della fosfatasi è situato all'interno di un fessura sulla superficie della proteina. Le tasche dove risiede il sito hanno forme e dimensioni diverse, a causa dell'inserzione di diversi tipi di substrato. Le PTP presentano una specifica regione variabile, localizzata alle estremità N- o C-terminale, responsabile delle diverse proprietà funzionali e strutturali di ognuna (Figura 2).



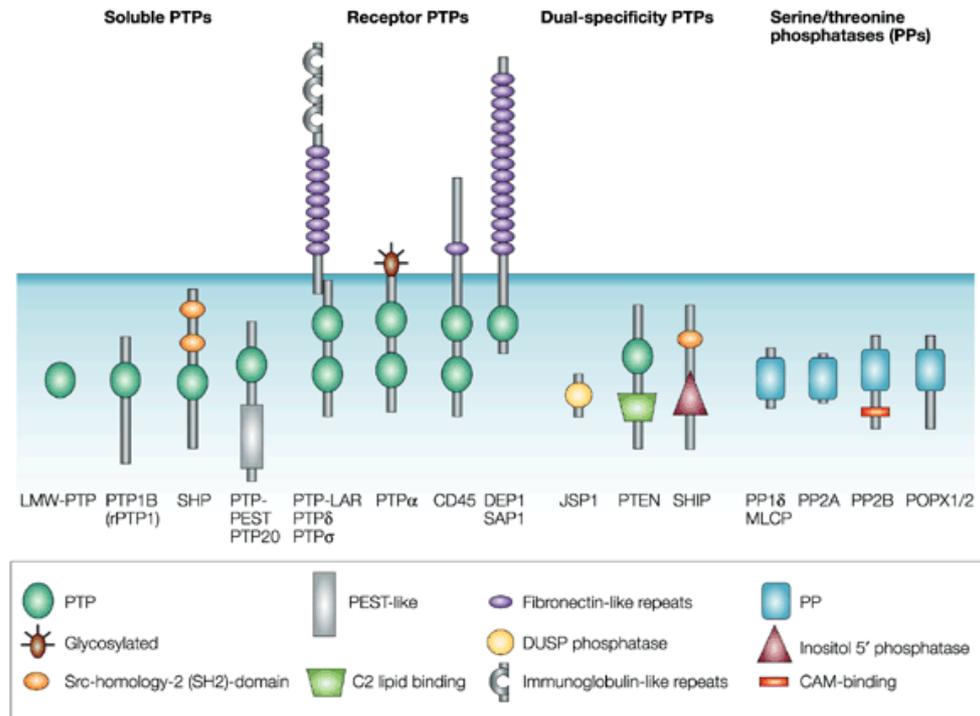
Figura 2: Struttura fosfatasi dove la parte variabile è delimitata dal N-terminale in blu e C-terminale in rosso

Il genoma umano codifica più di 100 PTPasi, e queste includono sia enzimi citoplasmatici sia recettori transmembranalici. Sulla base delle loro differenze strutturali e funzionali le PTP vengono classificate in almeno quattro sottofamiglie:

- 1) fosfotirosina fosfatasi classiche,
- 2) fosfotirosina fosfatasi a doppia specificità (DSP),
- 3) fosfotirosina fosfatasi appartenenti alla famiglia della Cdc25,
- 4) fosfotirosina fosfatasi a basso peso molecolare (LMW-PTP)

Tali enzimi possiedono tutti un sito attivo molto conservato ed un meccanismo catalitico comune. Nel sito attivo di tutti questi enzimi è presente la sequenza (H/V)C(X)₅R(S/T) altamente conservata, contenente un residuo di cisteina, essenziale per il meccanismo catalitico, e un residuo di arginina, implicato nel legame del substrato.²

² Wang W-Q.; Sun J-P.; Zhang Z-Y.; (2003) *Curr. Topics Med. Chem.*, **3**, 739-748.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 3: Nuclei fondamentali che compongono le diverse PTP

La famiglia delle fosfotirosina fosfatasi classiche comprende circa 40 membri, tutti con un dominio catalitico di 250 aminoacidi. Secondo la loro localizzazione subcellulare, possono essere ulteriormente suddivise in enzimi solubili con localizzazione citoplasmatica e recettori con attività tirosino chinasi.

Gli enzimi appartenenti alla seconda famiglia sono presenti soprattutto nella membrana plasmatica, e hanno un dominio extracellulare variabile, che contiene motivi strutturali importanti, tipici delle molecole di adesione cellulare. Questo ci suggerisce che queste fosfatasi possano mediare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice.³ Si riconoscono inoltre, un dominio transmembrana, domini intracellulari, tra cui uno o due domini catalitici, e domini con funzione regolatrice. I domini citoplasmatici presentano diversi elementi di omologia, mentre quelli extracellulari sono molto variabili.⁴ Tra essi ricordiamo CD45, presente nelle cellule ematopoietiche, essenziale per l'attivazione della risposta immunitaria mediata da linfociti T e B, e LAR (Leucocyte Antigen Related), che ha un ruolo predominante nello sviluppo del sistema nervoso, ed è implicato nella

3 Tonks N. K.; (2006) *Nature*, 7, 834-846.

4 Bialy L.; Waldmann H.; (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44, 3814-3839.

segnalazione insulinica.⁵

Le PTPasi citoplasmatiche possono associarsi alle membrane, o localizzarsi nel nucleo o associarsi a proteine citoscheletriche. Sono coinvolte nella regolazione di importanti processi di segnalazione intracellulare, come quelli che regolano il metabolismo, la divisione cellulare, l'adesione e la migrazione. Tutte possiedono un dominio catalitico costituito da 200-300 amminoacidi, e domini con funzione regolatrice, importanti per la localizzazione cellulare.⁶

Esempi di PTP intracellulari sono SHP1 e SHP2, e l'enzima PTP1B. Esso esplica la sua azione soprattutto nel controllo del metabolismo cellulare,⁷ in particolare nella regolazione dello stato di fosforilazione del recettore dell'insulina. Ricerche effettuate su topi privi del gene per la PTP1B, hanno evidenziato che la mancata espressione della proteina non causa disfunzioni: questi topi risultano sani, resistenti all'obesità e al diabete di tipo 2.⁸

Le DSP, strutturalmente e funzionalmente diverse dalle altre sottofamiglie di PTPasi, contano circa 50 membri. Molti degli enzimi appartenenti alla famiglia delle DSP si distinguono per la loro capacità di idrolizzare i residui di fosfoserina, fosfotreonina, e fosfotirosina. Le DSP contengono un singolo dominio catalitico che è simile, con un N- o C-terminale del dominio variabile, per regolare la loro specificità. Sono localizzate a livello nucleare, e rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione delle vie di segnalazione attivate in seguito a condizioni di stress, a stimoli proliferativi o apoptotici.⁹ Un esempio importante di questa classe di enzimi è la lipido-fosfatasi PTEN.¹⁰

La famiglia delle Cdc25 fosfatasi comprende tre enzimi che nell'uomo regolano il ciclo cellulare, CDC25A, CDC25B, CDC25C, ognuna delle quali è responsabile della defosforilazione e attivazione delle chinasi coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare.¹¹ Sebbene le CDC25 fosfatasi possiedono una doppia specificità verso substrati proteici, sono classificate come sottofamiglia separata, a causa delle loro distinte proprietà strutturali. Esse hanno come bersaglio alcuni enzimi particolari: le chinasi attivate in seguito all'interazione con le cicline (cyclin dependent kinases, CDKs), proteine essenziali

5 Cheng A.; Uetani N.; Simoncic P.D.; Chaubey V.P.; Lee-Loy A.; McGlade C.J.; Kennedy B.P.; Tremblay M.L.; (2002) *Dev. Cell.*, **2**, 497-503.

6 Zhang S.; Zhang Y-Z.; (2007) *Drug Discov. Today*, **12**, 373-381.

7 Zhang Z. Y.; (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 416-423.

8 I) Zhang S., Zhang Y-Z.; (2007), *Drug Discov. Today*, **12**, 373-381

II) Tonks N. K.; (2006) *Nature*, **7**, 834-846

9 Tonks N. K.; (2006) *Nature*, **7**, 834-846.

10 Larsen M.; Tremblay M.L.; Yama K.M.; (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 700-711.

11 Lyon M. A.; Ducruet A. P.; Wipf P.; Lazo J. S.; (2002) *Nat. Rev.*, **1**, 961-976.

per la regolazione del ciclo cellulare. La fosfatasi Cdc25A stimola l'attivazione del complesso ciclina E – Cdk2, rimuovendo i gruppi fosfato presenti sulla Thr14 e Tyr15 della Cdk2.¹² CdcA, B e C sono espresse ed attivate a tempi ben precisi durante il ciclo cellulare. Le numerose ricerche effettuate su tali enzimi hanno evidenziato che ciascuno di essi ha come bersaglio differenti complessi ciclina-Cdk (Figura 4). Cdc25B e Cdc25C svolgono la loro funzione principalmente nella transizione G2/M, mentre Cdc25A promuove l'ingresso nella fase S. Questo è stato confermato dall'analisi del livello di trascrizione dei geni di queste proteine, che raggiunge un massimo in G1 per Cdc25A¹³ e in G2 per Cdc25B.¹⁴

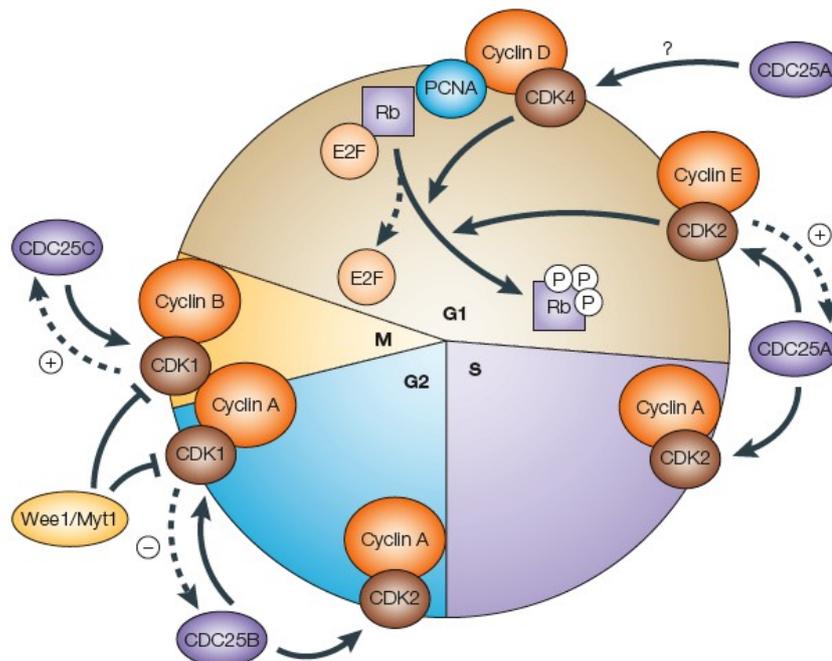


Figura 4: Ruolo delle fosfatasi appartenenti alla famiglia di Cdc25 nel ciclo cellulare

12 Jinno S.; Suto K.; Nagata A.; Igarashi M.; Kanaoka Y.; Nojima H.; Okayama H.; (1994) *EMBO J.*,**13**, 1549–1556.

13 Jinno S., Suto K., Nagata A., Igarashi M., Kanaoka Y., Nojima H. & Okayama H., (1994) *EMBO J.*,**13**, 1549–1556.

14 Lammer C.; Wagerer S.; Saffrich R.; Mertens D.; Ansorge W.; Hoffmann I.; (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 2445–2453.

Le LMW-PTP sono enzimi solubili, di circa 18 kDa, che sono stati identificati e isolati in un'ampia varietà di procarioti e organismi eucarioti, come i batteri, lieviti e mammiferi. Nei tessuti dei mammiferi, sono state identificate due forme, IF1 e IF2, generate attraverso un meccanismo di splicing alternativo. Sebbene questi enzimi presentino circa il 70% di omologia di sequenza, differiscono per la mobilità elettroforetica, hanno diversi valori di K_m , e la loro attività risulta diversamente influenzata da alcuni composti eterociclici.¹⁵

Le LMW PTPasi hanno un ruolo di controllo nella mitosi, in quanto vanno ad interagire e a defosforilare il PDGF-r (platelet-related growth factor receptor) inattivandolo, ed arrestando così la crescita cellulare. Uno dei principali meccanismi di regolazione dell'attività delle LMW PTPasi è l'ossidazione reversibile del residuo di cisteina essenziale per l'attività catalitica. E' stato dimostrato che, in presenza di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), si assiste all'ossidazione delle cisteine 12 e 17 con formazione di un ponte disolfuro, e conseguente inattivazione dell'enzima, a causa del cambiamento strutturale. La riduzione delle due cisteine per via enzimatica ad opera di enzimi quali glutaredossina e tioredossina, permette poi il totale recupero dell'attività enzimatica.¹⁶

3 Meccanismo catalitico delle PTP

Il sito attivo delle PTP è costituito, oltre che dai residui catalitici, anche da diversi amminoacidi che formano una tasca per il riconoscimento ed il legame del substrato. La struttura fondamentale invariata e comune alle PTP è il sito attivo che contiene nella tasca una Cisteina (Cys), avente una pKa stranamente bassa (~ 5), un residuo di Arginina (Arg), che forma legami a idrogeno con gli ossigeni nel substrato, agendo come legante bidentato, ed un residuo acido, un acido aspartico (Asp).

Il meccanismo catalitico delle PTP prevede sostanzialmente due passaggi. Nella primo, in seguito al legame del substrato nel sito attivo, il residuo di cisteina effettua un attacco nucleofilo sull'atomo di fosforo del gruppo fosfato, con formazione di un intermedio covalente cisteinil-fosfato. Contemporaneamente all'attacco nucleofilo, l'acido aspartico, dona un protone all'atomo d'ossigeno dell'anello fenolico, favorendo la rottura del legame fosforo-ossigeno. In conseguenza alla rottura del legame, il gruppo uscente abbandona il

15 I) Dissing J.; Svensmark O.; (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1041**: 232-242;
II) Fujimoto S.; Mukarami K.; Ishawaka A.; Himi K.; Ohara A.; (1998) *Chem. Pharm. Bull.*, **36**: 3020-3026.

16 Ramponi G.; Raugeri G.; Chiarugi P.; (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 941-949.

sito attivo dell'enzima. Durante il secondo passaggio, l'aspartato sottrae un protone ad una molecola di acqua attivandola. Nella forma attivata la molecola d'acqua attacca, idrolizzando, l'intermedio cisteinil-fosfato, permettendo la liberazione del gruppo fosfato e la rigenerazione dell'enzima.(Figura 5)

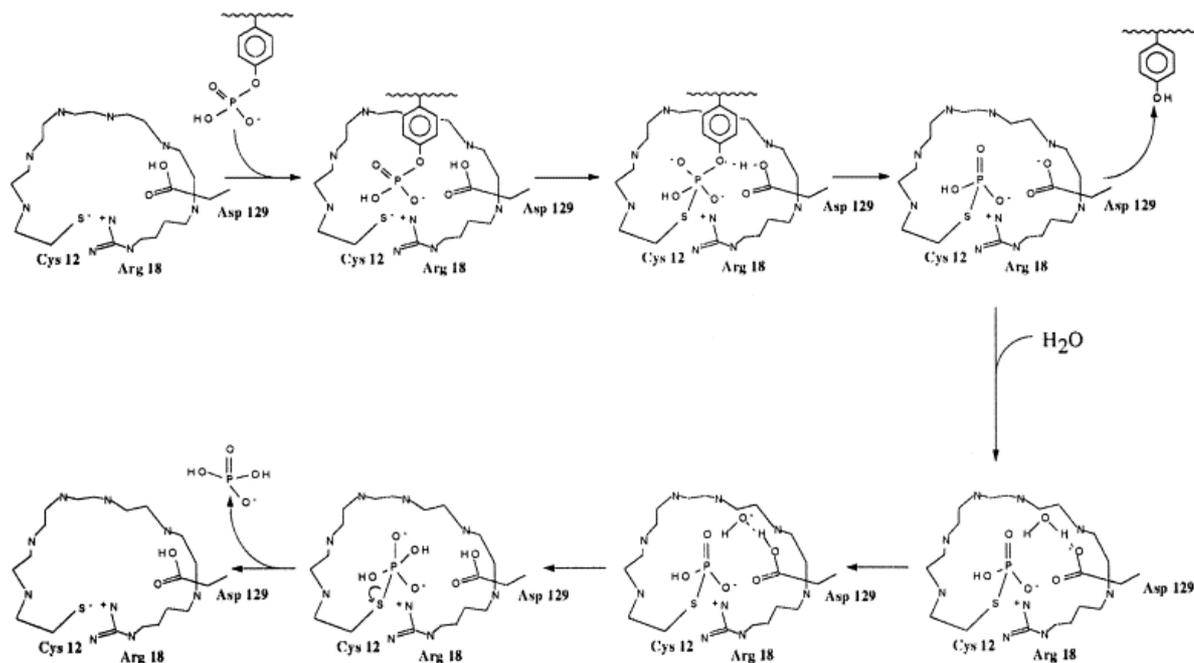


Figura 5: Schema del meccanismo d'azione proposto per la PTP

4 LMW-PTP nei procarioti

Recentemente è stato dimostrato che molte proteine batteriche possono essere fosforilate reversibilmente su tirosina, grazie all'azione degli enzimi tirosina chinasi e fosfotirosina fosfatasi. In aggiunta è stato osservato che molti batteri possiedono i geni ed esprimono gli enzimi appartenenti alla famiglia delle LMW-PTP. Nei procarioti le LMW-PTP sono importanti fattori di virulenza, in quanto sono implicate sia nella produzione che nel trasporto degli esopolisaccaridi e dei polisaccaridi che formano la capsula batterica, oltre ad essere implicate in altre funzioni essenziali per sostenere l'infezione delle cellule ospiti.¹⁷

17 I) Ilan O.; Bloch Y.; Frankel G.; Ullrich H.; Geider K.; Rosenshine I.; (1999) *EMBO J.* **18**, 3241–3248;

II) Whitfield C.; Roberts I.S.; (1999) *Mol. Microbiol.* **31**,1307–1319;

III) Bender M. H.; Yother J.; (2001) *J. Biol. Chem.* **276**,47966–47974.

Le LMW-PTP nei procarioti hanno funzioni aggiuntive oltre a quelle convenzionali: alcuni batteri patogeni hanno sviluppato diverse strategie al fine di sovvertire la risposta immunitaria e creare luoghi adatti alla loro sopravvivenza. Una strategia è la secrezione di proteine in grado d'interferire con le vie di segnalazione delle cellule bersaglio, impedendo a queste ultime di attivare risposte di difesa in grado di eliminare le specie batteriche. In aggiunta, è stato osservato che in molti casi, le interazioni patogeno-ospite variano a seconda della specie batterica, ma sono sempre regolate dall'attività di protein fosfatasi.¹⁸ Tra i patogeni che operano in questo modo vi sono la *Salmonella enterica*, la *Legionella pneumophila* e *micdadei* e il *Mycobacterium tuberculosis*. Quest'ultimo è particolarmente virulento; si ritiene che un terzo della popolazione mondiale ne sia affetta, e che, ad un ritmo di circa uno al secondo, si verifichi un nuovo caso di infezione. Nel 2007 vi erano circa 13,7 milioni di casi cronici attivi e nel 2010 8,8 milioni di nuovi casi, 1,45 milioni di decessi, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Queste popolazioni contraggono la tubercolosi più facilmente, poiché hanno spesso un sistema immunitario più compromesso a causa degli alti tassi di AIDS.¹⁹

Gli studi hanno dimostrato che il *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 6) altera direttamente le vie di segnalazione della cellula ospite secernendo una fosfatasi, che interrompe i processi cellulari fondamentali e promuove la sua sopravvivenza all'interno di essa.



Figura 6: *Mycobacterium tuberculosis* ottenuta con SEM

I Macrofagi alveolari umani sono il principale bersaglio del batterio, poiché forniscono la prima linea di difesa contro i microbi a livello polmonare. Questi microrganismi tendono a fagocitare particelle estranee in fagosomi generando nella membrana significativi

18 Wong D.; Chao J.D.; Av-Gay Y.; (2013) *Trends Microbiol.* **21**, 100-109.

19 Tuberculosis Fact sheet N°104. World Health Organization, November 2010.

cambiamenti di pH, che permettono ad essi di distruggere corpi estranei e quindi acquisiscono proprietà antimicrobiche. La formazione della variazione di pH sulla membrana è detta maturazione e le LMW-PTP batteriche interrompono proprio questo processo, arrestandolo nella fase iniziale, impedendo alla membrana di passare dal pH fisiologico a quello acido. Questo crea un ambiente favorevole per la sopravvivenza del batterio all'interno dell'ospite umano mentre elude il sistema immunitario.²⁰ Il *Mycobacterium tuberculosis* dispone di un ampio repertorio di enzimi secreti, ma le LMW-PTP hanno senz'altro un ruolo chiave. Dalla necessità di contrastare queste e altre infezioni batteriche, sono stati sviluppati inibitori che hanno come target le PTPasi. Gli studi recenti vertono sull'identificazione di una molecola che posizionandosi sul sito attivo arresti o rallenti il processo delle PTP batteriche, rendendo l'infezione meno virulenta e maggiormente contrastabile.

Nelle cellule eucariote, come quelle che compongono il nostro organismo, sono state accertate che le alterazioni delle attività di diverse PTP umane (HCPTP) sono implicate nella patogenesi di alcune malattie, tra cui il diabete, l'obesità, il cancro, le infiammazioni e le malattie cardiovascolari.

In particolare è stato dimostrato che alcuni di questi enzimi sono coinvolti nella progressione del cancro al seno, suggerendoci che l'inibizione di HCPTP può anche essere un possibile metodo per future terapie contro il cancro, poiché potrebbe controllare invasività delle cellule tumorali e quindi le metastasi.

5 Inibitori PTP selettivi

Il modelling degli inibitori deve essere strutturato sulla base del sito attivo della proteina: maggiori sono le interazioni che riesco a formare tra la molecola e i residui amminoacidici, maggiore sarà l'efficacia e la selettività dell'inibizione su quell'enzima. Il sito attivo delle PTPasi classiche e le LMW-PTP è profondo circa 9 Å ed è questa caratteristica a renderli specifici per i residui di tirosina fosforilata come substrato. Nel caso delle PTPasi a doppia specificità notiamo, invece, che il sito attivo è rappresentato da una tasca di minor profondità, circa 6 Å, e ciò permette anche a residui fosforilati di Thr e Ser di adattarsi al sito. Le numerose ricerche effettuate negli ultimi anni da molti gruppi di ricerca, hanno dimostrato che la presenza di un sito catalitico comune crea notevoli

20 Wong D.; Chao J.D.; Av-Gay Y.; (2013) *Trends Microbiol.* **21**, 100-109.

problemi per lo sviluppo di inibitori potenti e specifici nei confronti delle PTP. Per esempio, è stato osservato che, per ottenere potenti inibitori, l'interazione solo con il sito catalitico non è sufficiente, ma occorre sviluppare molecole in grado di interagire con altri amminoacidi posti nelle vicinanze dello stesso sito attivo. In tal modo la forza di legame degli inibitori può essere incrementata fino a raggiungere costanti di inibizione nell'ordine del nanomolare o inferiori. (Figura 7)

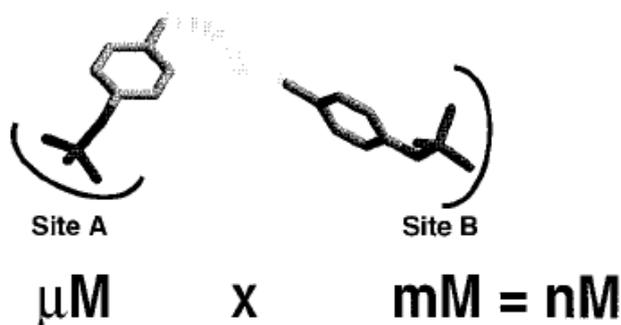
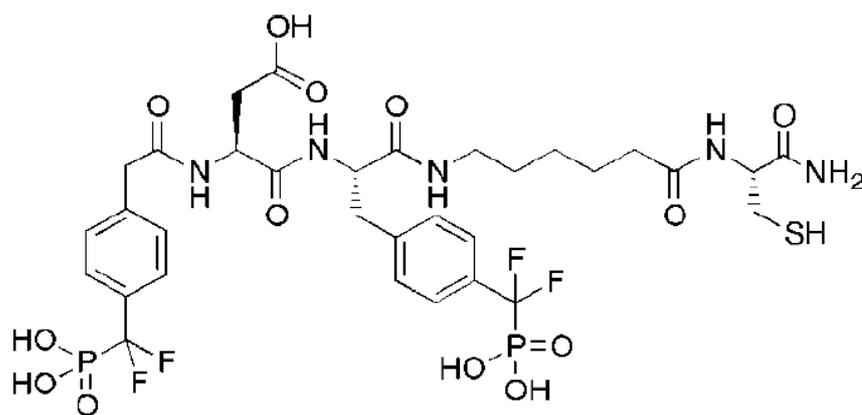


Figura 7: Schema d'azione degli inibitori con siti multipli d'interazione. I due gruppi chimici dell'inibitore vanno a legarsi nel sito attivo e nel secondo sito, con differente affinità. Le costanti di affinità dei singoli gruppi chimici si combinano per effetto del principio dell'additività dell'energia libera di legame. Ne risulta una affinità di legame molto elevata

Nel caso dell'enzima PTP1B, l'analisi della struttura cristallina dell'enzima, ha permesso d'individuare un secondo sito, non catalitico, di legame per gli arilfosfati sulla superficie dell'enzima, adiacente al sito attivo e non conservato nelle altre PTPasi. Ciò ha indotto i ricercatori a progettare e sintetizzare nuove molecole in grado di legare allo stesso tempo entrambi i siti ed inibire selettivamente tale PTP. I risultati di alcune di queste ricerche hanno portato alla creazione di composti con struttura peptido-mimetica come il composto riportato sotto, nella Figura 8.



Compound **2**, $K_i = 1.8 \text{ nM}$

Figura 8: Composto 2, potente inibitore della PTP1B che, mediante i due gruppi fosfato, è in grado di interagire sia con il sito attivo che con il secondo sito di legame per gli arilfosfati.

Ricerche approfondite hanno dimostrato che esso è in grado d'interagire con entrambi i siti di legame per gli arilfosfati presenti sulla superficie dell'enzima, raggiungendo un'affinità di 1.8 nM.²¹ (Figura 9)

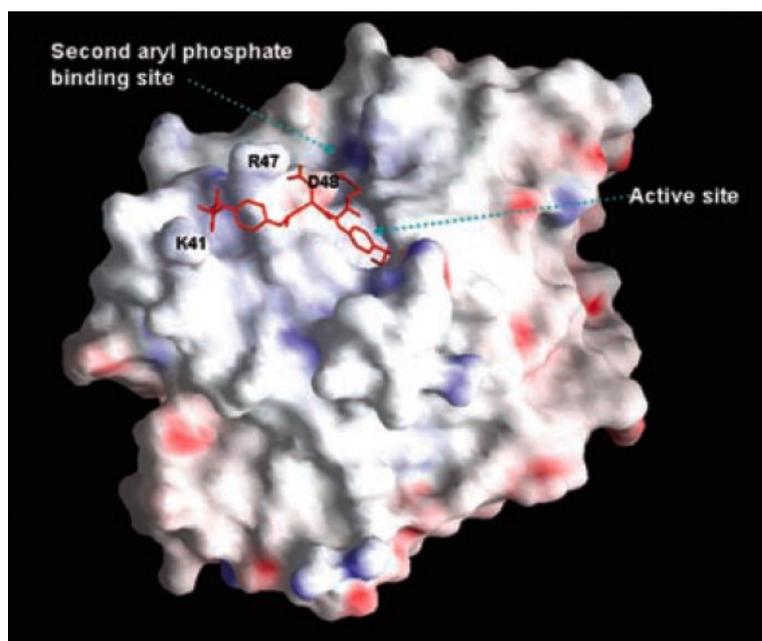


Figura 9: Superficie della PTP1B e zone di contatto con il composto 2. Le zone in blu sono cariche positivamente, mentre quelle rosse negativamente. In evidenza gli aminoacidi Lys41, Arg47 e Asp48

²¹ Zhang Z-Y.; Jin-Peng S.; Fedorov A.A.; Seung-Yub L.; Xiao-Ling G.; Kui S.; Lawrence D.S.; Almo S.C.; (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12406–12414.

L'analisi delle strutture cristallografiche delle LMW-PTP ha messo in evidenza che nelle regioni adiacenti al sito attivo di questi enzimi sono presenti numerosi residui idrofobici. (Figura 10)

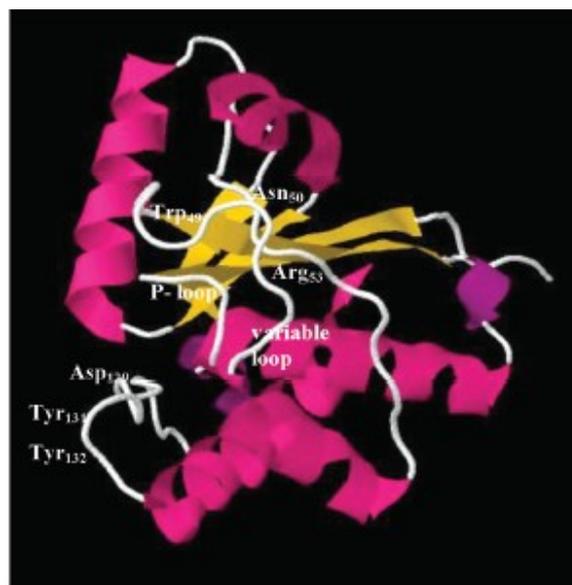
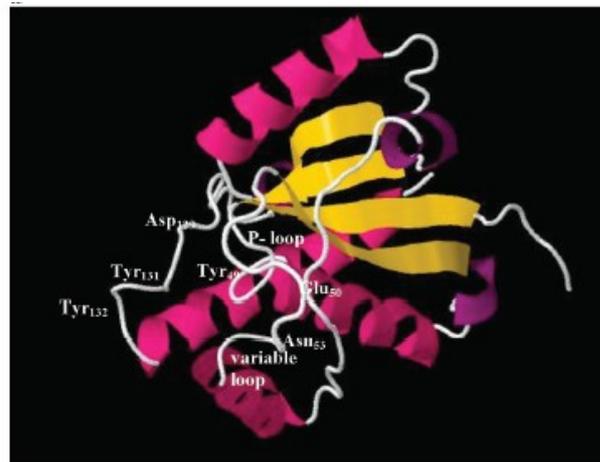


Figura 10: Strutture tridimensionali delle LMW-PTP. In alto IF1; in basso IF2. Nella figura è evidenziato il sito attivo ed alcuni residui che lo circondano

Alcuni gruppi di ricerca hanno utilizzato programmi di docking molecolare, che simulano le possibili interazioni con migliaia di molecole diverse, per selezionare nuove strutture in grado d'inibire tali enzimi. Seguendo quest'approccio, sono stati individuati, a partire da

una library contenente più di 2000 composti, 30 molecole in grado d'interagire con le LMW-PTP. Le analisi enzimatiche eseguite in un secondo momento hanno dimostrato che cinque delle molecole selezionate possiedono un IC_{50} inferiore a $10 \mu M$.²² L'interazione con il sito attivo degli enzimi è garantita dalla presenza di gruppi fosfotirosina mimetici, per esempio gruppi solfonici o fosfonici, che formano numerose interazioni con gli aminoacidi che costituiscono il sito di legame per il substrato all'interno del sito attivo (Figura 11)

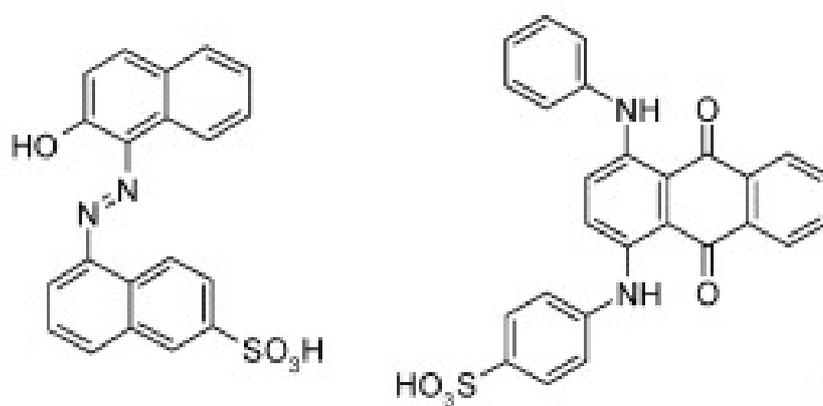


Figura 11: Alcune delle molecole in grado d'inibire le LMW-PTP selezionate attraverso screening in silico

Se sulla carta uno studio in silico possa sembrare la scelta migliore, non è detto che in vivo il tutto funzioni a causa di ulteriori parametri non calcolabili dal docking. Da tenere in considerazione, oltre a ciò, è la permeabilità della molecola nella cellula per arrivare ad interagire con le PTP: composti troppo idrofobici non si scioglieranno nell'ambiente acquoso dell'organismo e non saranno biodisponibili, come anche sostanze molto cariche in solventi acquosi perché non riusciranno a permeare all'interno della cellula e raggiungere gli enzimi; non da ultimo va valutata la tossicità dell'inibitore stesso e gli eventuali effetti collaterali. Per ovviare al problema della scarsa biodisponibilità, determinata dall'eccessiva carica negativa dei gruppi solforici e fosforici, è stata valutata la possibilità di sostituire tali funzionalità con gruppi monocarbossilati. Analizzando ampie library costituite da composti non contenenti gruppi fosforici o solfonici, sono state

²² Homan K.T.; Balasubramaniam D.; Zabell A.P.R.; Wiest O.; Helquist P.; Stauffacher C.V.; (2010) *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 5449–5456.

selezionate 34 molecole in grado d'interagire con le LMW-PTP. Alcune di queste hanno rilevato possedere valori di K_i nell'ordine del 10 μM (Figura 12).²³

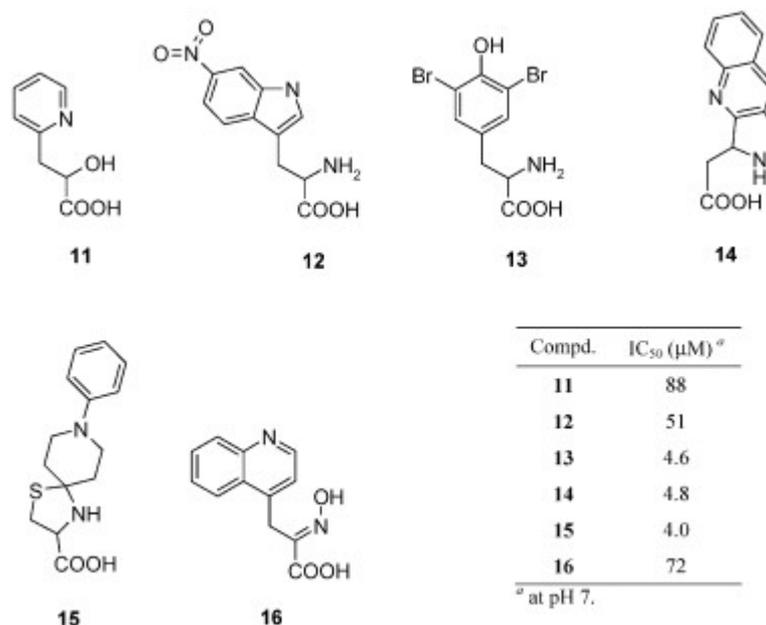
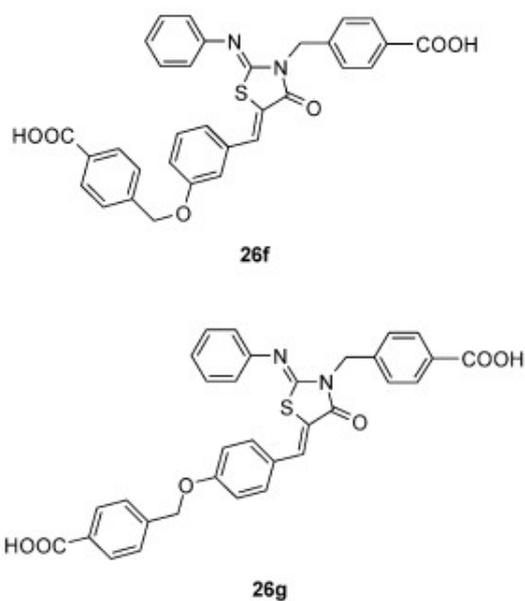


Figura 12: Molecole non contenenti gruppi solfonici o fosfonici in grado d'inibire l'enzima IF1. Nella tabella, sono riportati i valori di IC₅₀ calcolati nei confronti dell'enzima IF1

Recentemente è stato osservato che alcuni derivati dell'acido 4-[(5-arilidene-2,4-dioxotiazolidin-3-il)metil]benzoico ed alcuni loro 2-fenilimmino derivati sono in grado di comportarsi da inibitori bi- e tridentati, interagendo con il sito attivo dell'enzima, mediante un gruppo carbossilico e con altri residui che circondano in sito attivo delle LMW-PTP.²⁴ (Figura 13)

²³ Vidal D.; Blobel J.; Perez Y.; Thormann M.; Pons M.; (2007) *Eur. J. Med. Chem.* **42**, 1102-1108.

²⁴ I) Maccari R.; Paoli P.; Ottanà R.; Jacomelli M.; Ciurleo R.; Manao G.; Steindl T.; Langer T.; Vigorita M. G.; Camici G.; (2007) *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5137-5149;
 II) Ottanà R.; Maccari R.; Ciurleo R.; Paoli P.; Jacomelli M.; Manao G.; Camici G.; Laggner C.; Langer T.; (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1928-1937;
 III) Maccari R.; Ottanà R.; Ciurleo R.; Paoli P.; Manao G.; Camici G.; Laggner C.; Langer T.; (2009) *Chem. Med. Chem.* **4**, 957-962.



Compd.	IC ₅₀ (μM)		
	IF1	IF2	PTP1B
25a	0.9	13.0	2.8
25b	2.5	5.6	1.6
25c	7.1	18.4	1.1
25d	37.0	130.0	18.0
25e	12.0	92.0	6.5
26a	3.1	8.2	1.1
26b	2.7	21.5	1.1
26c	3.1	12.1	3.8
26d	5.4	26.1	1.9
26e	3.7	13.8	1.9
26f	0.5	27.6	0.22
26g	5.8	14.3	0.55

Figura 13: Derivati dell'acido benzoico in grado d'inibire le LMW-PTP e l'enzima PTP1B

Nella maggior parte dei casi tali composti mostrano elevate affinità (K_i inferiore al μM) e, in alcuni casi, anche una discreta selettività d'azione. (Figura 14)

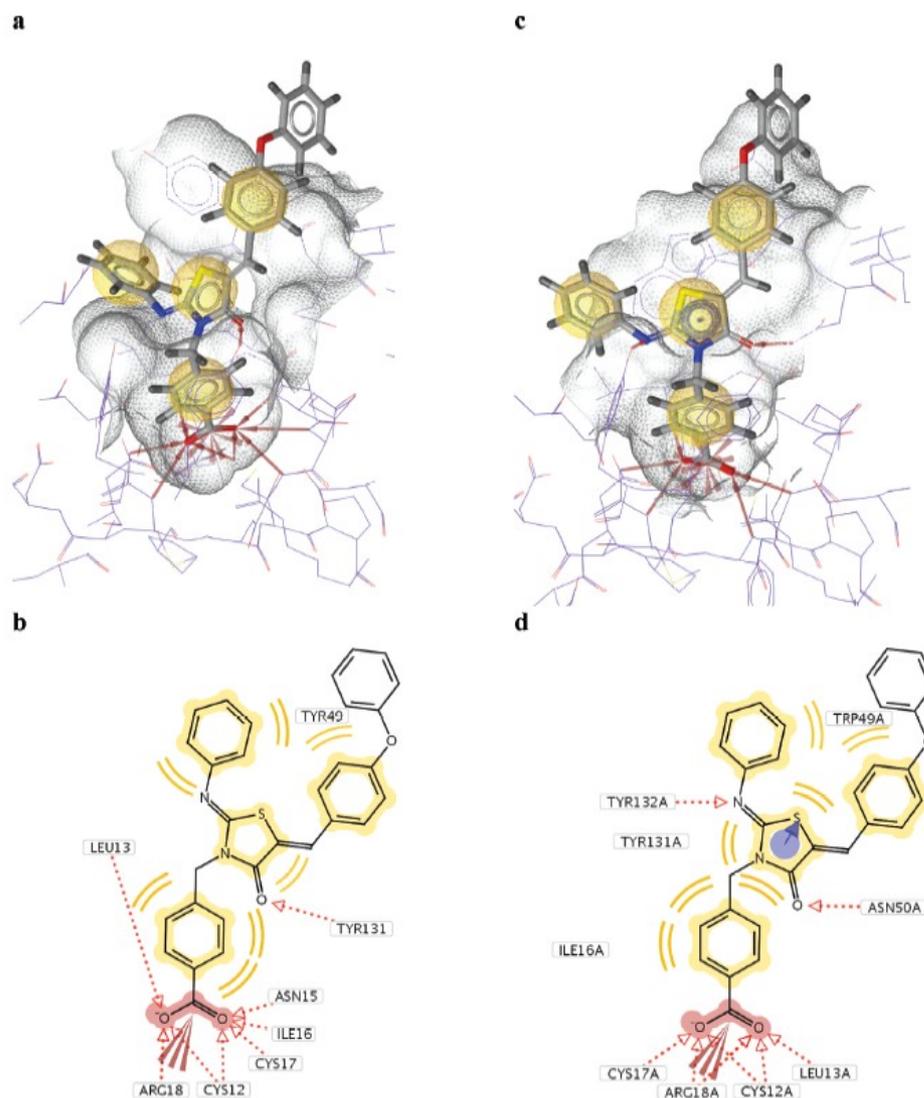


Figura 14: Analisi dell'interazione tra alcuni derivati dell'acido benzoico con gli enzimi IF1 (a,b) ed IF2 (c,d). Le immagini sono state ottenute utilizzando le strutture tridimensionali degli enzimi presenti nelle banche dati ed il programma di simulazione Ligand- Scout v2.02

Ulteriori ricerche hanno dimostrato che utilizzando approcci simili, è stato possibile selezionare molecole in grado d'inibire le PTP batteriche. Partendo da una library di composti isossazolici bidentati, sono state selezionate molecole con costanti di inibizione nell'ordine del micromolare. Alcuni di questi composti, quali il composto 100 (Figura 15 A), sembrano inibire la fosfatasi del *Mycobacterium tuberculosis*, interagendo con il sito attivo e con un sito secondario presente esclusivamente nell'enzima batterico ($K_i = 1.5 \mu\text{M}$).²⁵

25 Beresford N. J.; Mulhearn D.; Szczepankiewicz B.; Liu G.; Johnson M. E.; Fordham-Skelton A.; Abad-Zapatero C.; Cavet J. S.; Taberner L., (2009) *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 928–936.

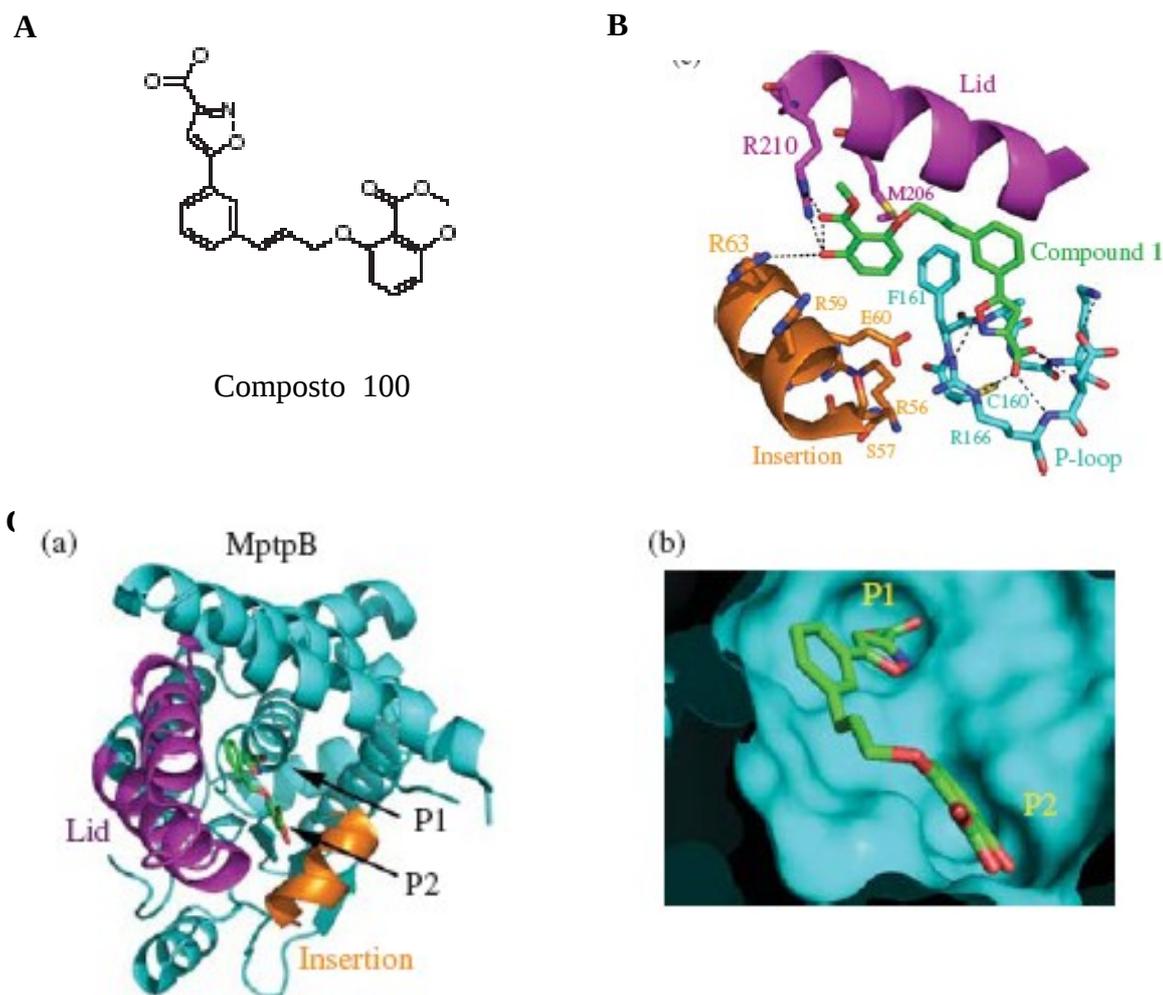


Figura 15: Derivato isossazolico in grado di inibire la fosfatasi di *M. tuberculosis*. A, struttura chimica del composto. B, C e D, binding del composto 1 all'interno del sito attivo dell'enzima

Infine, recentemente è stato osservato che anche alcuni naftilcalconi sono in grado di inibire sia le PTP umane che quella di *Mycobacterium tuberculosis*.²⁶

²⁶ I) Chiaradia L. D.; Mascarello A.; Purificação M.; Vernal J.; Cordeiro M. N. S.; Zenteno M. E.; Villarino A.; Nunes R. J.; Yunes R. A.; Terenzi H. (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6227–6230;

II) Mascarello A.; Chiaradia L. D.; Vernal J.; Villarino A.; Guido R. V. C.; Perizzolo P.; Poirier V.; Wong D.; Martins P. G. A.; Nunes R. J.; Yunes R. A.; Andricopulo A. D.; Av-Gay Y.; Terenzi H.; (2010) *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 3783–3789;

III) Yoon G.; Lee W.; Kim S. N.; Cheon S. H., (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5156–5157.

Sulla base di tali evidenze sperimentali, alcuni ricercatori hanno prodotto per sintesi una library di naftilcalconi nel tentativo di individuare nuovi potenti e specifici inibitori della PTP del *M. tuberculosis*. Questa ricerca ha permesso di determinare nuovi inibitori con IC_{50} nell'ambito del micromolare ed in grado di inibire selettivamente l'enzima Mtb PtpB, una delle due isoforme della tirosin fosfatasi batterica.²⁷(Figura 16)

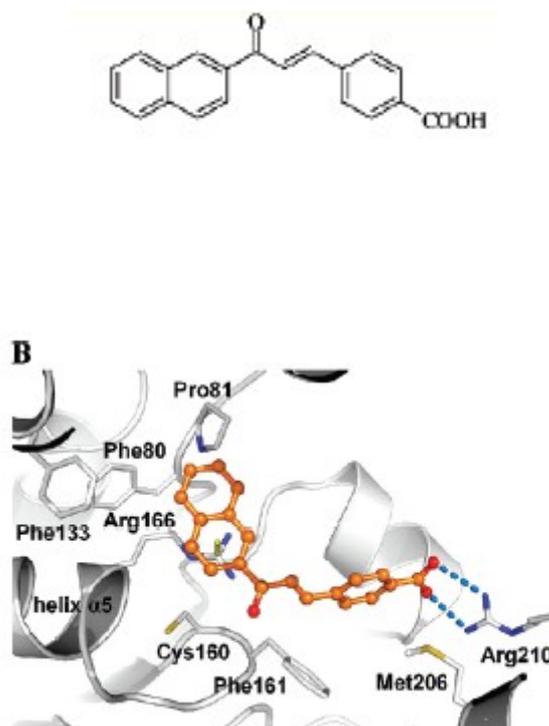


Figura 16: Struttura e modalità di binding di uno dei naftilcalconi in grado di inibire selettivamente l'isoforma MtbPtpB di *M. tuberculosis*

²⁷ Chiaradia L.D.; Martins P.G.A.; Cordeiro M.N.S.; Guido R.V.C.; Ecco G.; Andricopulo A.D.; Yunes R.A.; Veronal J.; Nunes R.J.; Terenzi H.;(2012) *J. Med. Chem.* 55, 390–402.

6 Scelta dell'inibitore per la nostra ricerca

Il nostro studio è partito da una library di imminozuccheri forniteci dalla Dott.ssa Cardona. Questi composti hanno strutture analoghe ai carboidrati, dove al posto dell'ossigeno endociclico vi è un atomo di azoto. Essi possiedono una interessante attività biologica, a causa della loro similarità con con gli zuccheri, infatti vengono definiti glicomimetici.



Zucchero



Imminozucchero

Sono comunemente presenti in natura in bulbi, foglie e radici di molte specie di piante. Dal punto di vista strutturale sono alcaloidi poliossidrilati, mono e biciclici (con cicli a cinque o a sei termini) e diverse configurazioni dei gruppi ossidrilici. Grazie alla loro analogia con gli zuccheri, essi riescono a mimare la parte furanosidica e piranosidica del substrato glucidico, perciò hanno la capacità di inibire le glicosidasi, enzimi della classe delle idrolasi, le quali si legano proprio ai carboidrati.²⁸

Tramite reazioni enantioselettive e innovative strategie di sintesi sono state composte ampie library di queste molecole dalle forme e dimensioni più particolari e con configurazioni stereochimiche diverse. La varietà di molecole sintetizzabili ha dato la possibilità di formare sostanze glicomimetiche con caratteristiche inibitorie per molti enzimi, partendo da un solo scaffold che fosse un imminozucchero.²⁹

La vasta gamma di enzimi che vengono inibiti da sostanze derivanti da imminozuccheri lascia bene sperare nel creare una nuova classe di farmaci che possano curare malattie derivanti da disfunzioni enzimatiche come il diabete, l'obesità e il cancro.

Così anche noi partendo dagli imminozuccheri sintetizzati al Dipartimento di Chimica, abbiamo voluto studiare sperimentalmente se avessero una qualche attività biologica anche con le PTPasi, e in seguito, tramite sintesi, abbiamo modificato lo scaffold di partenza nella speranza di far aumentare l'attività inibitoria sulla nostra proteina.

²⁸ Asano N.; Kizu H.; Oseki K.; Tomioka E.; Matsui K.; Okamoto M.; Baba M.; (1995) *J. Med. Chem.* **38**, 2349-2356.

²⁹ Compain P.; Martin R.O; (2007) *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.

7 Materiali e metodi

7.1 Dosaggi di attività con p-nitrofenilfosfato (pNPP)

Il dosaggio dell'attività enzimatica viene effettuato utilizzando il p-nitrofenilfosfato come substrato che viene sciolto in una soluzione 0.075 M di β - β dimetilglutarato di sodio a pH 7.0 contenente 1 mM EDTA . Dopo aver equilibrato la soluzione di dosaggio a 37°C, si aggiunge ad 1 ml della soluzione di pNPP, un volume noto dell'enzima che si vuole dosare e, a tempi stabiliti, si blocca la reazione con 4 ml di una soluzione di KOH 0.1 M. L'enzima provoca l'idrolisi del gruppo fosfato del pNPP e quindi la liberazione di P_i (fosfato organico) e di p-nitrofenolo, che in ambiente alcalino presenta un caratteristico colore giallo. Si procede quindi alla misurazione dell'assorbanza dello ione p-nitrofenolato liberato a $\lambda=405$ nm. Dal valore di assorbanza così ottenuto si può calcolare l'attività enzimatica utilizzando la seguente formula:

$$UI = (\Delta E * V_{Tot}) / (\epsilon_{mM} * T * d * V_{enz})$$

dove V_{tot} è il volume totale di ogni test; V_{enz} è invece il volume di enzima aggiunto; ϵ_{mM} è il coefficiente d'estinzione millimolare ($18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d è il cammino ottico espresso in cm. I due parametri cinetici, K_m e V_{max} , sono stati determinati misurando la velocità iniziale a differenti concentrazioni di substrato. I dati ottenuti sperimentalmente sono stati infine analizzati usando l'equazione di Michaelis-Menten ed un programma per l'analisi di regressioni non lineari, FigSys 2003 (Biosoft UK).

7.2 Determinazione dei valori di IC_{50} , K_i e del tipo di inibizione

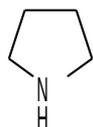
La costante di inibizione (K_i) dei composti da testare come inibitori della PTP1B, è stata determinata valutando la velocità iniziale di idrolisi ad una temperatura di 37°C, a differenti concentrazioni di substrato (pNPP) e di inibitore. Questo tipo di test è stato ogni volta effettuato in triplo, per poter lavorare così su valori medi. Il valore della K_i è stato ottenuto utilizzando le appropriate equazioni in funzione del tipo di inibizione osservata durante l'analisi del plot di Lineweaver-Burk. I valori relativi alla concentrazione di inibitore in grado di dimezzare l'attività enzimatica della PTP1B (IC_{50}), sono stati calcolati misurando la velocità di idrolisi del pNPP ad una concentrazione costante di substrato, che corrispondeva al valore della K_m dell'enzima. Sfruttando la seguente equazione, sono stati analizzati i dati ottenuti sperimentalmente

$$V_i/V_0 = \frac{(Max - Min)}{\left(1 + \frac{x}{IC_{50}}\right)^p} + Min$$

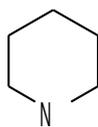
dove V_i rappresenta la velocità di reazione valutata alle varie concentrazioni di inibitore, V_0 rappresenta la velocità di reazione quando non è presente inibitore, e x rappresenta la concentrazione di inibitore usata nel test.

8 Parte sperimentale

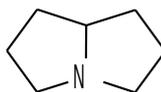
Tra gli imminozuccheri forniteci dalla Dottoressa Cardona e sintetizzati nel suo gruppo di ricerca, abbiamo molecole che appartengono alla classe delle pirrolidine (**a**), delle piperidine (**b**), delle pirrolizidine (**c**) e delle indolizidine (**d**)³⁰ e altre molecole poliossidrilate.



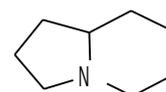
a



b



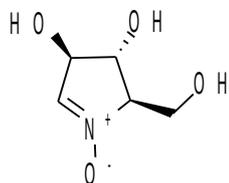
c



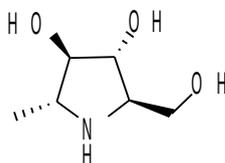
d

I composti sono 36, tutti funzionalizzati con gruppi ossidrilici nell'anello o negli anelli e differenti tra di loro per la posizione della catena, la lunghezza di questa o la presenza di gruppi funzionali specifici (vedi figure successive).

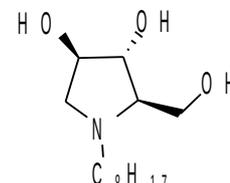
Pirrolidine



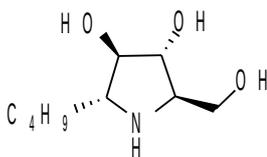
1



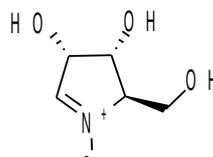
2



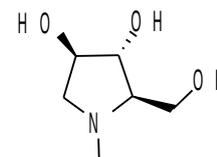
3



4



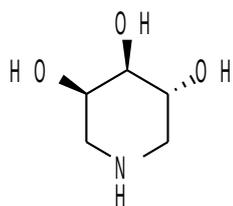
5



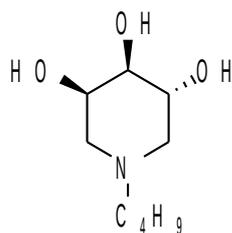
6

³⁰ Asano N.; Nash R.J.; Molyneux R.J.; Fleet G.W.J; (2000) *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 1645.

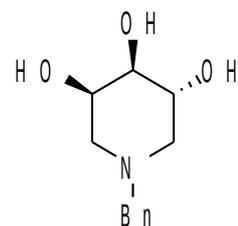
Piperidine



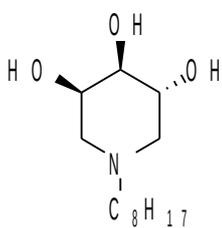
7



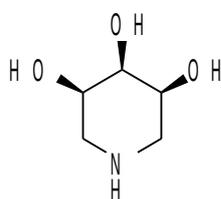
8



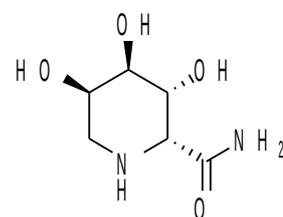
9



10

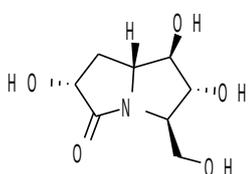


11

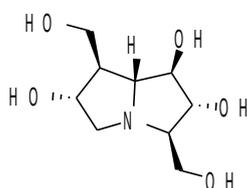


12

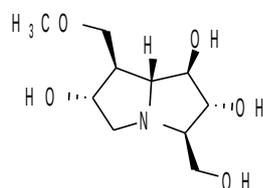
Pirrolizidine



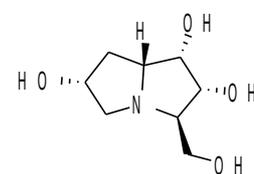
13



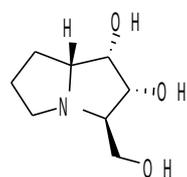
14



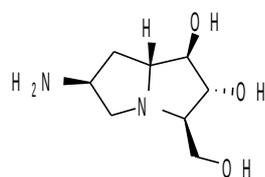
15



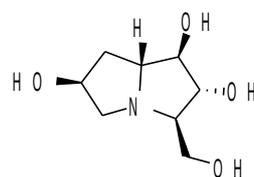
16



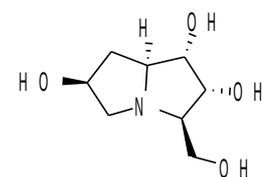
17



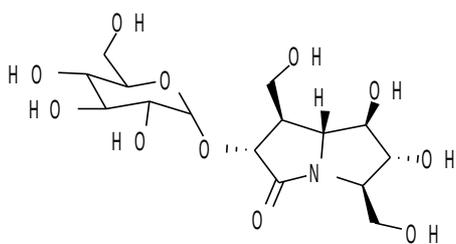
18



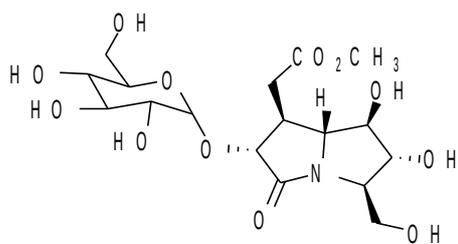
19



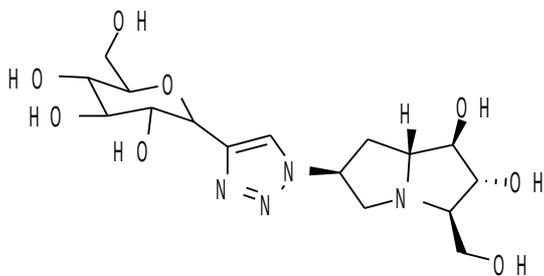
20



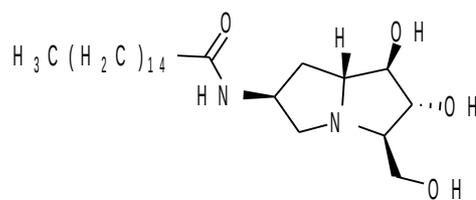
21



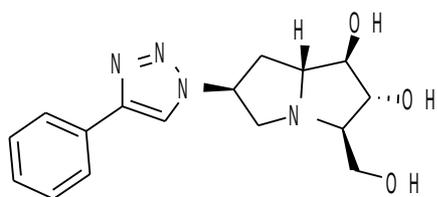
22



23

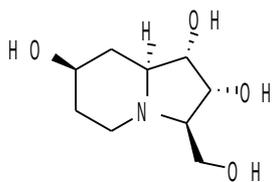


24

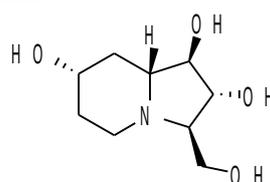


25

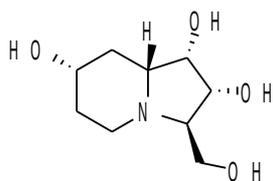
Indolizidine



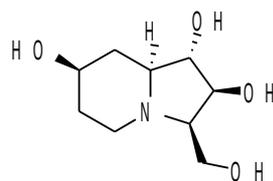
26



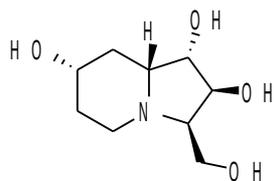
27



28

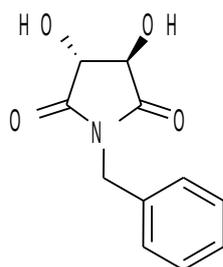


29

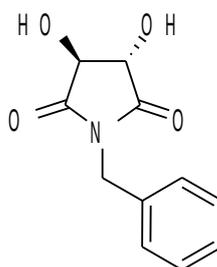


30

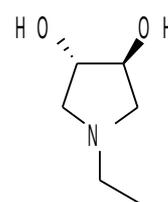
Molecole poliossidrilate



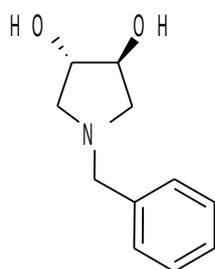
31



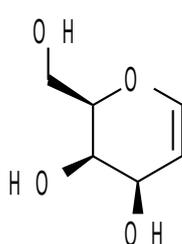
32



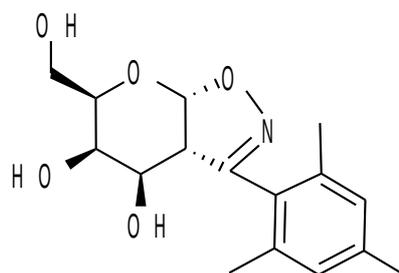
33



34



35



36

Aliquote dei vari composti, sono state sciolte in DMSO (dimetilsolfossido) per ottenere una concentrazione di partenza per i dosaggi enzimatici, di 20 mM, e come descritto nel Capitolo Materiali nel paragrafo “Dosaggi di attività con p-nitrofenilfosfato (pNPP)”, abbiamo effettuato lo screening preliminare su tutti gli inibitori utilizzando due differenti enzimi appartenenti alla famiglia delle fosfotirosina protein fosfatasi, la PTP1B ed IF1. I dati ottenuti sono stati riportati nei grafici successivi.

Pirrolidine

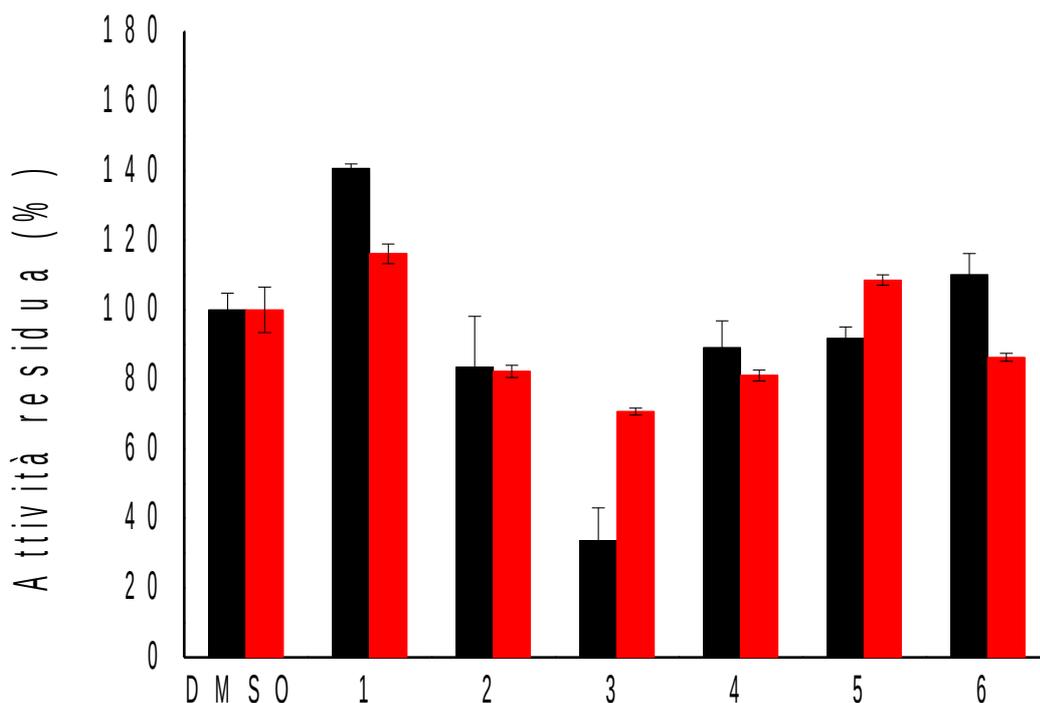


Grafico 1: Test a singola concentrazione di substrato ed inibitore. L'enzima, PTP1B o IF1, è stato incubato a 37°C sia in presenza di p-nitrofenilfosfato (pNPP) che di inibitore (pirrolidine alla concentrazione finale di 100 μ M). Colonne nere: PTP1B; colonne rosse: IF1. I test sono stati eseguiti a pH 7.0; la concentrazione finale di pNPP è stata fissata a 2,5 mM e corrisponde alla K_m dei due enzimi calcolata allo stesso valore di pH. I valori di attività sono stati normalizzati rispetto al test di controllo; quest'ultimo è stato eseguito aggiungendo alla soluzione un volume di DMSO corrispondente al volume di inibitore aggiunto negli altri test. Ciascun test è stato eseguito in triplo; i valori riportati rappresentano il valori medio \pm S.E.M.

Piperidine

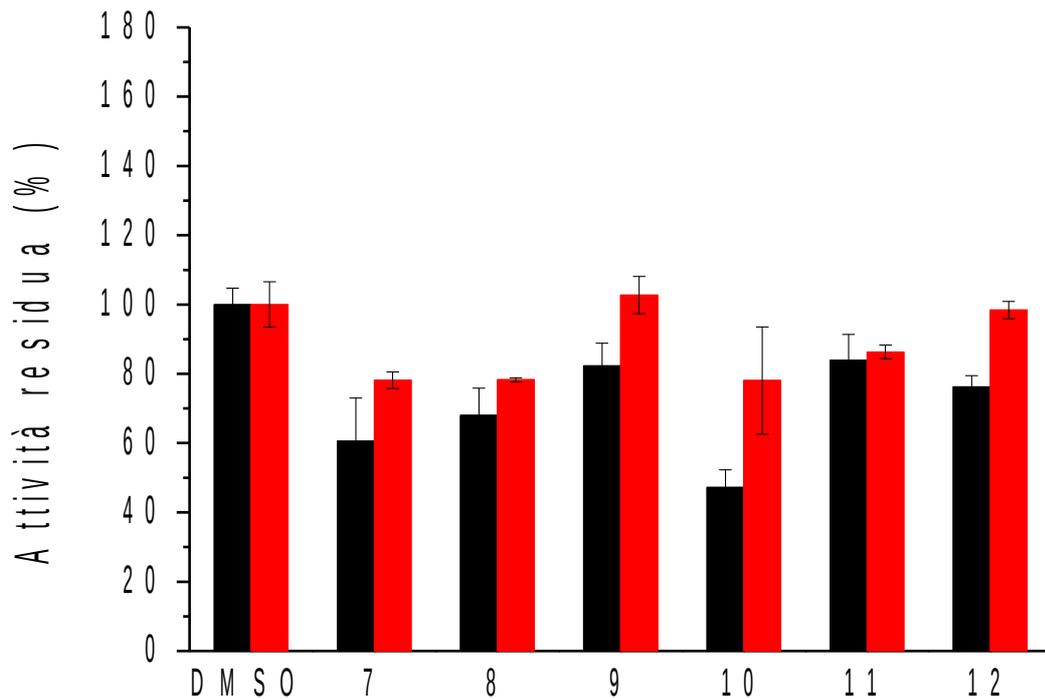


Grafico 2: Fig. x Test a singola concentrazione di substrato ed inibitore. L'enzima, PTP1B o IF1, è stato incubato a 37°C sia in presenza di p-nitrofenilfosfato (pNPP) che di inibitore (piperidine alla concentrazione finale di 100 μ M). Colonne nere: PTP1B; colonne rosse: IF1. I test sono stati eseguiti a pH 7.0; la concentrazione finale di pNPP è stata fissata a 2,5 mM e corrisponde alla K_m dei due enzimi calcolata allo stesso valore di pH. I valori di attività sono stati normalizzati rispetto al test di controllo; quest'ultimo è stato eseguito aggiungendo alla soluzione un volume di DMSO corrispondente al volume di inibitore aggiunto negli altri test. Ciascun test è stato eseguito in triplo; i valori riportati rappresentano il valori medio \pm S.E.M.

Pirrolizidine

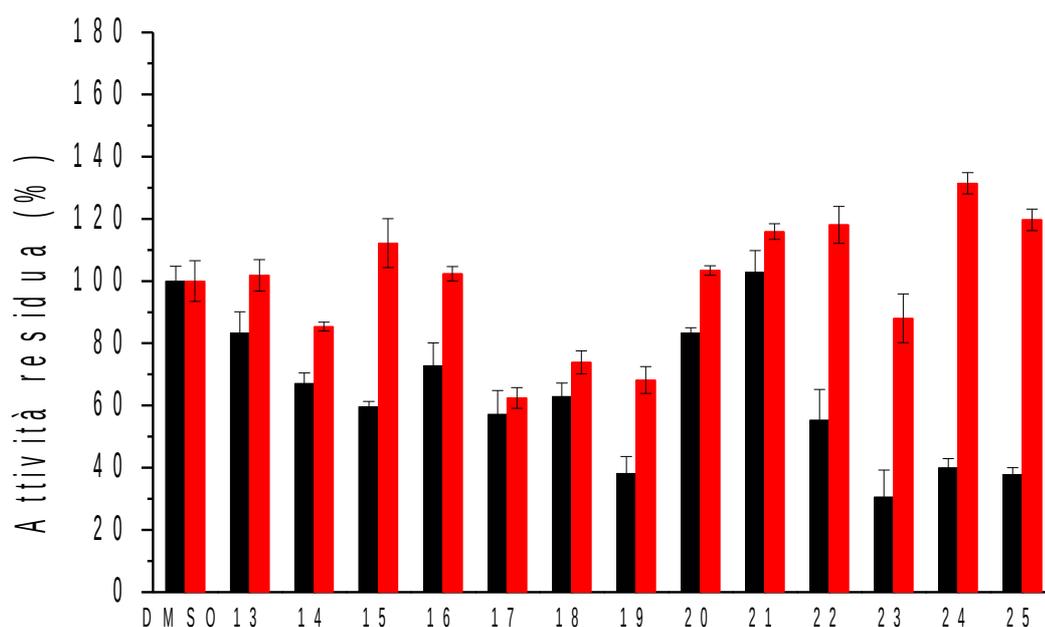


Grafico 3: Fig. x Test a singola concentrazione di substrato ed inibitore. L'enzima, PTP1B o IF1, è stato incubato a 37°C sia in presenza di p-nitrofenilfosfato (pNPP) che di inibitore (pirrolizidine alla concentrazione finale di 100 μ M). Colonne nere: PTP1B; colonne rosse: IF1. I test sono stati eseguiti a pH 7.0; la concentrazione finale di pNPP è stata fissata a 2,5 mM e corrisponde alla K_m dei due enzimi calcolata allo stesso valore di pH. I valori di attività sono stati normalizzati rispetto al test di controllo; quest'ultimo è stato eseguito aggiungendo alla soluzione un volume di DMSO corrispondente al volume di inibitore aggiunto negli altri test. Ciascun test è stato eseguito in triplo; i valori riportati rappresentano il valori medio \pm S.E.M.

Indolizidine

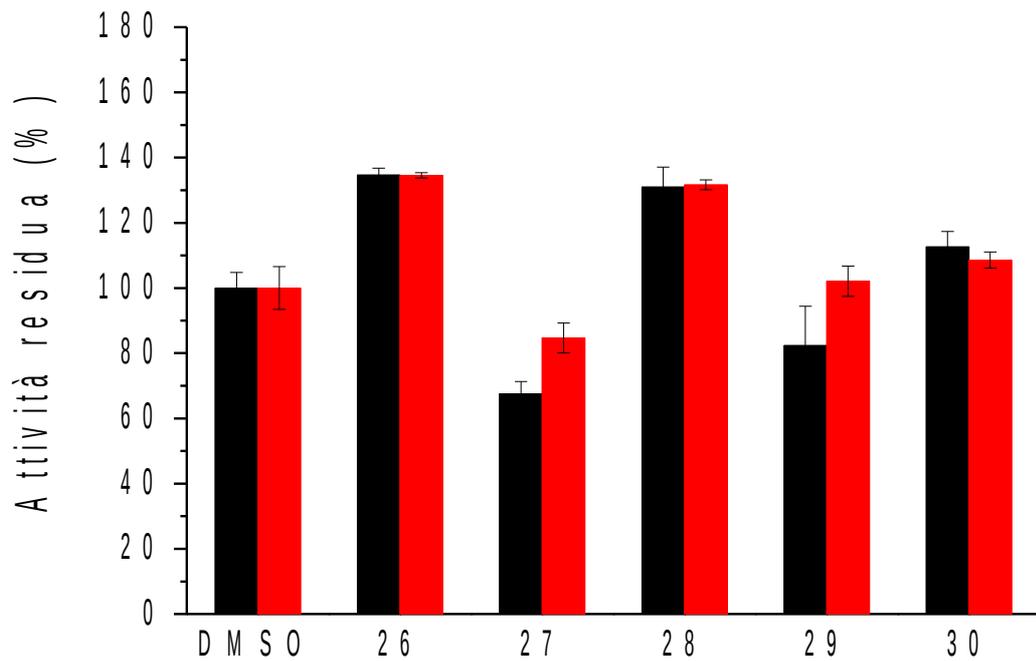


Grafico 4: Fig. x Test a singola concentrazione di substrato ed inibitore. L'enzima, PTP1B o IF1, è stato incubato a 37°C sia in presenza di p-nitrofenilfosfato (pNPP) che di inibitore (indolizidine alla concentrazione finale di 100 μ M). Colonne nere: PTP1B; colonne rosse: IF1. I test sono stati eseguiti a pH 7.0; la concentrazione finale di pNPP è stata fissata a 2,5 mM e corrisponde alla K_m dei due enzimi calcolata allo stesso valore di pH. I valori di attività sono stati normalizzati rispetto al test di controllo; quest'ultimo è stato eseguito aggiungendo alla soluzione un volume di DMSO corrispondente al volume di inibitore aggiunto negli altri test. Ciascun test è stato eseguito in triplo; i valori riportati rappresentano il valori medio \pm S.E.M.

Molecole poliossidrilate

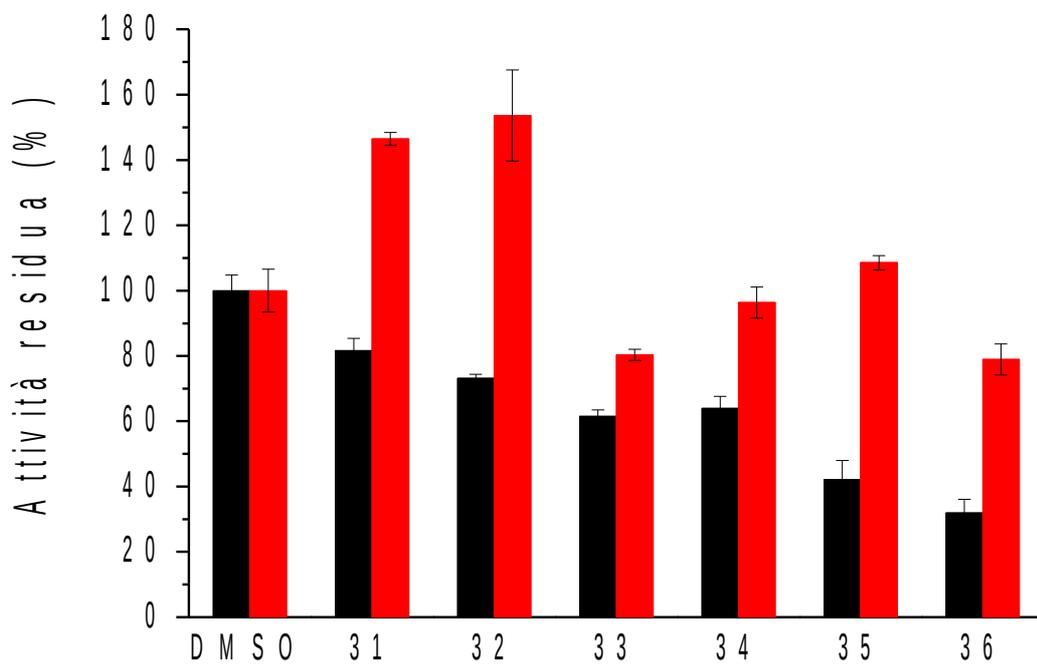


Grafico 5: Fig. x Test a singola concentrazione di substrato ed inibitore. L'enzima, PTP1B o IF1, è stato incubato a 37°C sia in presenza di p-nitrofenilfosfato (pNPP) che di inibitore (le molecole polioliche sono alla concentrazione finale di 100 μ M). Colonne nere: PTP1B; colonne rosse: IF1. I test sono stati eseguiti a pH 7.0; la concentrazione finale di pNPP è stata fissata a 2,5 mM e corrisponde alla K_m dei due enzimi calcolata allo stesso valore di pH. I valori di attività sono stati normalizzati rispetto al test di controllo; quest'ultimo è stato eseguito aggiungendo alla soluzione un volume di DMSO corrispondente al volume di inibitore aggiunto negli altri test. Ciascun test è stato eseguito in triplo; i valori riportati rappresentano il valori medio \pm S.E.M.

Panoramica dei composti

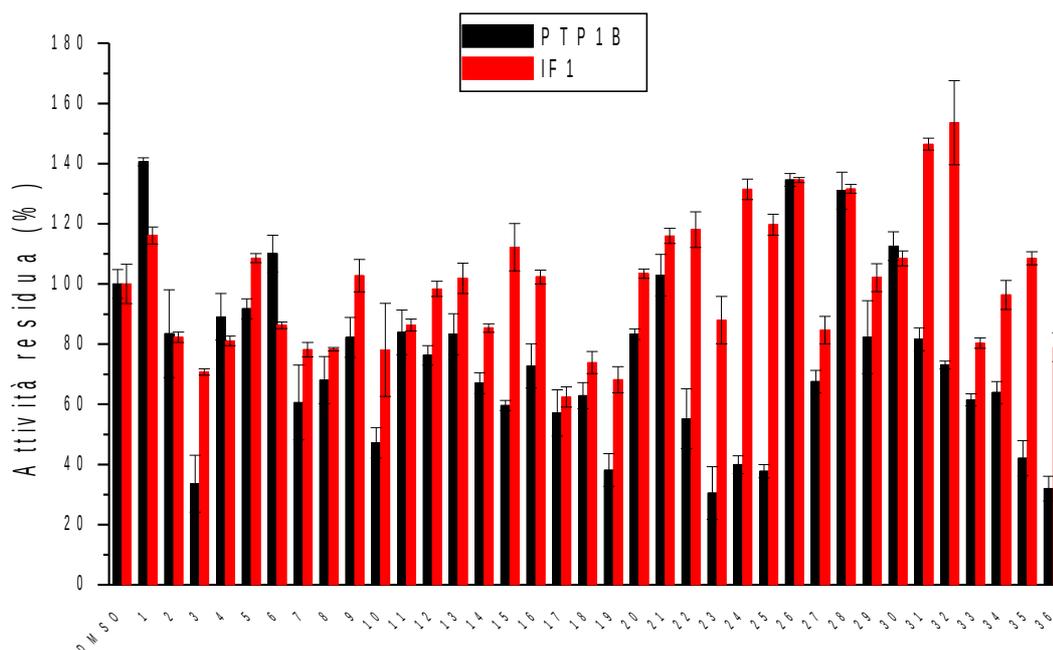


Grafico 6: Risultato finale dello screening preliminare effettuato con gli enzimi PTP1B ed IF1

Come possiamo osservare, nel caso della PTP1B, diversi composti sono risultati abbastanza efficaci nell'inibire l'enzima. In particolare i composti **3**, **10**, **19**, **23**, **24**, **25**, **35** e **36** causano una riduzione dell'attività enzimatica tra il 50 ed il 70 %. Al contrario, la maggior parte dei composti analizzati è risultata efficace nell'inibire l'enzima IF1: in effetti il migliore tra essi, il composto **17**, riduce l'attività dell'enzima di circa il 40 % rispetto al controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo deciso di procedere scegliendo uno dei composti più attivi nei confronti di entrambi gli enzimi. La nostra scelta si è focalizzata sulle pirrolidine, composti più facilmente funzionalizzabili rispetto alle altre classi di imminozuccheri, orientandosi sul composto **3**.

9 Modifiche sintetiche a partire dalla pirrolidina 3

Dopo lo screening iniziale, effettuato su più classi di molecole diverse forniteci dalla Dott.ssa Cardona del Dipartimento di Organica, e i successivi test specifici, abbiamo modificato la struttura dei composti che davano maggiore attività inibitoria, inserendo un gruppo che, secondo ricerche antecedenti, interagisse meglio con il sito attivo delle PTPasi.³¹ A tal fine si è deciso di modificarla con un gruppo paranitrobenzilico, che ha proprietà fosfotirosino-mimetiche. In effetti è stato osservato che il gruppo p-nitro, mimando la struttura della fosfotirosina, indirizza le molecole con esso funzionalizzate verso il sito attivo di questi enzimi, favorendo l'interazione del gruppo -NO₂ con i residui che formano il P-loop del sito catalitico. Il gruppo -NO₂ ha anche l'ulteriore caratteristica di essere poco carico in soluzioni acquose, quindi la sua permeabilità lo rende perfetto per entrare nella cellula. Anche gli acidi carbossilici potevano essere delle sostanze alternative, ma nel confronto tra i due il nitro era migliore in efficacia.³²

Il composto da cui ho iniziato il mio percorso, era già frutto di varie sintesi precedenti, ottenute dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Cardona, in cui sono partiti da uno zucchero commerciale: il 2,3,5-tri-*O*-benzil-*D*-arabino-furanosio (**37**), che è il derivato di uno zucchero appartenente al “chiral pool” disponibile in commercio (Carbosynth. Lim.) e facilmente reperibile a basso costo.³³ La sequenza sintetica (Schema 1) ha previsto due inversioni di configurazione al C-4, una a livello della reazione di iodurazione e l'altra relativa alla sostituzione nucleofila S_N2 intramolecolare portata avanti, nello step finale, dall'anione ossimato.

Il primo step è consistito in una reazione di condensazione della funzione aldeidica dello

31 Navarrete-Vazquez G.; Paoli P.; León-Rivera I.; Villalobos-Molina R.; Medina-Franco J.L.; Ortiz-Andrade R.; Estrada-Soto S.; Camici G.; Diaz-Coutiño D.;

Gallardo-Ortiz I.; Martinez-Mayorga K.; Moreno-Díaz H.,(2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3332–3341.

32 Navarrete-Vazquez G. ; Paoli P.; León-Rivera I.; Villalobos-Molina R.; Medina-Franco J.L.; Ortiz-Andrade R.; Estrada-Soto S.; Camici G.; Diaz-Coutiño D.;

Gallardo-Ortiz I.; Martinez-Mayorga K.; Moreno-Díaz H.,(2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3332–3341.

33 Cardona F.; Faggi E.; Liguri F.; Cacciarini M.; Goti A.;(2003) *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2315-2318.

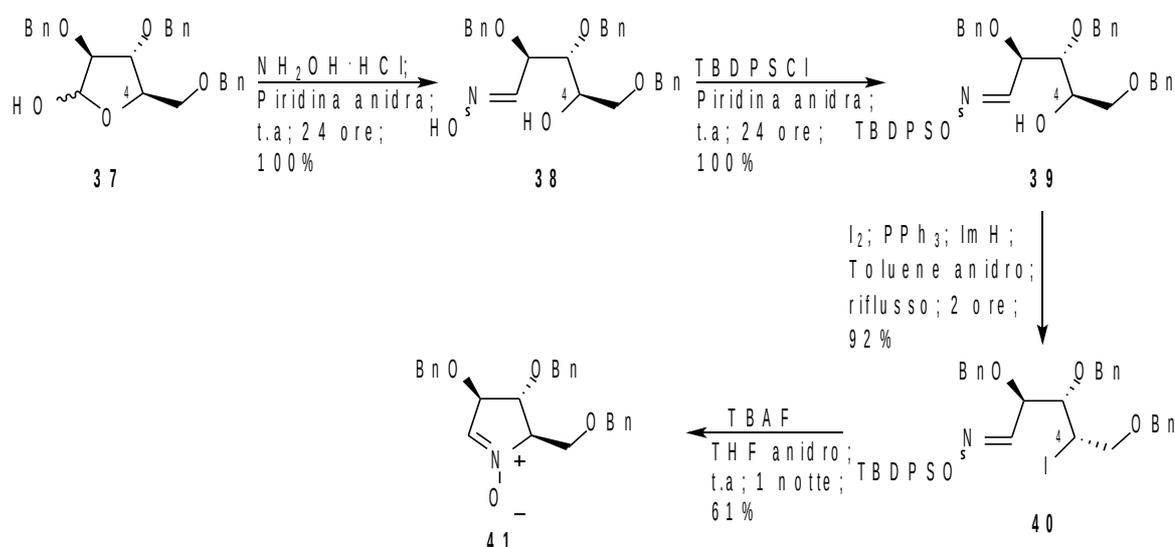
zucchero **37** con un eccesso di idrossilammina cloridrato in piridina anidra ed in presenza di setacci molecolari 3Å, utilizzati per intrappolare le molecole d'acqua che si formano nella reazione. L'ossima **38** è ottenuta, come risulta dall'analisi dello spettro ¹H-NMR 200 MHz, come miscela dei due diastereoisomeri *E/Z* in rapporto 4:1 con resa quantitativa e sufficientemente pura per essere impiegata nella reazione successiva.

Il secondo passaggio ha previsto la protezione chemoselettiva dell'ossidrilico libero dell'ossima come sililetere. La reazione è condotta in piridina anidra per aggiunta di tert-butildifenilsilil cloruro (TBDPSCI) ottenendo, con resa quantitativa, il prodotto **39** sufficientemente puro per essere utilizzato nello step seguente.

Nel passaggio successivo si ha la prima inversione di configurazione al C-4 attraverso una reazione di sostituzione nucleofila S_N2 con iodio eseguita in toluene anidro ed in presenza di trifenilfosfina e imidazolo. Quest'ultimo è utilizzato in eccesso come base, per neutralizzare HI sviluppatosi nell'ambiente di reazione, mentre la trifenilfosfina si lega all'atomo di ossigeno con ossidazione finale a trifenilfosfinossido essendo il fosforo fortemente ossifilico. Per questo motivo il prodotto iodurato **40** necessita di una purificazione per via cromatografica, ottenendo infine il prodotto pulito con resa del 92%.

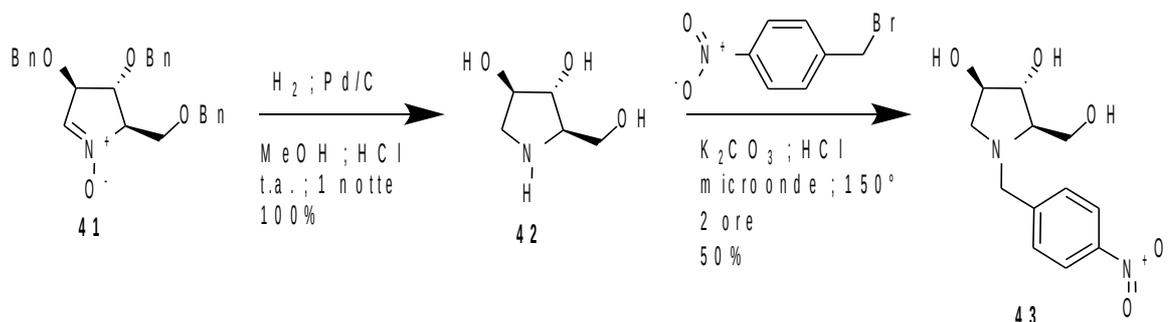
L'ultimo passaggio è consistito nella deprotezione dell'ossidrilico dell'ossima con tetrabuttilammonio fluoruro (TBAF), che sfrutta l'affinità del fluoro nei confronti del silicio e garantisce la successiva ciclizzazione dell'anione ossimato sull'atomo di carbonio sostituito con lo iodio, il quale risulta essere un ottimo gruppo uscente. La reazione è svolta in THF anidro senza ulteriore aggiunta di reagenti ed il grezzo ottenuto è sottoposto a separazione cromatografica isolando il prodotto puro con resa del 61%.

La resa complessiva della sintesi del nitrone **41** su quattro step di reazione a partire dal 2,3,5-tri-*O*-benzil-*D*-arabino-furanosio (**37**) è stata del 57%.



Schema 1: Reazioni della sintesi del nitrone **41**

Ottenuto il nitrone **41**, nella prima sintesi (Schema 2), volevamo sintetizzare il composto **43**, in cui all'anello pirrolidinico triossidrilitato presente nella molecola **3** è legato un gruppo p-nitrobenzoico. Perciò è stata fatta una riduzione con catalizzatore eterogeneo Pd/C (Palladio finemente disperso su un supporto di carbone) a temperatura ambiente per 16 ore in atmosfera di H₂, per rimuovere il gruppi benzilici dall'anello pirrolidinico e contemporaneamente ridurre la funzione del nitrone. Così facendo è stata ottenuta la pirrolidina **42** con resa del 100%. La reazione è stata fatta usando come solvente MeOH con gocce di HCl per aiutare la debenzilazione. Successivamente è stata fatta una sostituzione nucleofila S_N2 sul 4-nitrobenzilbromuro da parte dell'ammina ciclica. Le sostituzioni S_N2 sono processi molto veloci, dove la rottura del legame C-X (X=alogeno) e la formazione del nuovo legame avviene in maniera quasi simultanea. Questa reazione è stata condotta in microonde a 150°C per 2 ore con solvente CH₃CN e come base per favorire la reazione K₂CO₃, formando la pirrolidina **43**. Il prodotto finale si è presentato sotto forma di solido giallo ed è stato ottenuto con resa del 50%.



Schema 2: Sintesi della pirrolidina **43**

Test biologici

Tramite dosaggi di attività con p-PNN (Capitolo 7.1), siamo andati a verificare l'attività inibitoria del composto sintetizzato. Il composto **43** è stato testato su entrambi gli enzimi, utilizzando, come nel caso precedente, una concentrazione finale di inibitore di 100 μ M.

Enzima	Controllo	Composto 43
PTP1B	100 \pm 3.0	103.4 \pm 3.0
IF1	100 \pm 2.4	102.6 \pm 1.0

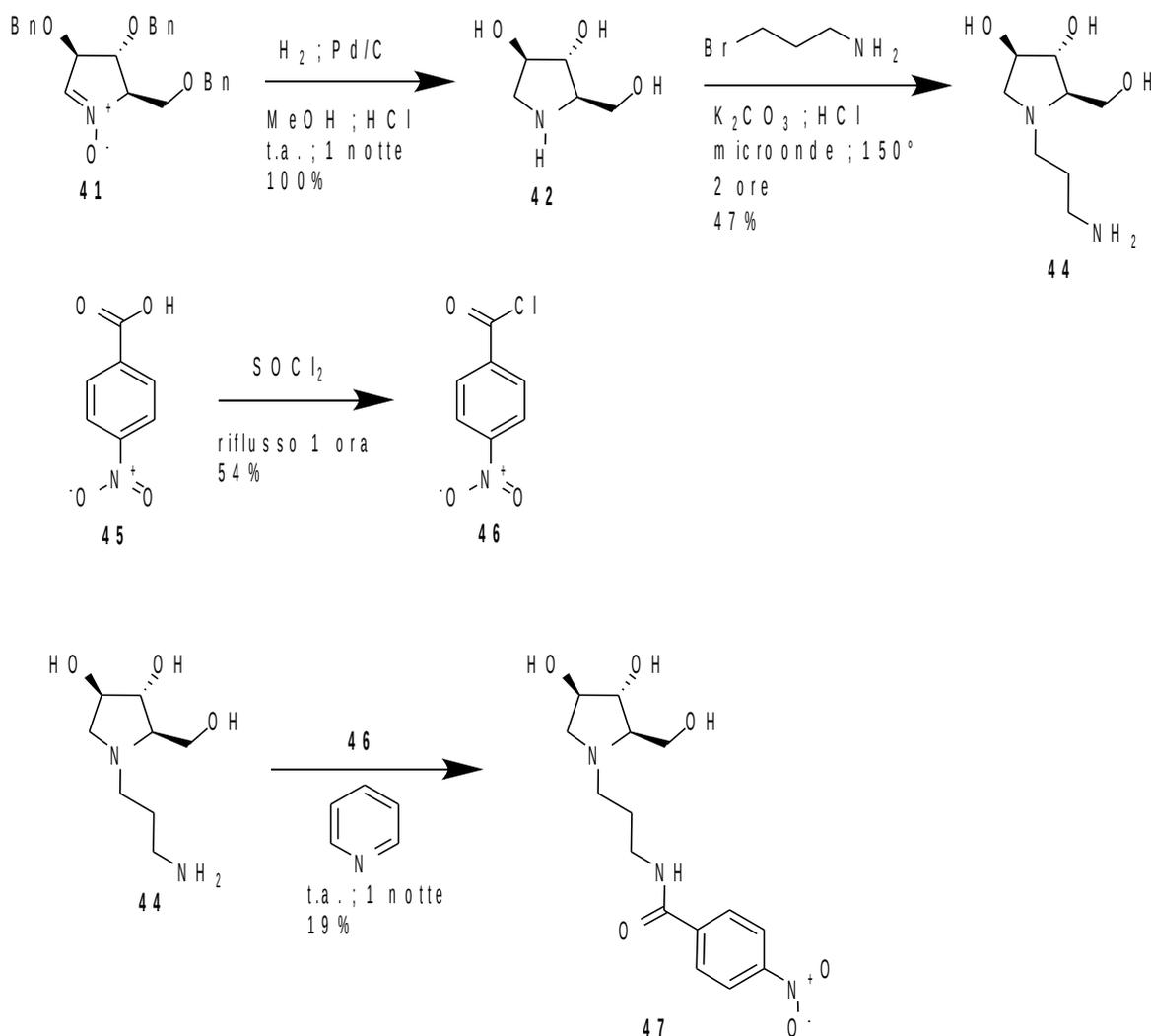
Tabella 1: Comportamento degli enzimi con l'inibitore sintetizzato

Come possiamo osservare, il composto **43** non è attivo nei confronti di entrambi gli enzimi come mostrato dalla Tabella 1. Ciò potrebbe essere dovuto all'incapacità del derivato di legarsi in modo corretto con il sito attivo dei due enzimi. Analizzando la loro struttura tridimensionale, possiamo ipotizzare che il sostituito apportato come modifica, non riesca ad entrare bene nella tasca catalitica per la scarsa lunghezza della catena tra la pirrolidina e il nitro benzene.

Nel tentativo di aumentare l'efficacia di tale composto, abbiamo deciso di aumentare la distanza con una catena alifatica, per generare una molecola in grado di penetrare più profondamente all'interno del sito attivo.

Per la seconda sintesi (Schema 3), partendo nuovamente dal nitrone **41**, abbiamo riottenuto il composto **42** con resa del 100%, tramite idrogenazione su Pd/C in MeOH e gocce di HCl per una notte in atmosfera di H₂ e tramite una S_N2 sulla bromopropanammina in microonde a 150°C per 2 ore con solvente CH₃CN e in presenza di K₂CO₃ è stata formata l'ammina **44** con resa del 47%. Nella successiva reazione, è stato preparato il cloruro dell'acido paranitrobenzico, per far avvenire meglio l'accoppiamento dello step seguente. È stato fatto reagire il cloruro di tionile con l'acido paranitrobenzoico per 1 ora a riflusso. Il

composto ottenuto **46** si è presentato sotto forma di un solido verde acqua a cristalli allungati, ed è stato ottenuto puro per ricristallizzazione da EP con resa del 54%. In particolare, il punto di fusione dell'acido paranitrobenzioco è a 237°C, molto diverso dal punto di fusione da noi ottenuto del cloruro: 74.5 °C, anche questo dato è indice del fatto che la reazione è effettivamente avvenuta. Il cloruro dell'acido paranitrobenzioco è stato usato come reagente nell'ultimo step, per giungere al prodotto finale **47**, risultato dall'accoppiamento con il cloruro dell'acido **46** e l'ammina **44**. La reazione si è svolta in piridina a temperatura ambiente per 16 ore. La piridina a un duplice effetto: è un solvente polare che fa sciogliere bene il prodotto di partenza e in più, essendo basica, blocca la formazione di HCl che avviene durante la reazione di accoppiamento. Il composto finale è stato prima purificato per cromatografia su colonna, ma dal momento che presentava impurezze, è stato ulteriormente purificato tramite una resina a scambio ionico, Dowex (Dowex 50Wx8). Il prodotto finale è stato ottenuto con resa del 19%.



Schema 3: Sintesi della pirrolidina **47**

Test biologici

Una volta ottenuto il prodotto, abbiamo effettuato un primo test per valutarne l'efficacia alla concentrazione di 100 μ M. I risultati sono riportati nella Tabella 2.

Enzima	Controllo	Composto 47
PTP1B	100 \pm 2.0	16.6 \pm 3.0
IF1	100 \pm 2.0	90.0 \pm 2.0

Tabella 2: Comportamento degli enzimi con l'inibitore sintetizzato

Il nuovo composto sembra essere molto più attivo sull'enzima PTP1B e poco attivo sull'enzima IF1, mostrando così anche una buona specificità d'azione. Per valutare meglio la potenza della nuova molecola abbiamo deciso di determinare il valore di IC₅₀ su entrambi gli enzimi. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici successivi.

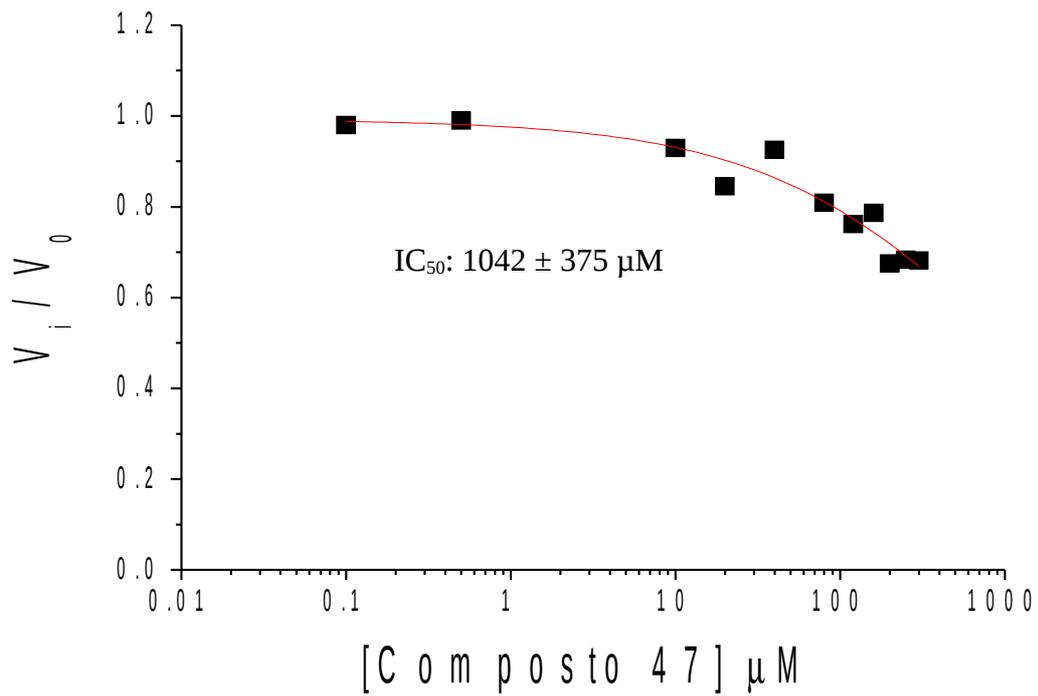


Grafico 7: Determinazione dell' IC_{50} per l'enzima IF1. I test di attività sono stati effettuati a 37°C , in presenza di concentrazioni crescenti del composto 47

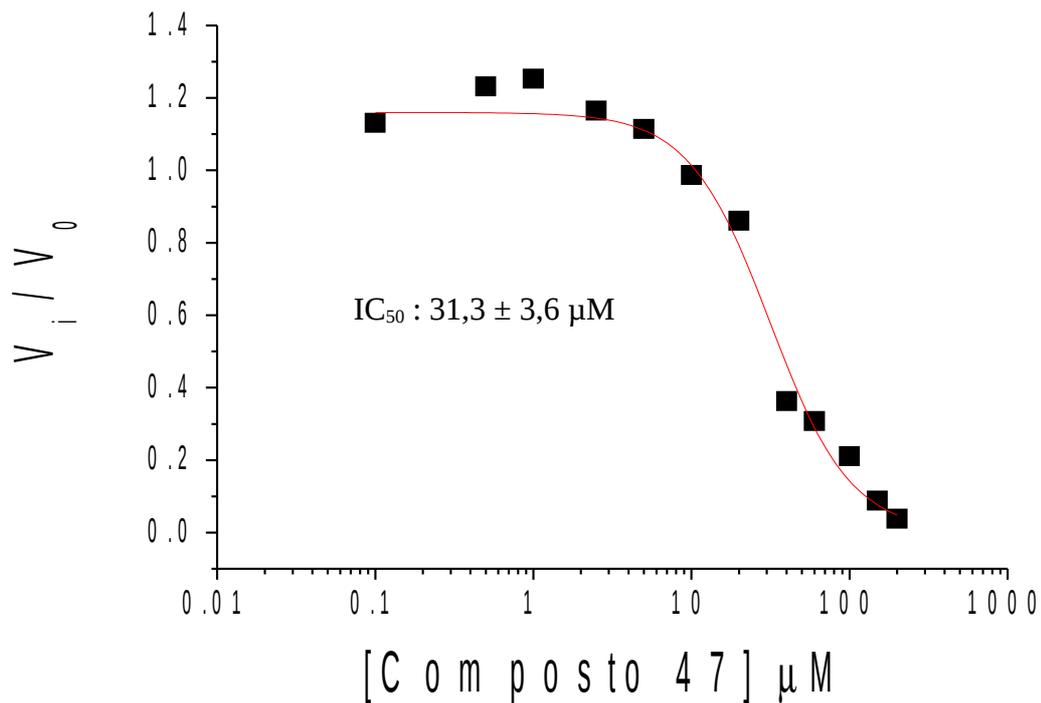


Grafico 8: Determinazione dell'IC₅₀ per l'enzima PTP1B. I test di attività sono stati effettuati a 37°C, in presenza di concentrazioni crescenti del composto 47

I dati ottenuti dimostrano che il composto **47** possiede una buona affinità nei confronti dell'enzima PTP1B, oltre che una discreta specificità. In effetti il valore di IC₅₀ differisce di più di trenta volte tra i due enzimi.

Per valutare il meccanismo d'azione del composto **47** nei confronti della PTP1B, abbiamo deciso di studiare la dipendenza dei principali parametri cinetici (K_m e V_{max}) dalla concentrazione di inibitore. I risultati ottenuti sono riportati nei grafici seguenti.

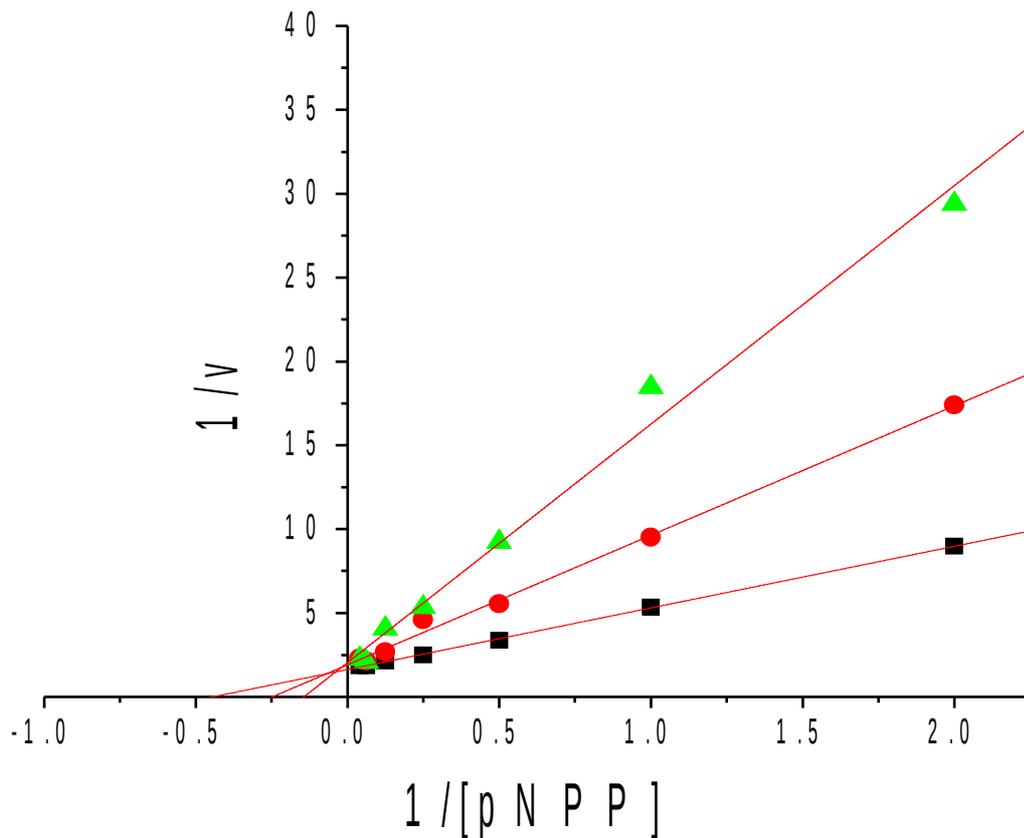


Grafico 9: Grafico di Lineweaver-Burk o dei doppi reciproci. I test di attività sono stati eseguiti utilizzando l'enzima PTP1B e il pNPP come substrato. I simboli riportati nella figura rappresentano differenti concentrazione di composto 47: 0 mM, ■; 25 mM, ●; 50 mM, ▲

Analizzando i punti sperimentali con il plot dei doppi reciproci (grafico 9), viene mostrato che il composto 47 si comporta come un inibitore competitivo. Anche l'analisi dell'andamento della V_{max} e della K_m (Grafici 10 e 11), conferma tale ipotesi.

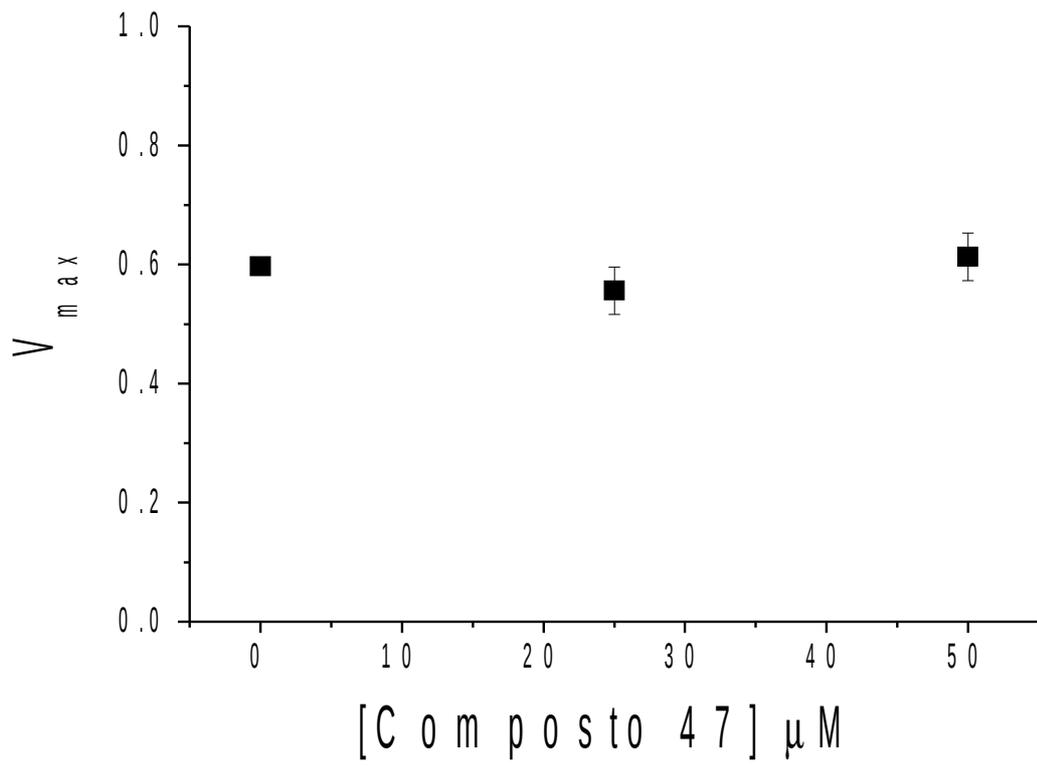


Grafico 10: Dipendenza della V_{max} dalla concentrazione di inibitore

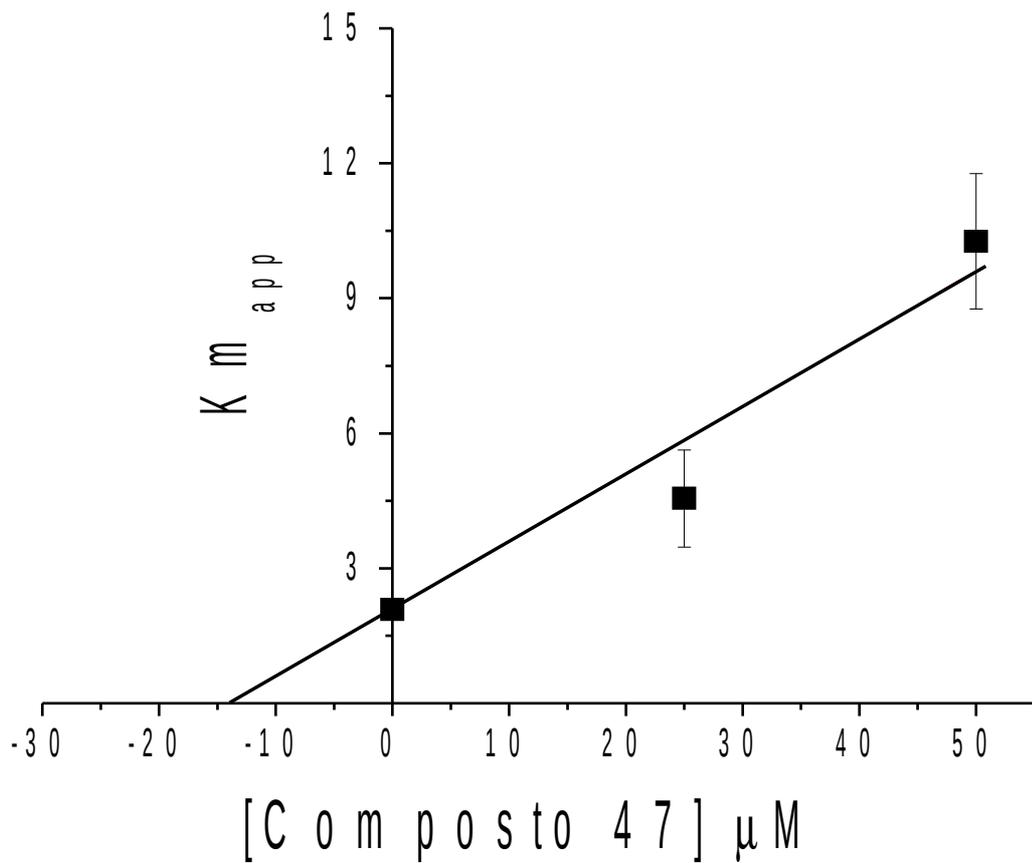


Grafico 11: Dipendenza della K_m dalla concentrazione di inibitore

E' evidente che la presenza dell'inibitore nel test di dosaggio determina un incremento della K_m , lasciando tuttavia inalterato il valore della V_{max} . A partire dal plot secondario della K_m in funzione della concentrazione di inibitore è stato possibile determinare il valore della K_i per l'enzima, utilizzando la seguente equazione:

$$K_{app} = (K_m/K_i) * [I] + K_m$$

Dai dati ottenuti abbiamo calcolato un valore di $K_i = 13,8 \pm 1,7 \mu M$.

10 Discussione

Gli enzimi appartenenti alla classe delle fosfotirosina protein fosfatasi sono molto antichi dal punto di vista evolutivo. I geni che esprimono enzimi appartenenti a tale famiglia si ritrovano nei batteri e nelle cellule eucariotiche dove partecipano alla regolazione, sia del del metabolismo cellulare, che di altri importanti processi quali la crescita ed il differenziamento. Nei batteri, ed in particolare nelle specie patogene per l'uomo, essi sono coinvolti nella regolazione della virulenza, nella regolazione del processo di sintesi della parete batterica o nella regolazione dei processi che favoriscono la formazione dei biofilm. In alcune specie batteriche, la mancata espressione di tali proteine riduce fortemente la loro capacità di infettare le cellule ospiti e diffondersi nell'organismo. Nelle cellule eucariotiche, tali enzimi sono coinvolti nella regolazione del metabolismo, della crescita ed del differenziamento cellulare. Una alterata espressione o regolazione dell'attività di questi enzimi sembrano essere tra le principali cause che contribuiscono, nell'uomo, all'insorgenza di importanti patologie, quali i tumori o il diabete. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'inibizione selettiva di alcuni enzimi appartenenti a questa famiglia potrebbe permettere di controllare la diffusione di ceppi batterici resistenti ai tradizionali antibiotici, prevenire diabete e obesità, patologie, queste ultime, molto diffuse nei paesi industrializzati. Per tali motivi, la produzione di molecole in grado di regolare l'attività delle PTPasi è un obiettivo perseguito da molte case farmaceutiche e molti ricercatori in tutto il mondo. Uno tra i principali problemi legati alla progettazione di nuove molecole in grado d'inibire tali enzimi è la presenza, all'interno di questa famiglia, di un sito attivo altamente conservato, costituito da alcuni residui catalitici e da un sito di legame per gruppo fosfato del substrato. Ciò significa che, le molecole che si comportano da inibitori competitivi nei confronti delle PTP, risultano, molto spesso, troppo aspecifiche e quindi potenzialmente pericolose. Per risolvere tale problematica è stato suggerito di utilizzare molecole in grado d'interagire, oltre che con il sito attivo dell'enzima, anche con altri amminoacidi presenti nelle regioni adiacenti allo stesso sito catalitico. Infatti, sebbene il primo sia altamente conservato, le regioni che lo circondano variano molto da enzima ad enzima. In tal modo dovrebbe essere possibile creare molecole caratterizzate, sia da una elevata affinità, che da una elevata specificità d'azione nei confronti delle proteine

bersaglio.

Scopo di tale tesi è stato quello d'individuare nuove molecole in grado d'inibire alcuni enzimi quali la PTP1B e IF1. A tale fine, abbiamo analizzato le proprietà di una library di imminozuccheri di sintesi, valutando la loro capacità di inibire i due enzimi. Lo screening preliminare ha mostrato che, alcune di queste molecole sono in grado di inibire, soprattutto il primo di questi enzimi, mentre quasi nessuna è risultata efficace verso IF1. Le molecole attive possono essere considerate strutture base per generare nuove classi di inibitori. Per verificare tale ipotesi, abbiamo deciso di modificare chimicamente una delle molecole più efficienti nell'inibire la PTP1B, il composto **3**. E' stato deciso di legare un un gruppo p-nitrobenzilico, cioè gruppo fosfotirosina-mimetico, che dovrebbe permettere l'interazione della nuova molecola con il sito attivo dei due enzimi. Il prodotto ottenuto, il composto **43**, non ha mostrato tuttavia proprietà interessanti dal momento che è risultato scarsamente efficiente nell'inibire sia IF1 che la PTP1B. Nei confronti di quest'ultimo esso è risultato addirittura meno efficace dell'imminozucchero di partenza. E' difficile cercare una spiegazione a tale tipo di comportamento, anche se possiamo ipotizzare che la catena spaziatrice che lega l'imminozucchero al gruppo p-nitrobenzilico sia troppo corta per permettere al gruppo nitro di raggiungere la base del sito ed interagire con i residui che formano il sito di legame del substrato. Sulla base di tale ipotesi abbiamo deciso introdurre, come raccordo tra l'imminozucchero ed il gruppo p-nitrobenzilico, una catena alifatica più lunga. Il processo di sintesi allestito ha permesso di generare il prodotto **47**. Ad una prima analisi, esso è risultato particolarmente attivo nei confronti della PTP1B, ma scarsamente efficace nell'inibire l'enzima IF1. Ulteriori analisi hanno dimostrato che esso possiede una IC_{50} nei confronti dell'enzima IF1 di circa 1 mM e di circa 30 μ M nei confronti della PTP1B. Tale risultato conferma che il composto **47** non solo è in grado d'inibire la PTP1B, ma anche che esso mostra una discreta specificità d'azione. Analizzando la dipendenza della K_m e della V_{max} dalla concentrazione dell'inibitore, abbiamo potuto appurare che esso si comporta come un inibitore competitivo nei confronti dell'enzima PTP1B con una costante d'inibizione (K_i) di circa 14 μ M. In conclusione il lavoro compiuto in questa tesi ha permesso di identificare una nuova molecola in grado d'inibire l'enzima PTP1B. Tale molecola, grazie alla sua buona selettività d'azione mostrata, appare particolarmente interessante e rappresenta un promettente punto di partenza per lo sviluppo di nuovi composti in grado di inibire selettivamente gli enzimi appartenenti alla famiglia delle PTPasi.

11 Materiali

Per la sintesi dei seguenti composti i reagenti utilizzati di cui non è riportata la sintesi sono commercialmente disponibili (Aldrich, Fluka, Janssen) e sono stati impiegati senza ulteriore purificazione, se non è espressamente specificato.

I valori di R_f si riferiscono a quelli ottenuti da TLC impiegando fogli di gel di silice dello spessore di 0.25 mm (Merck F₂₅₄); la rivelazione delle macchie è stata fatta con lampada U.V. (254 nm) e con *p*-anisaldeide, KMnO₄ o acido fosfomolibdico o ninidrina specifica per le ammine. Ove non specificato, l'eluente è il solito usato per la colonna cromatografica.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin Elmer 881.

Gli spettri NMR sono stati registrati con strumenti Varian Gemini 200 MHz o con Advance 400 MHz Bruker; i valori di chemical shift sono riportati in ppm e sono relativi al segnale del TMS ($\delta = 0.00$ ppm); le notazioni s, d, t, q, m, br, Ar, Bn indicano rispettivamente: singoletto, doppietto, tripletto, quartetto, multipletto, slargato (broad), aromatici, benzilici.

Gli spettri di massa sono stati registrati per infusione con uno strumento GC-MS (ESI) Shimadzu QP 5050A. I punti di fusione sono stati determinati con uno strumento RCH Kofler.

Le misure di potere ottico rotatorio sono state eseguite con un polarimetro Perkin Elmer 240 C/ Perkin Elmer JASCO DIP 370.

Le purificazioni dei prodotti sono state effettuate per via cromatografica mediante FCC (flash column chromatography) su gel di silice 32-63 Mesh.

Le analisi elementari sono state eseguite con un analizzatore Perkin Elmer CHNS/O 2400.

Le reazioni con le microonde sono state eseguite con l'apparecchio CEM discover.

Acronimi utilizzati:

Et₂O = etere dietilico; AcOEt = acetato di etile; DCM = diclorometano, EP = etere di petrolio; MeOH = metanolo; Bn = benzile, TLC = thin layer chromatography; FCC = flash column chromatography.

12 Metodi

12.1 Purificazioni

Nella sintesi organica un ruolo chiave è svolto dalle purificazioni dei vari prodotti di reazione ottenuti. Nella mia breve permanenza nel laboratorio di organi ho potuto sperimentare i seguenti metodi.

Colonna cromatografica

Questa tecnica permette di separare due o più composti attraverso la diversa affinità di essi con la fase solida, in questo caso gel di silice (SiO_2) e con l'eluente. Prima di operare una colonna di questo tipo occorre trovare una buona miscela di solventi che separino i due composti facendo sì che prima esca uno e poi l'altro, se l'uscita avviene in contemporanea la separazione non sarà stata efficiente.

Per trovare il giusto eluente si fanno prima delle prove di TLC.

Questa tecnica permette di trovare la miscela di solventi che meglio differenzia di R_f dei composti che ho nel campione. Anche la TLC si basa sulla diversa affinità tra fase mobile e il campione e da un responso quasi immediato della "bontà" o meno della miscela usata. Se la differenza di R_f tra le macchie è soddisfacente allora quel eluente potrà essere usato per effettuare la colonna cromatografica.

Preparazione della colonna cromatografia

- Introdurre in fondo alla colonna, aiutandosi con una bacchetta di vetro, un piccolo batuffolo di cotone, che serve a bloccare la fuoriuscita della silice.
- Aggiungere circa 15 cm di silice non ancora bagnata per vedere quanta ne servirà per la colonna e poi farla uscire rovesciando la colonna
- Livellare il fondo con 1 cm di sabbia per colonne
- In base ai risultati della TLC ottenuti in precedenza preparare l'eluente
- Nella beuta con SiO_2 (fase stazionaria), unire l'eluente agitando con una bacchetta di

vetro fino alla consistenza desiderata

- Introdurre la miscela ottenuta nella colonna, tenendo sul fondo una beuta
- Una volta fatto scorrere l'eluente fino a compattazione della colonna, si spolvera 2 mm di sabbia

La colonna ora è pronta e si procede alla deposizione che deve avvenire sulla sabbia con il minor uso di eluente e cercando di non disperdere il prodotto sulle pareti.

Una volta assorbito il prodotto sulla silice, si procede versando il nostro eluente e sgocciolando nelle provette, dato che il flusso deve essere circa sempre uguali ci avvaliamo di un debole flusso di aria compressa.

Durante l'eluizione per accertarsi dell'uscita del composto di nostro interesse vengono fatte delle TLC delle provette, deponendo il grezzo come controllo.

Le provette con il prodotto purificato vengono isolate, concentrate al rotavapor e portate a secco con una pompa.

Resina a scambio ionico

Le resine scambiatrici di ioni sono costituite da uno scheletro macromolecolare di elevato peso molecolare costituito, per esempio, da copolimeri stirolo-divinilbenzene o da polimeri acrilici o metacrilici, che assicura l'insolubilità in acqua della resina ed agisce come supporto ai gruppi funzionali che caratterizzano le proprietà della resina.

Supportati da questa struttura polimerica, sono poi presenti gruppi funzionali caratteristici, ionizzabili.

Le principali caratteristiche che diversificano fra loro i vari tipi di resine scambiatrici di ioni sono essenzialmente:

- il tipo del gruppo funzionale caratteristico;
- la natura dello ione mobile.

Una resina è scambiatore cationico se lo ione mobile è un catione (in generale Na^+ o H^+) mentre lo scambiatore è anionico se lo ione mobile è un anione (in generale Cl^- o OH^-).

I gruppi funzionali sono essenzialmente di quattro tipi:

Resine cationiche

Gruppi solfonici

- SO₃H

- SO₃Na

Gruppi carbossilici

- COOH

- COOK

Resine anioniche

Gruppi amminici primari o sostituiti

- NH₂

- NHR

- NR₂

Preparazione colonna Dowex

- Prendere una colonna e apporre sul fondo del cotone per evitare che la resina fuoriesca
- Introdurre nella cima della colonna la resina e con il solvente formare uno strato omogeneo e compatto
- Durante i primi 10 ml la resina tenderà a spurgare eluendo un color arancio
- Depositare il prodotto sciogliendolo in MeOH
- Dopo questa fase si introducono in serie 20 ml di MeOH e 20 di H₂O:

questi lavaggi garantiscono che, una volta che il prodotto d'interesse sia legato alla resina, le impurezze vengano portate via o con l'eluente o con l'acqua.

- Eluire 20 ml di NH_3 al 6% : l'ammoniaca, essendo in eccesso, si lega alla resina e fa uscire il prodotto purificato.
- Tramite un controllo con indicatore permanganato, vengono isolate le provette con il prodotto desiderato.

2.1.3 Filtrazione su Celite®

La Celite® è un polvere bianca di composizione nota: (Fluka, Celite 501)

Al_2O_3 , 4.0%

CaO , 0.5%

Fe_2O_3 , 1.3%

$\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$, 3.3%

SiO_2 , 89.6%

Prevalentemente silicea, questa sostanza viene utilizzata per filtrare soluzioni aventi particolato, sospensioni, e precipitati di considerevoli dimensioni e quantità. La preparazione del filtro è molto semplice:

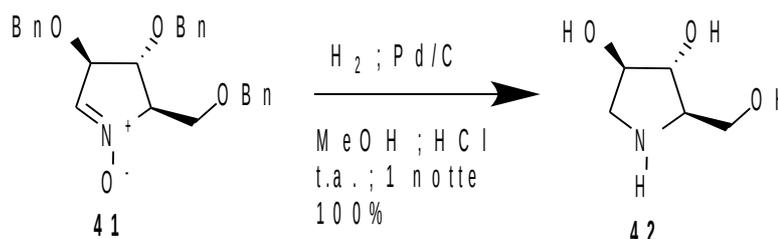
- svuotare una siringa in plastica da 10 o 20 ml
- porre sul fondo del cotone per non far uscire la Celite®
- introdurre 3 cm di Celite®
- ricoprire con 5 mm di cotone e compattare bene con l'aiuto del solvente

Il prodotto da purificare va sgocciolato non troppo bruscamente sul cotone, rilavando più volte il solido che si accumula sul cotone superiore.

13 Sintesi

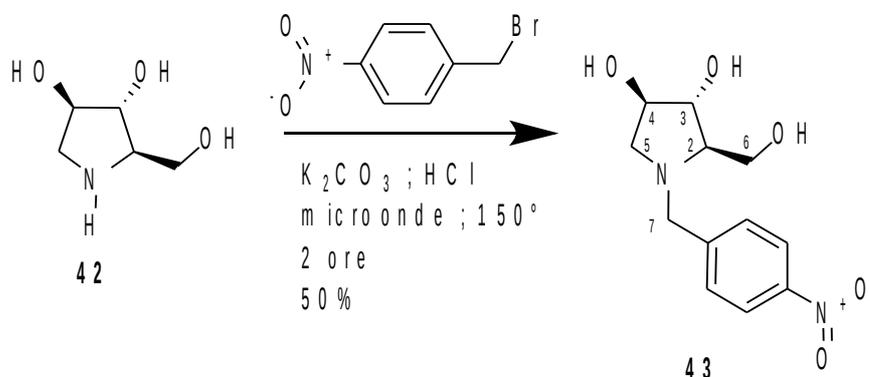
13.1 Sintesi del composto 43

Sintesi del (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(idrossimetil)pirrolidina-3,4-diolo (**42**)



Ad una soluzione di nitrone **41** (200 mg, 0.48 mmol) in 20 ml di MeOH sono stati aggiunti, sotto agitazione e in atmosfera d'azoto, 100 mg di Pd supportato su carbone attivato (10 % di Pd) e 3 gocce di HCl concentrato. Questa reazione è stata preparata dopo aver eliminato l'azoto, facendo gorgogliare nella soluzione idrogeno. La miscela di reazione è stata lasciata in atmosfera d'idrogeno a temperatura ambiente per una notte, per far avvenire l'idrogenazione sul catalizzato di Pd/C. Un controllo 1H NMR ha evidenziato la scomparsa dei gruppi benzilici. Una volta completata la reazione la miscela è stata filtrata su Celite® per eliminare il catalizzatore, che si presenta come un polverino solido grigio, lavando più volte con MeOH. Dopo aver evaporato il solvente a pressione ridotta con il rotavapor è stato ottenuto il grezzo di colore giallo, che è stato purificato su resina Dowex 50WX8-200 (eluente 20 ml di MeOH, poi 20 ml di H₂O ed infine 20 ml di NH₃ 6%), isolando il prodotto desiderato **42** sotto forma di olio di colore giallo (63 mg, 0.48 mmol, 100% di resa).

Sintesi di (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(idrossimetil)-1-[(4-nitrofenil)metil]pirrolidina-3,4-diolo
(43)



In una vials è stato aggiunto il composto **42** (63 mg, 0.48 mmol) in 4 ml di CH₃CN, 4-nitrobenzilbromuro (156mg, 0.72 mmol) e K₂CO₃ e la miscela di reazione è stata tenuta nello strumento a microonde per 2 ore a 150°C. È stato fatto un controllo TLC (eluente DCM/MeOH 3:1) che ha verificato la scomparsa del composto iniziale e la formazione di una nuova macchia del prodotto con R_f:0.90. La sospensione è stata filtrata su Celite® e la soluzione raccolta e concentrata a pressione ridotta tramite rotavapor. Il grezzo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica (elunte: DCM/MeOH 20:1 DCM/MeOH 10:1) isolando il prodotto desiderato **43** (63 mg, 0.23 mmol, resa 50%).

Pf: 132-133°C **PM:** 268,11

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 8.18 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, Ar), 7.63 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, Ar), 4.22 (d, *J*= 14.2 Hz, 1H, Ha-7), 3.93-3.90 (m, 2H, H-3, H-4), 3.74 (dd, *J*= 11.3, 4.9 Hz, 1H, Ha-6), 3.66 (dd, *J*= 11.2, 4.4 Hz, 1H, Hb-6), 3.56 (d, *J*= 14.2 Hz, 1H, Hb-7), 2.80 (d, *J*= 10.2 Hz, 1H, Ha-5), 2.63 (dd, *J*= 10.3, 4.9 Hz, 1H, Hb-5), 2.58 (q, *J*=4.4 Hz, 1H, H-2).

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD) δ ppm: 147.3, 147.0 (s, 2C, C-Ar, C-NO₂) 129.3 (d, 2C, C-Ar), 122.9 (d, 2C, C-Ar), 79.6 (d, C-4), 76.0 (d, C-3), 72.6 (d, C-2), 61.4 (t, C-6), 59.1 (t, C-5), 57.9 (t, C-7)

IR (cm⁻¹): 3685, 3628, 2943, 2835, 2362, 2337, 2255, 1601, 1523, 1347, 1016.

MS(ESI) m/z: 291.08 ([M+Na]⁺; 100)

[α]_D²²: (MeOH, c=1) -42.6

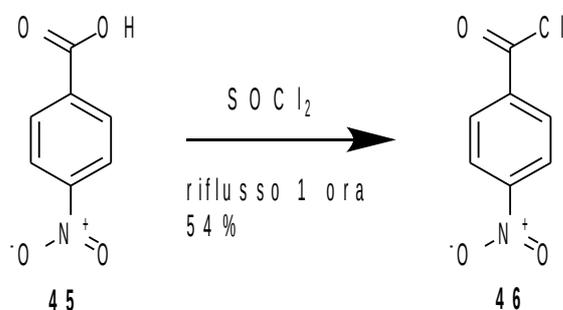
Analisi elementare C₁₂H₁₆N₂O₅

Calcolato: C 53.73, H 6.01, N 10.44

Trovato: C 52.22, H 5.76, N 10.00

13.2 Sintesi del composto **47**

Sintesi del 4-nitrobenzoil cloruro (**46**)³⁴



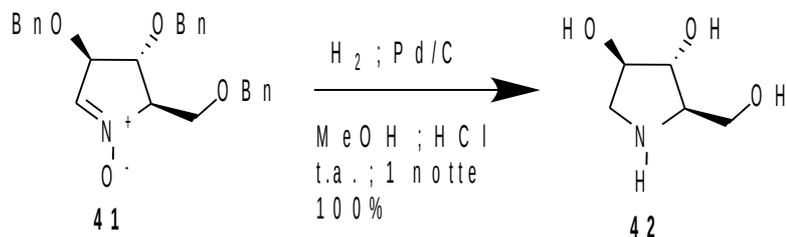
In un pallone è stato aggiunto acido paranitrobenzoico **45** (200mg; 1.2 mmol), 6 ml di cloruro di tionile e la miscela è stata tenuta a refluxo per un'ora. Una volta ultimata la reazione è stato evaporato SOCl₂ al rotavapor, aggiungendo toluene più volte, fino alla comparsa di un solido giallo. Infine il prodotto **46** ottenuto è stato sottoposto a ricristallizzazione in EP per eliminare le impurezze, ottenendo un solido verde (120 mg, 0.65 mmol, resa 54%) il cui punto di fusione e lo spettro ¹H NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura.³⁴

Pf: 74,5°C

¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) δ ppm: 8.42-8.22 (m, 4H)

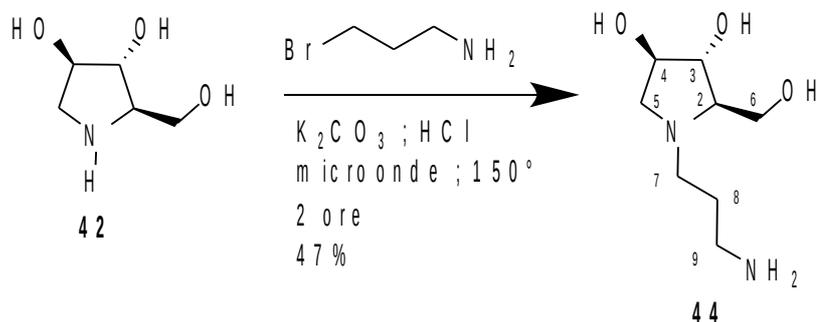
³⁴ Otevrel J.; Mandelova Z.; Pesko M.; Guo J.; Kralova K.; Sersen F.; Vejsova M.; Kalinowski D.S.; Kovacevic Z.; Coffey A.; Csollei J.; Richardson D.R.; Jampilek J.; (2010) *Molecules*, **15**, 11, 8122-8142.

Sintesi del (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(idrossimetil)pirrolidina-3,4-diolo (**42**)



Ad una soluzione di nitrone **41**(150 mg, 0.36 mmol) in 20 ml di metanolo sono stati aggiunti, sotto agitazione e in atmosfera d'azoto, 100 mg di Pd supportato su carbone attivato (10 % di Pd) e 3 gocce di HCl concentrato. Dopo aver eliminato l'azoto facendo gorgogliare nella soluzione idrogeno, la miscela di reazione è stata lasciata in atmosfera d'idrogeno a temperatura ambiente per una notte. Un controllo ^1H NMR ha evidenziato la scomparsa dei gruppi benzilici. Una volta completata la reazione la miscela è stata filtrata su Celite® per eliminare il catalizzatore lavando più volte con metanolo. Dopo aver evaporato il solvente a pressione ridotta con il rotavapor è stato ottenuto il grezzo di colore giallo, che è stato purificato su resina Dowex 50WX8-200 (eluente 20 ml di MeOH, poi 20 ml di H₂O ed infine 20 ml di NH₃ 6%), isolando il prodotto desiderato **42** sotto forma di olio di colore giallo pallido.(48 mg, 0.36 mmol, resa 100%).

Sintesi del (2*R*,3*R*,4*R*)-1-(3-amminopropil)-2-(idrossimetil)pirrolidin-3,4-diolo (**44**)



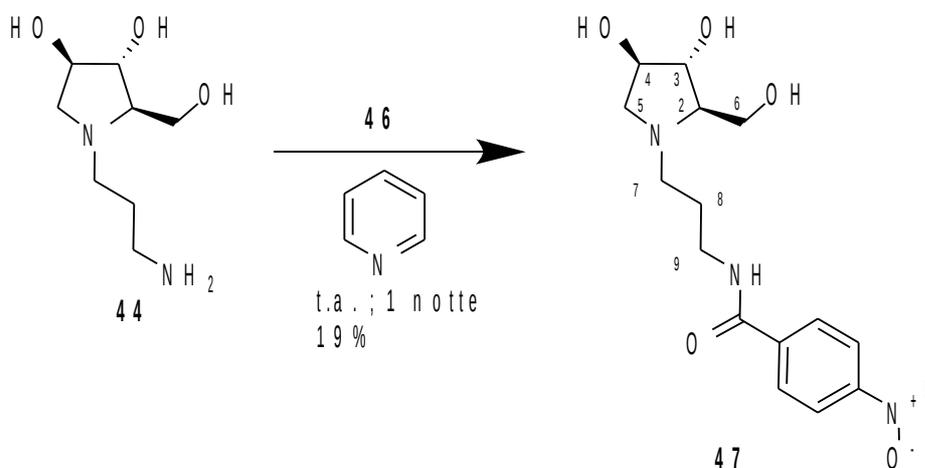
In una vials è stato aggiunto il composto **42** (51 mg, 0.38 mmol) in 4 ml di CH₃CN, bromopropanammina (124 mg, 0.57 mmol) e K₂CO₃, lasciando la miscela di reazione in microonde per 2 ore a 150°C. Dopo il tempo previsto è stato fatto un controllo TLC (eluente DCM/MeOH 3:1) dove è stata verificata la scomparsa del composto iniziale e la formazione di una nuova macchia del prodotto finale. La sospensione è stata filtrata su Celite® e la soluzione raccolta e concentrata a pressione ridotta tramite rotavapor. Il grezzo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica (elunte: DCM/MeOH/NH₃ 1:1:1) ottenendo il composto **44** come olio (24 mg, 0.13 mmol, resa 47 %).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 3.97-3.96 (m, 1H, H-4), 3.86-3.85 (m, 1H, H-3), 3.76 (dd, *J*=11.7, 3.9 Hz, 1H, Ha-6) 3.68 (dd, *J*= 11.5, 4.1 Hz, 1H, Hb-6), 3.14-3.00 (m, 4H, Ha-5, Ha-7, H-9), 2.60 (dd, *J*= 10.2, 5.1 Hz, 1H, Hb-5), 2.60-2.56 (m, 1H, Hb-7), 2.39 (q, *J*= 4.2 Hz, 1H, H-2), 1.92-1.78 (m, 1H, Ha-8), 1.76-1.64 (m, 1H, Hb-8)

MS(ESI) m/z: 213.08 ([M+Na]⁺; 100), 191.08 ([M+1]⁺; 69)

[α]_D²⁷: (MeOH, c=0.135) -14.1

Sintesi del N-{3-[(2*R*,3*R*,4*R*)-3,4-diidrossi-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il]propil}-4-nitrobenzammide (**47**)



In un pallone è stato riprodotto un ambiente inerte con flusso di N₂, preparata una soluzione con l'ammina **44** (15 mg, 0.08 mmol) e, come solvente, 1.5 ml di piridina anidra. A soluzione omogenea raggiunta è stato aggiunto il cloruro dell'acido **46** (15 mg, 0.08 mmol) e lasciato per 16 ore a temperatura ambiente in atmosfera inerte. Tramite FCC è stata isolata la macchia del prodotto finale a R_f: 0.27 eluendo con DCM/MeOH 5:1. Il prodotto è stato ulteriormente purificato per passaggio su Dowex 50WX8-200, poiché presentava varie impurezze riscontrate all' ¹H NMR. Dopo passaggio su resina è stato ottenuto il composto **47** (5 mg, 0.01 mmol, resa 19%) come olio.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm: 8.32-8.30 (m, 2H, Ar), 8.06-8.04 (m, 2H, Ar), 4.08-4.06 (m, 1H, H-4), 3.94-3.91 (m, 1H, H-3), 3.84-3.74 (m, 2H, H-6), 3.60-3.51 (m, 1H, Ha-9), 3.48-3.40 (m, 1H, Hb-9), 3.34-3.25 (m, 2H, Ha-7, Ha-5), 3.06-3.02 (m, 1H, Ha-7), 2.96-2.80 (m, 2H, Hb-5, H-2).

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD) δ ppm: 166.9 (s, C=O), 149.8 (s, C-NO₂), 139.8 (s, C-Ar), 128.3 (d, 2C, C-Ar), 123.2 (d, 2C, C-Ar), 78.0 (d, C-3), 75.2 (d, 2C, C-4, C-2), 60.3 (t, C-6), 59.2 (t, C-7), 53.9 (t, C-5), 37.8 (t, C-9), 26.1 (t, C-8).

MS(ESI) m/z: 340.17 ([M+1]⁺; 100)

[α]_D²³: (MeOH, c=0.16) -10.0

14 Bibliografia

- Asano N.; Kizu H.; Oseki K.; Tomioka E.; Matsui K.; Okamoto M.; Baba M.; (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 2349-2356.
- Asano N.; Nash R.J.; Molyneux R.J.; Fleet G.W.J.; (2000) *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 1645.
- Bender M.H.; Yother J.; (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 47966–47974.
- Beresford N.J.; Mulhearn D.; Szczepankiewicz B.; Liu G.; Johnson M.E.; Fordham-Skelton A.; Abad-Zapatero C.; Cavet J.S.; Taberner L.; (2009) *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 928–936.
- Bialy L.; Waldmann H.; (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 3814-3839.
- Cardona F.; Faggi E.; Liguri F.; Cacciarini M.; Goti A.; (2003) *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2315-2318.
- Cheng A.; Uetani N.; Simoncic P.D.; Chaubey V.P.; Lee-Loy A.; McGlade C.J.; Kennedy B.P.; Tremblay M.L.; (2002) *Dev. Cell.*, **2**, 497-503.
- Chiaradia L.D.; Martins P.G.A.; Cordeiro M.N.S.; Guido R.V.C.; Ecco G.; Andricopulo A.D.; Yunes R.A.; Veronal J.; Nunes R.J.; Terenzi H.; (2012) *J. Med. Chem.*, **55**, 390–402.
- Chiaradia L.D.; Mascarello A.; Purificação M.; Vernal J.; Cordeiro M.N.S.; Zenteno M.E.; Villarino A.; Nunes R.J.; Yunes R.A.; Terenzi H.; (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6227–6230.
- Compain P.; Martin R.O.; (2007) *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Dissing J.; Svensmark O.; (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1041**, 232-242;
- Fujimoto S.; Mukarami K.; Ishawaka A.; Himi K.; Ohara A.; (1998) *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3020-3026.
- Homan K.T.; Balasubramaniam D.; Zabell A.P.R.; Wiest O.; Helquist P.; Stauffacher C.V.; (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 5449–5456.
- Ilan O.; Bloch Y.; Frankel G.; Ullrich H.; Geider K.; Rosenshine I.; (1999) *EMBO J.*, **18**,

3241–3248.

Jinno S.; Suto K.; Nagata A.; Igarashi M.; Kanaoka Y.; Nojima H.; Okayama H.; (1994) *EMBO J.*, **13**, 1549–1556.

Lammer C.; Wagerer S.; Saffrich R.; Mertens D.; Ansorge W.; Hoffmann I.; (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 2445–2453.

Larsen M.; Tremblay M.L.; Yama K.M.; (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 700-711.

Lyion M.A.; Ducruet A.P.; Wipf P.; Lazo J.S.; (2002) *Nat. Rev.*, **1**, 961-976.

Maccari R.; Ottanà R.; (2012) *J. Med. Chem.*, **55**, 2–22.

Maccari R.; Ottanà R.; Ciurleo R.; Paoli P.; Manao G.; Camici G.; Laggner C.; Langer T.; (2009) *Chem.Med.Chem*, **4**, 957–962.

Maccari R.; Paoli P.; Ottanà R.; Jacomelli M.; Ciurleo R.; Manao G.; Steindl T.; Langer T.; Vigorita M.G.; Camici G.; (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5137–5149.

Mascarello A.; Chiaradia L.D.; Vernal J.; Villarino A.; Guido R.V.C.; Perizzolo P.; Poirier V.; Wong D.; Martins P.G.A.; Nunes R.J.; Yunes R.A.; Andricopulo A.D.; Av-Gay Y.; Terenzi H.; (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 3783–3789.

Navarrete-Vazquez G.; Paoli P.; León-Rivera I.; Villalobos-Molina R.; Medina-Franco J.L.; Ortiz-Andrade R.; Estrada-Soto S.; Camici G.; Diaz-Coutiño D.; Gallardo-Ortiz I.; Martinez-Mayorga K.; Moreno-Díaz H.; (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3332–3341.

Otevrel J.; Mandelova Z.; Pesko M.; Guo J.; Kralova K.; Sersen F.; Vejsova M.; Kalinowski D.S.; Kovacevic Z.; Coffey A.; Csollei J.; Richardson D.R.; Jampilek J., (2010) *Molecules*, **15**, 11, 8122-8142.

Ottanà R.; Maccari R.; Ciurleo R.; Paoli P.; Jacomelli M.; Manao G.; Camici G.; Laggner C.; Langer T.; (2009) *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 1928–1937.

Ramponi G.; Raugei G.; Chiarugi P.; (2002) *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 941–949.

Tonks N. K.; (2006) *Nature*, **7**, 834-846.

Tuberculosis Fact sheet N°104. World Health Organization, November 2010.

Vidal D.; Blobel J.; Perez Y.; Thormann M.; Pons M.; (2007) *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 1102-1108.

- Wang W-Q.; Sun J-P.; Zhang Z-Y.; (2003) *Curr. Top. Med. Chem.*, **3**, 739-748.
- Whitfield C.; Roberts I.S.; (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 1307–1319.
- Wong D.; Chao J.D.; Av-Gay Y.; (2013) *Trends Microbiol.*, **21**, 100-109.
- Yoon G.; Lee W.; Kim S.N.; Cheon S.H.; (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 5156–5157.
- Zhang S.; Zhang Y-Z.; (2007) *Drug Discov. Tod.*, **12**, 373-381.
- Zhang Z-Y.; Jin-Peng S.; Fedorov A.A.; Seung-Yub L.; Xiao-Ling G.; Kui S.; Lawrence D.S.; Almo S.C.; (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12406–12414.
- Zhang Z. Y.; (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 416-423.

15 Ed infine i ringraziamenti...

Ringrazio sicuramente per prima la mia famiglia: mamma Sabrina , babbo Luigi, fratello Filippo e nonni (chi c'è e chi purtroppo ci ha abbandonato) Oliviero, Ilaria e Torquato e Maria ;che mi sostiene, mi ha sostenuto e mi sosterrà sempre, e che mi stressa nei momenti giusti e in quelli sbagliati, come ogni famiglia normale che si rispetti. Ringrazio tutti coloro che hanno partecipato alla mia tesi soprattutto, il mio relatore Paolo Paoli, la correlatrice Francesca Cardona, che mi hanno aiutato immensamente e non si sono mai lamentati del poco tempo per fare tutto, tutti e due i dipartimenti che mi hanno ospitato: il Dipartimento di Biochimica a Morgagni e il Dipartimento di Chimica a Sesto Fiorentino, tutti i dottorandi e gli studenti della magistrale che mi hanno sopportato e supportato nei due laboratori, Giampiero, e Stefania ad Organica; Alice e Denise a Biochimica, senza i quali probabilmente avrei fatto saltare in aria le strutture. Ringrazio tutta la mia squadra, Monnalisa Softball Arezzo che mi aiuta fuori e dentro il campo, e mi ripesca nei momenti di panico assoluto, in questo gruppo ringrazio particolarmente Letizia, mia compagna di avventure, belle e brutte, con la quale ho condiviso e condivido qualcosa di più di una semplice amicizia, Giulia, mia “sorella” rossa e Miss Nazionale, Nora, la designer e l'esterno centro più matto del softball, Cimba, la bambina adulta, Giada, Elisa e Beppe, Carlotta, Jasmine, Chiara, Alice, Irene, Dero, Federica, Silvia e i miei allenatori: Fabio e Sandra. Ringrazio il mio ragazzo Bernardo, che nonostante non capisca quello che faccio all'università e nel mio sport, mi vuole bene a prescindere, grazie. Ringrazio il parentado allargato: Erika, Alessandro e la piccola Andrea, che nell'ultimo periodo mi hanno visto molto poco per i troppi impegni universitari, e tutti i miei parenti di Città di Castello che mi vedono ancora meno. Ringrazio tutta la crew di Castiglioni per tutte le belle serate passate insieme, in particolare ringrazio il Meo, il gigante superbuono e il Lele per tutti gli splendidi messaggini che mi ha mandato e che mi manderà. Ringrazio tutti i miei compagni dell'università, specialmente chi mi ha dato una mano o semplicemente chi mi ha ascoltato, ringrazio l'Università degli Studi di Firenze in generale, ringrazio chi fa ricerca e ama farla anche se è pagato una miseria, ringrazio chi mi vuole bene e chi mi vuole male perché anche grazie a loro io sono qua oggi. Ringrazio anche i miei compagni delle superiori che frequento ancora Maria Chiara, Matteo e Stefano. E infine voglio ringraziare tutto il softball italiano che sta attraversando una crisi profonda, ringrazio tutte le atlete e amici che ho conosciuto e che conosco grazie a questo sport, sparsi in tutta Italia, da nord a sud.

Grazie a tutti.