



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

**Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche,
Farmaceutiche e Ambientali**

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE

*Curriculum: Chimica e tecnologie farmaceutiche e
nutraceutico-alimentari*

(XXXI CICLO)

Progettazione, sintesi e valutazione di nuove molecole attive
come inibitori di enzimi coinvolti nello sviluppo del
diabete mellito e delle sue complicazioni

Design, synthesis and evaluation of new molecules active as
inhibitors of enzymes involved in the development of
diabetes mellitus and its complications

**TESI DI DOTTORATO DI
ILENIA ADORNATO**

**TUTOR
PROF.SSA ROSANNA MACCARI**

**IL COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO
PROF. SEBASTIANO CAMPAGNA**

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 1
CAPITOLO 1 - <i>Progettazione, sintesi e valutazione di nuovi inibitori della Protein tirosina fosfatasi 1B (PTP1B)</i>	Pag. 4
CAPITOLO 2 - <i>Progettazione, sintesi e valutazione di “designed multiple ligands” come potenziali farmaci per il trattamento del diabete mellito e delle sue complicanze</i>	Pag. 71
CONCLUSIONI	Pag.130
PARTE SPERIMENTALE	Pag. 132
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	Pag. 163

INTRODUZIONE

Il diabete mellito (DM) è una complessa malattia metabolica, caratterizzata principalmente da un aumento della concentrazione ematica di glucosio (iperglicemia) che è responsabile di una serie di gravi alterazioni metaboliche e complicanze croniche. Il DM può essere causato da un deficit assoluto di insulina (DM di tipo 1), in seguito a un danno irreversibile alle cellule β pancreatiche che producono l'ormone, o da una ridotta risposta all'azione dell'insulina a livello degli organi bersaglio (insulino-resistenza, caratteristica del DM di tipo 2). L'iperglicemia cronica si associa ad importanti danni tissutali e vascolari, che sono all'origine di complicanze croniche a carico di cristallino, retina, reni, sistema nervoso, cuore e vasi sanguigni.

Attualmente, il DM interessa oltre il 6% della popolazione mondiale, coinvolgendo più di 420 milioni di persone, sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, e provocando circa 1,5 milioni di morti ogni anno. Secondo dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si prevede che il numero di soggetti affetti da DM aumenterà a quasi 600 milioni entro il 2035, ma questo numero potrebbe essere sottostimato, come già si è verificato in anni recenti. L'OMS ha quindi inserito il DM tra le patologie croniche su cui maggiormente investire per la prevenzione, dato il crescente peso assunto da questa patologia anche nei paesi in via di sviluppo.

Il DM di tipo 2 (DM2) è la forma più diffusa, responsabile di circa il 90-95% di tutti i casi di diabete; esso è considerato una patologia multifattoriale, nella cui eziopatogenesi sono coinvolti polimorfismi genetici predisponenti alla patologia e fattori ambientali, quali una dieta ipercalorica ricca in grassi e una ridotta attività fisica. I pazienti che sono affetti da DM2 presentano in ogni caso insulino-resistenza, che può essere anche associata a una ridotta secrezione insulinica. La maggior parte dei pazienti con DM2 è obesa o in sovrappeso e l'obesità stessa, o un aumento del tessuto adiposo a livello viscerale, causa un aumento dei livelli d'insulino-resistenza negli organi bersaglio dell'ormone; inoltre, i pazienti obesi presentano un rischio aumentato di sviluppare

complicanze croniche associate soprattutto ad alterazioni micro- e macrovascolari indotte dall'iperglicemia. Nel DM2 possono essere presenti simultaneamente iperinsulinemia e iperglicemia: infatti, in seguito agli aumentati livelli glicemici, viene stimolata la secrezione di maggiori quantità di insulina che tuttavia, a causa dell'insulino-resistenza periferica, non riesce a controllare adeguatamente i livelli glicemici. L'insulino-resistenza può migliorare con la riduzione del peso e/o con un trattamento farmacologico mirato al controllo dell'iperglicemia, ma attualmente sono pochi i farmaci in grado di contrastare efficacemente tale grave condizione.

Il trattamento farmacologico del DM2 è complesso e richiede che, oltre alla riduzione della glicemia, venga attuato uno stretto controllo anche di altri fattori influenti sulla malattia, quali la dieta, l'attività fisica e il trattamento e/o prevenzione delle complicanze croniche associate. Un'appropriata terapia farmacologica deve prevedere quindi un costante controllo dei livelli glicemici per assunzione di farmaci antidiabetici orali associato nel contempo allo sviluppo della terapia per la prevenzione e cura delle complicanze associate alla patologia. Nel DM1, invece, l'unico trattamento possibile è la somministrazione di preparazioni di insulina umana o modificata. Tuttavia è da tenere presente che il DM è una patologia cronica e che, anche con un attento trattamento farmacologico, l'omeostasi glucidica non può essere costantemente garantita, per cui lo sviluppo delle complicanze a lungo termine è un evento che si verifica molto di frequente, tanto da rappresentare la prima causa di morbidità e mortalità nei pazienti diabetici.

E' evidente quindi la necessità di proseguire la ricerca finalizzata alla scoperta di nuovi farmaci utili per il trattamento del DM e delle patologie ad esso associate.

La ricerca che ho sviluppato durante il triennio di Dottorato è stata rivolta alla progettazione, sintesi, valutazione biologica e studio delle relazioni struttura-attività (SAR) di nuovi inibitori di enzimi coinvolti nell'insorgenza del DM2 e delle sue complicanze croniche. In particolare, una parte significativa di questa ricerca è stata finalizzata all'individuazione di nuovi inibitori della protein tirosina fosfatasi 1B (PTP1B), enzima che svolge un ruolo primario nello sviluppo dell'insulino-resistenza,

condizione tipica non solo del DM2 ma anche di altre patologie, come obesità e malattie neurodegenerative. Il design, la sintesi e il successivo studio SAR hanno riguardato sia inibitori diretti al sito catalitico dell'enzima sia inibitori di tipo allosterico.

Un altro bersaglio biologico critico per la progettazione di inibitori enzimatici come potenziali farmaci per il trattamento del DM, è l'aldoso reduttasi (ALR2), enzima che svolge un ruolo cruciale nella comparsa di alterazioni tissutali e vascolari responsabili dello sviluppo delle complicanze diabetiche croniche. L'ALR2 è implicata in processi ossidativi/infiammatori innescati dall'iperglicemia, che costituiscono meccanismi fondamentali per lo sviluppo delle complicazioni croniche associate al DM.

E' ampiamente dimostrato che l'inibizione della PTP1B e dell'ALR2 può costituire una promettente strategia per l'individuazione di nuovi candidati farmaci capaci, rispettivamente, di migliorare la risposta tissutale all'insulina e di contrastare l'insorgenza delle complicanze diabetiche. Su queste basi, una seconda parte della mia ricerca è stata rivolta all'individuazione di inibitori duplici di questi due enzimi, come "designed multiple ligands" (DMLs) capaci di contrastare simultaneamente lo sviluppo dell'insulino-resistenza tipica del DM2 e la progressione delle complicanze diabetiche. Infatti, è stato suggerito che un'utile strategia per ottenere un migliore controllo farmacologico di patologie complesse e multifattoriali, come il DM2 e le sue complicanze, può essere lo sviluppo di DMLs rivolti a controllare più di un meccanismo coinvolto nella patogenesi di tali malattie.

Nel corso del triennio di Dottorato, ho svolto un periodo semestrale di ricerca presso il gruppo di Computer-Aided Molecular Design della Freie Universität di Berlino, apprendendo alcune tecniche di molecular modeling ed eseguendo parte degli studi di docking molecolare riportati in questa tesi. Gli esperimenti di molecular modeling hanno accompagnato tutta la ricerca del triennio di dottorato, supportando sia la progettazione di nuovi inibitori enzimatici sia la razionalizzazione dei risultati e delle SAR osservate.

Capitolo 1

PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE DI NUOVI INIBITORI

DELLA PROTEIN TIROSINA FOSFATASI 1B (PTP1B)

1.1 - LE PROTEIN TIROSINA FOSFATASI COME BERSAGLI MOLECOLARI PER LA PROGETTAZIONE DI NUOVI FARMACI

La fosforilazione delle proteine su specifici residui aminoacidici rappresenta un processo post-traslazionale di fondamentale importanza per il controllo di molte funzioni cellulari. In particolare, nelle cellule eucariotiche, la fosforilazione reversibile di residui di tirosina è cruciale, più di altri processi di fosforilazione, per la regolazione di svariate vie di segnalazione cellulare, soprattutto quelle indotte da meccanismi di attivazione recettoriale, ed è coinvolta in funzioni cellulari importanti, quali crescita, differenziazione, metabolismo, adesione, meccanismi di trasporto, trascrizione genica.

La fosforilazione reversibile delle proteine su specifici residui di tirosina è controllata dalle azioni coordinate di protein tirosina fosfatasi (PTP) e protein tirosina chinasi (PTK). Alterazioni del delicato equilibrio tra le azioni delle PTK e PTP causano aberrazioni nella fosforilazione dei residui di tirosina che sono all'origine di gravi patologie, quali cancro, malattie metaboliche, infiammatorie e neurodegenerative [Tiganis 2007; Hunter 2009; Sastry 2011; Zhang 2015, 2017].

La possibilità di progettare farmaci mirati a correggere o contrastare le alterazioni di questi equilibri di fosforilazione/defosforilazione offre dunque enormi opportunità di intervento terapeutico, come hanno dimostrato i numerosi inibitori di PTK già presenti in terapia per il trattamento di forme tumorali diverse.

Negli ultimi tre decenni sono stati compiuti enormi progressi nella comprensione delle funzioni biologiche delle PTP ed è stata scoperta l'importanza dei complessi ruoli svolti

da questi enzimi come modulatori positivi o negativi di specifiche vie di trasduzione del segnale. Inoltre, sono state scoperte specifiche alterazioni nella loro espressione o attività che risultano coinvolte nella patogenesi di importanti patologie umane, come diabete, cancro, infiammazione, malattie autoimmuni e cardiovascolari. Di conseguenza, analogamente alle PTK il cui studio già precedentemente era stato avviato in modo estensivo, diverse PTP sono emerse come interessanti e innovativi bersagli molecolari per la progettazione di nuovi farmaci che, attraverso il controllo di specifiche aberrazioni della trasduzione del segnale coinvolte in processi patogenetici, possano essere diretti al trattamento di differenti patologie [Tonks 2006; Stuible 2008; Hunter 2009; Vintonyak 2009, 2011].

Il genoma umano codifica più di 100 PTP, che comprendono sia enzimi citoplasmatici sia proteine transmembrana con funzioni recettoriali (Figura 1.1) [Alonso 2004].

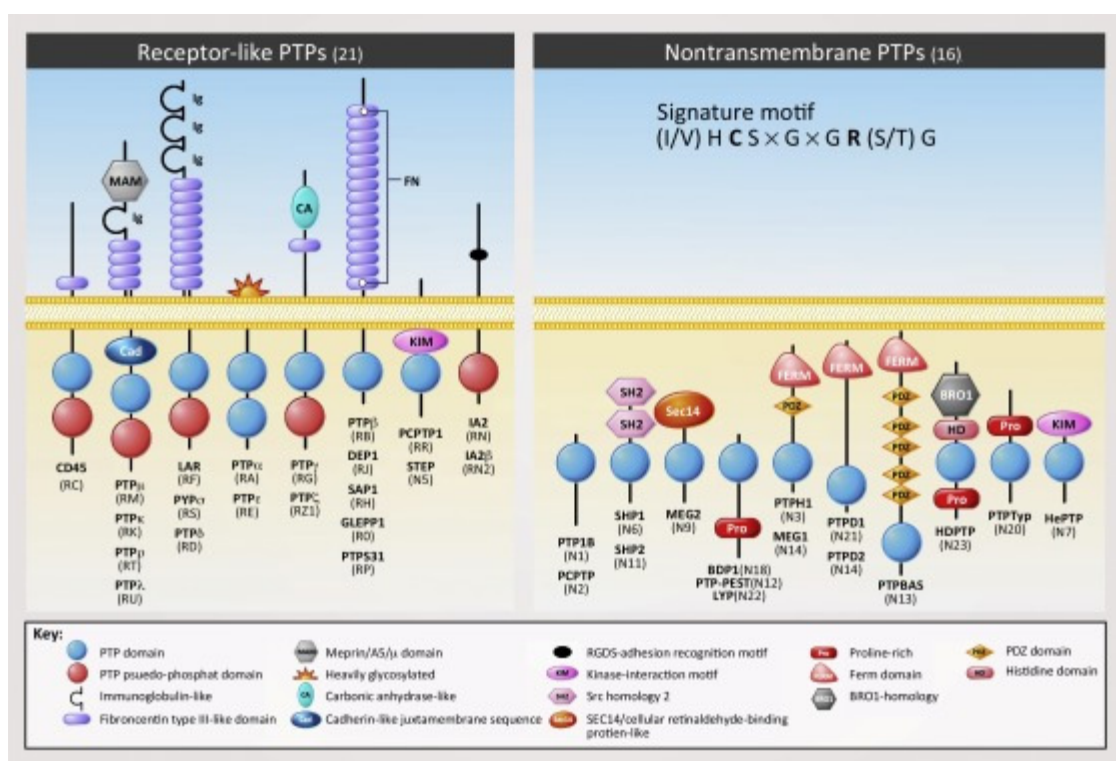


Figura 1.1 – Principali enzimi appartenenti alla famiglia delle PTP [Zhang 2015].

Tutte le PTP note agiscono attraverso un simile meccanismo catalitico di defosforilazione (Figura 1.2) e, per questo motivo, presentano un elevato grado di omologia nel sito di legame al gruppo fosfato del substrato, con residui aminoacidici altamente conservati. Tutti i membri della superfamiglia delle PTP sono infatti caratterizzati da una sequenza (I/V)HCXAGXGR(S/T), presente sul fondo della cavità del loro sito attivo e contenente un residuo nucleofilo di cisteina essenziale per la catalisi. Inoltre, la sequenza contiene un residuo di arginina che è critico per la ricognizione e il legame del substrato all'enzima, attraverso la formazione di legami ionici tra il proprio gruppo guanidinico carico positivamente e il gruppo fosfato carico negativamente del substrato. Il residuo catalitico di cisteina è ionizzato a pH fisiologici, in quanto il suo valore di pKa (~ 5) è significativamente più basso rispetto ai tipici valori (~ 8.5) dei residui di cisteina presenti in altre proteine, a causa del potenziale elettrostatico positivo del sito attivo [Yu 2018]. Ciò incrementa il carattere nucleofilo della cisteina che, come anione tiolato, può efficacemente attaccare l'atomo di fosforo del residuo di fosfotirosina (pTyr) del substrato per formare un fosfoenzima intermedio. Un residuo di acido aspartico, che fa parte di un loop mobile adiacente al sito attivo, funge da catalizzatore acido/base, donando prima un protone alla tirosina che è stata defosforilata e poi agendo come base nello step successivo di idrolisi del tioestere cisteinilfosfato, che conduce al rilascio di fosfato inorganico e ripristina l'enzima libero (Figura 1.2) [Cirri 1993; Barford 1994; Kolmodin 2001].

La natura polare ed altamente conservata dei siti catalitici delle PTP ha reso difficile e pieno di insidie il percorso mirato all'individuazione di nuovi lead compounds attivi come inibitori diretti al sito attivo e alla loro ottimizzazione come candidati farmaci, tanto da far sorgere inizialmente qualche dubbio sulla "druggability" di questi enzimi. Tuttavia, attraverso innumerevoli sforzi della ricerca accademica ed industriale per risolvere il problema della selettività, è stato dimostrato che è possibile ottenere inibitori efficaci e selettivi delle PTP sfruttando la presenza di caratteristiche strutturali specifiche per ciascun enzima nelle regioni circostanti il sito catalitico. Infatti, la specificità di substrato delle PTP è determinata principalmente dalla presenza di

domini non catalitici o regolatori che si trovano nelle immediate adiacenze del dominio catalitico conservato. Queste regioni periferiche rappresentano ulteriori siti di interazione per i ligandi e si sono rivelate cruciali per la progettazione di inibitori dotati di elevata affinità e selettività [Zhang 2007, 2017].

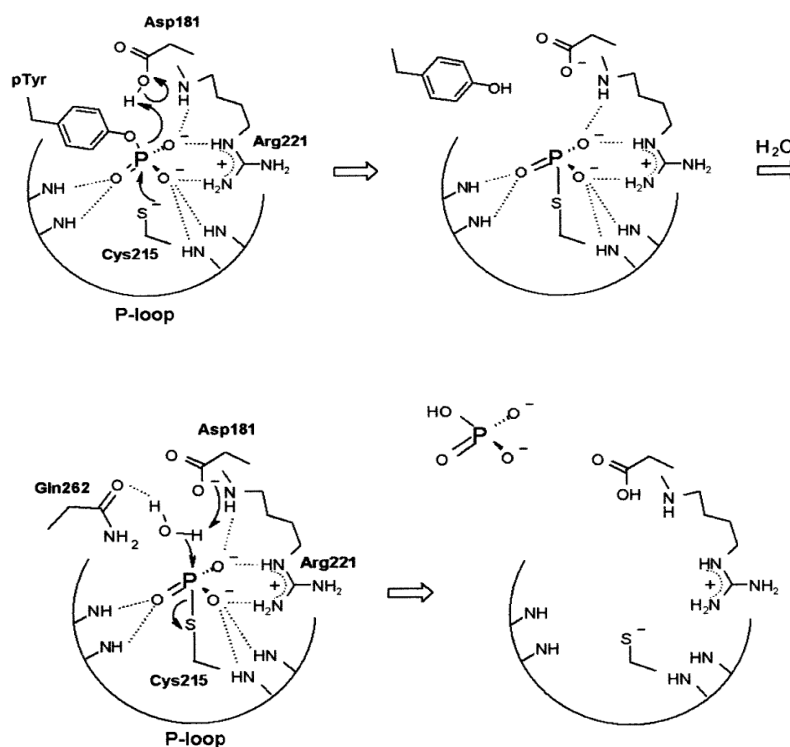


Figura 1.2 - Meccanismo di defosforilazione catalizzato dalla PTP1B, enzima prototipo della famiglia delle PTP [Barford 1994].

Partendo dal presupposto che il sito attivo delle PTP è carico positivamente e presenta requisiti strutturali adatti a legare efficacemente il gruppo fosfato della pTyr, la ricerca su questi enzimi è stata avviata con la progettazione e valutazione di inibitori che possiedono porzioni molecolari cariche negativamente, capaci di mimare il residuo di pTyr del substrato e di interagire con il residuo di arginina del sito catalitico (gruppi pTyr-mimetici). Questo aspetto strutturale dei primi inibitori di PTP studiati ha

determinato spesso profili farmacocinetici poco favorevoli, che hanno causato l'interruzione della sperimentazione per numerosi inibitori attivi, soprattutto se altamente ionizzati, come ad esempio i derivati fosfonici. Per migliorare la biodisponibilità degli inibitori delle PTP, negli anni successivi, si è cercato di ridurre il numero di cariche negative dell'inibitore, passando da derivati fosfonici e difluorometilfosfonici a derivati carbossilici e a molecole contenenti come gruppo pTyr-mimetico un eterociclo con carica negativa delocalizzata [Combs 2010].

Un altro metodo prevede l'inserimento di porzioni strutturali idrofobiche su appropriati scaffold molecolari, in modo da aumentare la lipofilia dei composti, pur mantenendo nella struttura gruppi pTyr-mimetici altamente ionizzati [Zhang 2007]. Queste diverse strategie di progettazione hanno dato origine a molecole con una porzione strutturale sufficientemente polare per poter interagire efficacemente con il sito attivo dell'enzima target e, allo stesso tempo, in grado di attraversare le membrane biologiche, permettendo così di individuare numerosi potenti inibitori delle PTP attivi in modelli animali o cellulari (Figura 1.3) [Zhang 2007, 2017; Combs 2010; Maccari 2012].

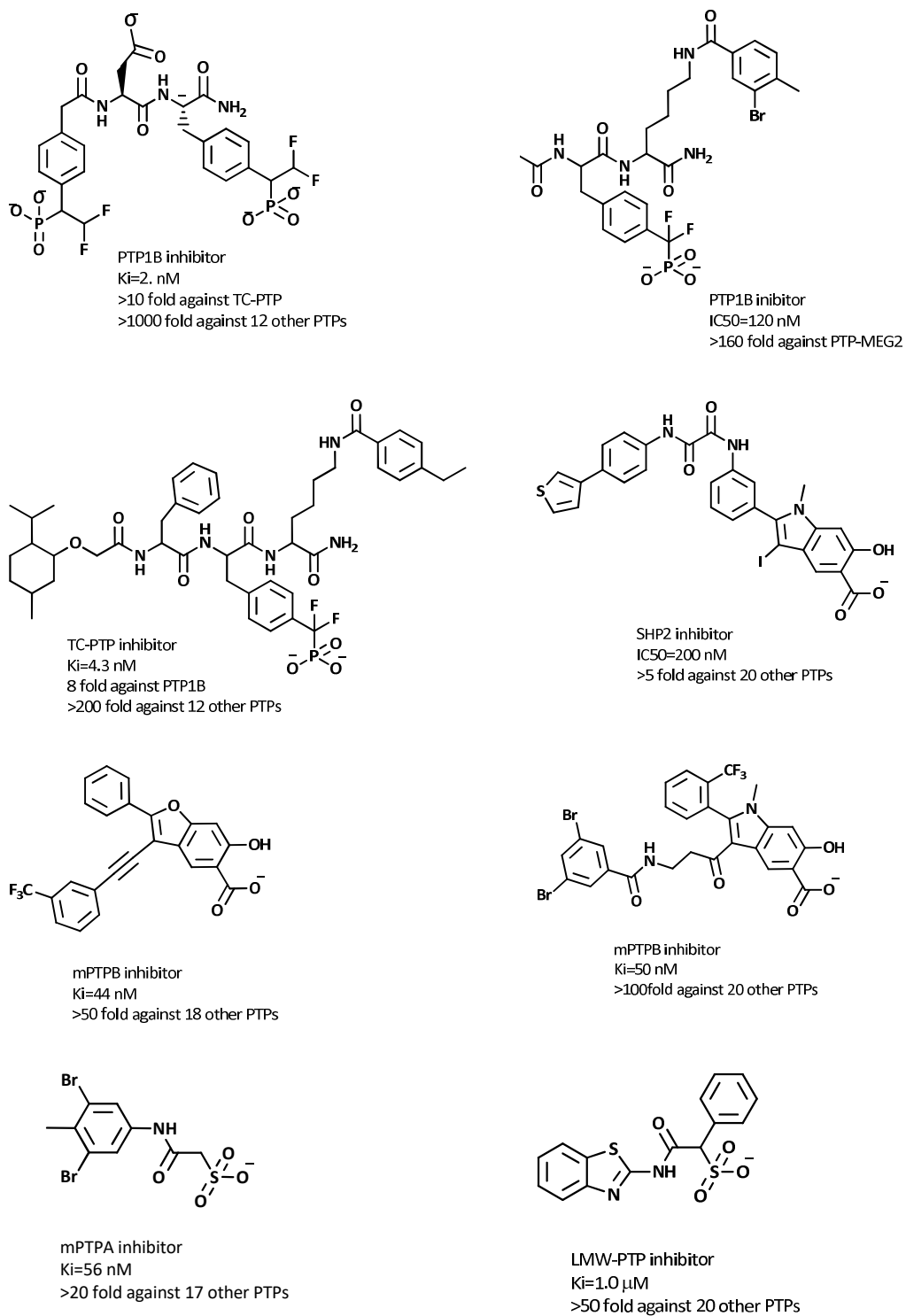


Figura 1.3 – Esempi rappresentativi di inibitori di PTP selettivi e bioattivi [Zhang 2017].

Per individuare inibitori delle PTP dotati di migliori proprietà drug-like, è anche possibile adottare strategie di drug design alternative rispetto alla progettazione di inibitori diretti al sito attivo. In particolare, la presenza di siti di legame allosterici permette di modulare l'attività delle PTP attraverso l'interazione con ligandi di natura diversa e, soprattutto, meno polari rispetto agli inibitori diretti al sito attivo. Gli inibitori allosterici, non dovendosi legare direttamente al sito catalitico della PTP, non richiedono infatti la presenza di gruppi carichi negativamente per legarsi in modo ottimale all'enzima e, quindi, possono potenzialmente mostrare migliore biodisponibilità rispetto alle molecole che si legano al sito attivo. Inoltre, i potenziali siti di legame allosterici rappresentano generalmente regioni meno conservate tra le diverse PTP e quindi offrono la possibilità di progettare ligandi selettivi che, interagendo con un sito distinto da quello catalitico, inducono variazioni conformazionali della proteina ed impediscono il legame al substrato e quindi l'attività catalitica enzimatica. Nell'ambito della ricerca per l'individuazione di inibitori delle PTP come potenziali farmaci, la progettazione di ligandi allosterici rappresenta una nuova frontiera ancora relativamente poco esplorata della ricerca.

Recentemente sono emersi altri possibili approcci per l'identificazione di nuovi potenziali farmaci attivi sulle PTP, attraverso il controllo dei meccanismi che regolano l'attività di questi enzimi. Tra i meccanismi di regolazione dell'attività delle PTP, uno dei principali consiste nell'ossidazione reversibile del residuo catalitico di cisteina. È stato dimostrato che l'interazione di recettori di membrana ad attività tirosin-chinasica con i loro specifici ligandi, come insulina e fattori di crescita, induce una rapida produzione intracellulare di H_2O_2 , che risulta essenziale per la segnalazione cellulare dipendente dalla fosforilazione della tirosina. Diverse evidenze suggeriscono che la H_2O_2 influenzi tali processi cellulari attraverso l'ossidazione del residuo catalitico di cisteina delle PTP ad acido sulfenico (Cys-SOH), che è incapace di effettuare la catalisi nucleofila nella reazione di defosforilazione (Figura 1.4) [Maccari 2012; Yu 2018]. L'ossidazione della cisteina indotta da H_2O_2 è transiente e reversibile e rappresenta quindi un meccanismo dinamico di regolazione dell'attività delle PTP. Inoltre, la H_2O_2 in vivo va incontro alla conversione spontanea o enzimatica in specie reattive

dell'ossigeno (ROS) capaci di mediare la rapida inattivazione della PTP in modo analogo. Per prevenire l'ossidazione irreversibile ad acido sulfinico (Cys-SO₂H) o sulfonico (Cys-SO₃H), l'acido sulfenico può formare addotti covalenti, come una sulfenilamide ciclica o un ponte disolfuro, con residui vicini del sito catalitico (Figura 1.4); successivamente, in seguito a reazioni di riduzione, generalmente mediate da sistemi glutatione-dipendenti, può essere ripristinato il residuo di cisteina. Di conseguenza è stato proposto che piccole molecole contenenti porzioni strutturali, come ad esempio l'1,3-dichetone, capaci di legarsi all'intermedio sulfenilamidico ciclico e di stabilizzarlo, potrebbero offrire un nuovo approccio per controllare l'attività delle PTP [Yu 2018].

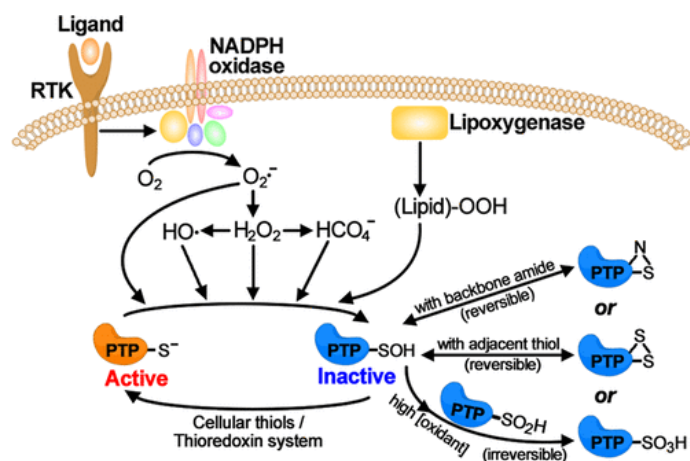


Figura 1.4 – Regolazione redox delle PTP [Yu 2018].

1.2 – LA PROTEIN TIROSINA FOSFATASI 1B (PTP1B), ENZIMA CHIAVE NELLA REGOLAZIONE DELLA SEGNALEZIONE DI INSULINA E LEPTINA

La protein tirosina fosfatasi 1B (PTP1B) è considerato l'enzima prototipo della famiglia delle PTP. E' stata infatti la prima PTP ad essere purificata e caratterizzata ed è finora la più studiata [Tonks 1988; Barford 1994].

La scoperta del fondamentale ruolo svolto dalla PTP1B nella regolazione della segnalazione cellulare dell'insulina ha stimolato enormemente l'interesse dei

ricercatori nei confronti di questo enzima, e successivamente anche verso altri membri della famiglia delle PTP, e ha portato, attraverso un notevole numero di evidenze scientifiche, alla validazione della PTP1B come attraente bersaglio molecolare per la ricerca di nuovi farmaci antidiabetici ed antiobesità [Bialy 2005; Koren 2007; Blaskovich 2009; Combs 2010; Vintonyak 2011; Zhang 2017].

La PTP1B è un enzima intracellulare, localizzato sul reticolo endoplasmatico, appartenente alla classe I delle PTP "cysteine-based" [Alonso 2004]. Svolge diverse funzioni coinvolte principalmente nel metabolismo, nell'omeostasi energetica e nella proliferazione cellulare. Sono noti infatti diversi substrati di questa fosfatasi, che includono PTK di tipo recettoriale, come l'EGFR (epidermal growth factor receptor), il PGFR (platelet-derived growth factor receptor) e il recettore dell'insulina (RI). Tra i substrati dell'enzima si annoverano anche PTK non recettoriali, come le proteine substrato del RI (IRS-1, IRS-2) e le chinasi Src e JAK2.

Ruoli fisiologici cruciali della PTP1B riguardano il controllo della segnalazione degli ormoni insulina e leptina (Figura 1.5).

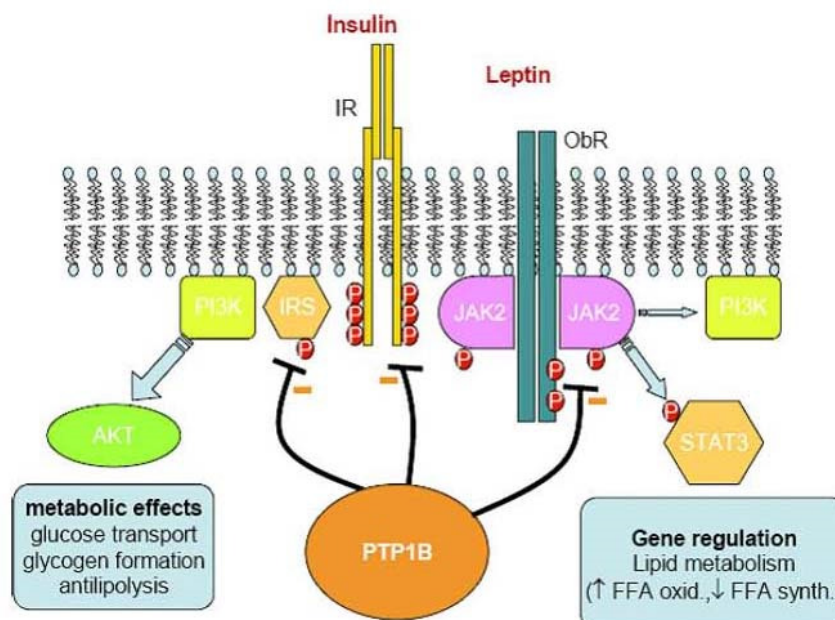


Figura 1.5 - La regolazione dei recettori dell'insulina e della leptina da parte della PTP1B [Nichols 2006].

L'insulina è un ormone ipoglicemizzante con un ruolo fondamentale nell'omeostasi glucidica e nel metabolismo cellulare. Il suo recettore RI è costituito da una proteina eterotetramerica transmembrana, composta da due subunità α extracellulari, che contengono il sito di legame per l'insulina, e da due subunità β transmembrana che possiedono attività tirosin-chinasica intrinseca. Il legame dell'ormone alle subunità α del RI induce una rapida autofosforilazione del recettore su specifici residui tirosinici (Tyr1158, Tyr1162 e Tyr1163) localizzati nelle subunità β . L'autofosforilazione del recettore indotta dall'ormone è necessaria per la sua attivazione ed innesca una cascata di eventi che comportano la fosforilazione di ulteriori residui di tirosina dello stesso RI (come Tyr960, Tyr1316, Tyr1322) e di una serie di altre proteine, di cui quattro appartengono alla famiglia delle proteine substrato del RI (IRS1-4). I residui di pTyr di questi substrati fungono da siti di legame per una serie di altre proteine che contengono domini SH2 (Src-homology-2), molte delle quali attivano a loro volta piccole proteine G o hanno attività enzimatica, come la fosfotirosin fosfatasi SHP2 e la fosfatidilinositol-3-chinasi (PI3K). All'attivazione della PI3K segue una serie di eventi cellulari diversi, che coinvolgono la fosforilazione di vari substrati ed enzimi, tra cui la serina/treonina chinasi Akt [Saltiel 2001]. Il risultato finale è l'attivazione e/o la traslocazione di trasportatori del glucosio verso la membrana cellulare, permettendo così l'uptake del glucosio stesso nei tessuti bersaglio, ed inoltre l'espressione di specifici geni, la mitogenesi e l'attivazione di enzimi coinvolti nella glicogenosintesi e in reazioni anaboliche, come la sintesi proteica (Figura 1.6) [Saltiel 2001; Van Huijsduijnen 2002].

La PTP1B agisce da regolatore negativo della segnalazione dell'insulina, attraverso la defosforilazione di specifici residui di pTyr nel dominio intracellulare di RI e delle proteine substrato IRS-1 e IRS-2, con conseguente disattivazione del recettore stesso e interruzione della cascata di segnali dell'ormone (Figure 1.6).

Altre PTP che risultano coinvolte come regolatori negativi nel controllo della segnalazione insulinica, generalmente con azioni coordinate e complementari alla PTP1B e con specificità tissutali diverse, sono la LMW-PTP e la TC-PTP (Figura 1.7) [Maccari 2012; Zhang 2017].

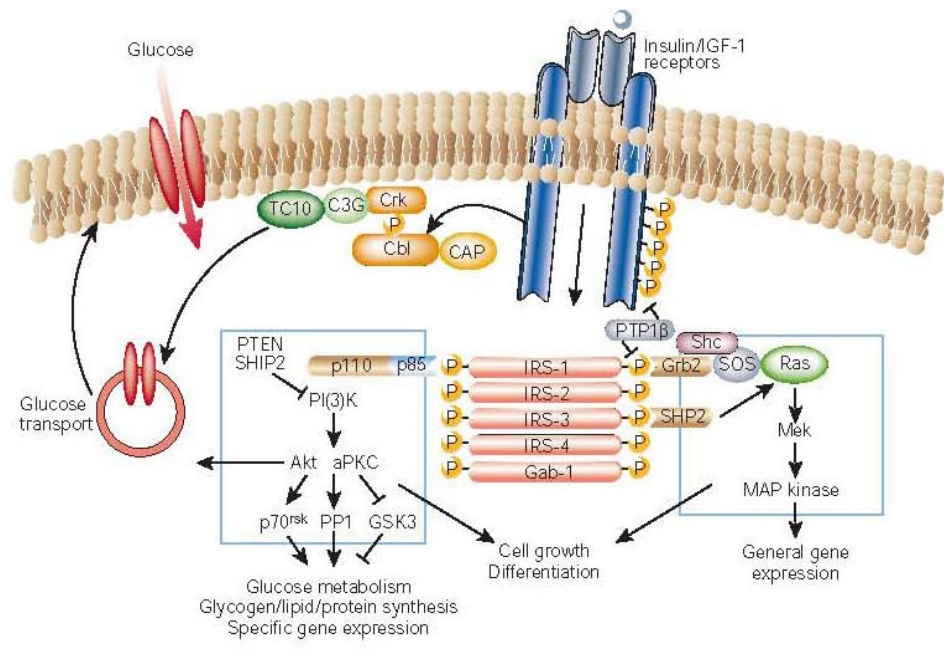


Figura 1.6 – Vie di segnalazione dell’insulina [Saltiel 2001].

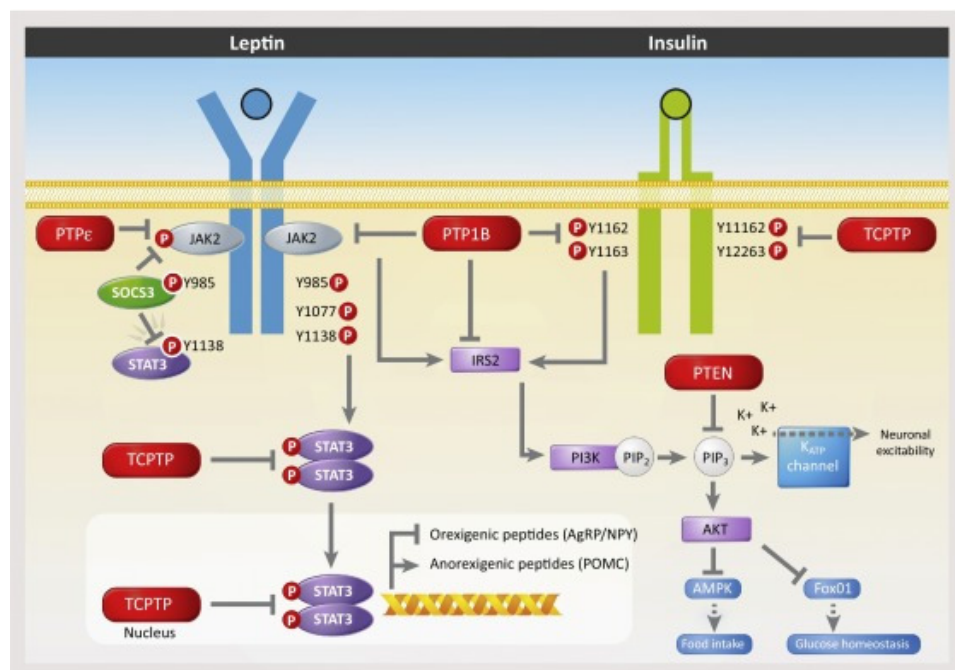


Figura 1.7 – Regolazione delle vie di segnalazione di leptina ed insulina da parte di diverse PTP [Zhang 2015].

La leptina viene prodotta dagli adipociti (tessuto adiposo bianco) ed è definita anche “ormone anti-obesità”, in quanto la sua interazione con recettori specifici nell’ipotalamo (Ob-Rb) induce una ridotta assunzione di cibo, stimola il consumo energetico e determina una riduzione della secrezione di insulina e di cortisolo. La delezione selettiva dei recettori per la leptina a livello neuronale determina obesità e steatosi epatica in modelli animali [Cheng 2002; Zabolotny 2002].

In seguito al legame della leptina ai suoi recettori ipotalamici Ob-Rb, viene attivata la Janus tirosina chinasi 2 (JAK2) che, una volta fosforilata, catalizza la fosforilazione di specifici residui di tirosina del recettore leptinico (Tyr985, Tyr1077, Tyr1138). Questi residui di pTyr rappresentano dei siti di legame per molecole di segnalazione intracellulare, come la proteina STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). La STAT3 viene reclutata attraverso il legame al residuo di pTyr1138 del recettore Ob-Rb attivato e viene a sua volta fosforilata dalla JAK2 sul residuo Tyr705. A questo punto, la STAT3 si dissocia dal recettore, dimerizza e migra nel nucleo dove agisce da promotore della trascrizione di specifici geni coinvolti nel metabolismo energetico. (Figura 1.7) [Johnson 2002; Correia 2007; Zhang 2015; Thon 2016]. Gli effetti della leptina sul bilancio energetico e sul metabolismo sono mediati anche dall’attivazione della AMPK (protein chinasi AMP-attivata) [Zhang 2015].

La PTP1B controlla la segnalazione della leptina attraverso la defosforilazione e conseguente inattivazione della JAK2, che causa l’interruzione del segnale dell’ormone (Figura 1.7). [Salmeen 2000; Zabolotny 2002]. La segnalazione della leptina viene attenuata anche dal SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), che esercita un controllo negativo sull’attivazione di STAT3, legandosi alla JAK2 e sopprimendo la sua attività tirosin-chinasica. La sovraespressione di SOCS3 nei neuroni ipotalamici che esprimono proopiomelanocortina (POMC) conduce ad iperfagia ed obesità, mentre la sua delezione nell’ipotalamo aumenta la sensibilità alla leptina, riduce l’appetito e previene l’obesità indotta alla dieta [Thon 2016].

Sebbene insulina e leptina siano mediatori di distinte vie di segnalazione, attivando rispettivamente le vie PI3K/Akt e JAK2/STAT3 descritte sopra, entrambi gli ormoni

svolgono ruoli fondamentali a livello cerebrale, soprattutto nei neuroni ipotalamici, come regolatori dell'omeostasi energetica e glucidica e dell'eccitabilità neuronale.

La distruzione dei recettori RI nel cervello dei topi causa insulino-resistenza, iperleptinemia e obesità, evidenziando un ruolo chiave dell'insulina nei meccanismi centrali di controllo dell'assunzione di cibo. Infatti sia i recettori ipotalamici dell'insulina sia quelli della leptina mediano effetti anoressigeni, sopprimendo l'attività dei neuroni oressigeni NPY/AgRP e stimolando i neuroni anoressigeni POMC situati nel nucleo arcuato (ARC) dell'ipotalamo (Figura 1.8). Da qui, il segnale insulinico viene propagato al resto del cervello attraverso le proiezioni dei neuroni AgRP e POMC verso altri nuclei dell'ipotalamo e dell'amigdala, attraverso i quali l'insulina svolge molte delle sue azioni cerebrali, regolando l'assunzione di cibo ed esercitando un controllo sulla sensibilità all'insulina stessa dei tessuti periferici, come tessuto adiposo bianco e bruno, pancreas, muscolo e fegato [Zhang 2015;Thon 2016].

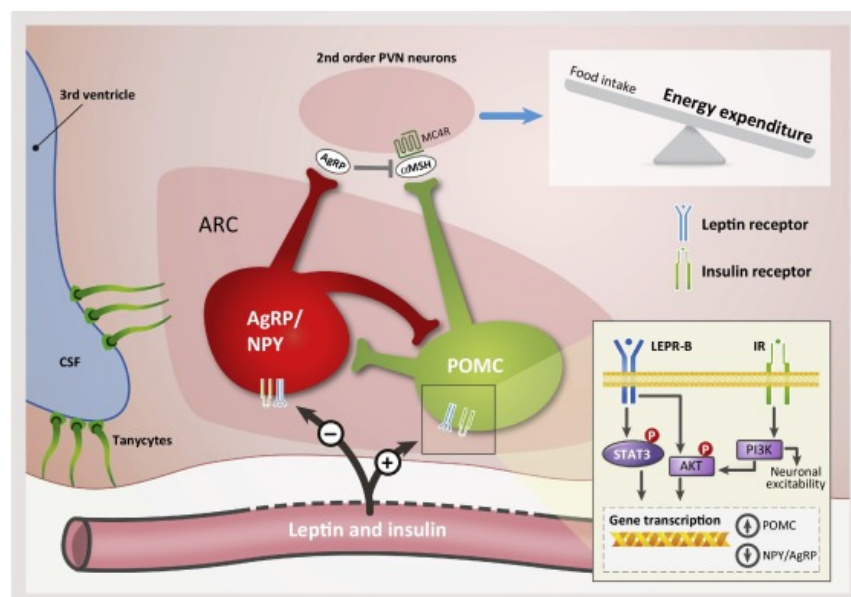


Figura 1.8 – Segnalazione insulinica e leptinica nel nucleo arcuato dell'ipotalamo [Zhang 2015].

È stato dimostrato inequivocabilmente che la segnalazione centrale mediata dall'insulina e inviata ai tessuti periferici ha un ruolo cruciale nell'omeostasi glucidica

ed energetica (Figura 1.9) [Zhang 2015; Thon 2016]. Viceversa, lo sviluppo di insulino-resistenza in tessuti periferici contribuisce a ridurre la sensibilità all'ormone anche a livello cerebrale, attraverso la produzione di lipidi tossici che promuovono la neurodegenerazione. Nell'obesità, la barriera emato-encefalica è meno permeabile e l'accesso sia dell'insulina che della leptina al SNC è ridotto; inoltre si verificano reazioni di tipo infiammatorio che riducono la sensibilità all'insulina dei neuroni ipotalamici dell'ARC e, di conseguenza, anche i segnali inviati ai tessuti periferici, favorendo lo sviluppo dell'insulino-resistenza a livello sia centrale che periferico (Figura 1.9) [Dodd 2010, 2017].

Le condizioni di insulino- e leptino-resistenza mostrano strette correlazioni che possono spiegare, almeno in parte, la frequente comparsa del diabete di tipo 2 (DM2) in pazienti obesi e lo sviluppo di patologie correlate che rientrano nella cosiddetta "sindrome metabolica" [Sivitz 1997; Emilsson 1997; Zhao 2000; Sainz 2015]. Infatti, la leptino-resistenza, condizione che si osserva spesso nell'obesità indotta dalla dieta, può contribuire alla riduzione della sensibilità tissutale all'insulina, favorendo così la comparsa del DM2 e, viceversa, l'insulino-resistenza altera la segnalazione leptinica nell'ipotalamo. Quindi insulina e leptina agiscono in sinergia a livello cerebrale e il controllo reciproco dei due ormoni risulta cruciale per la complessa omeostasi energetica dell'intero organismo [Thon 2016].

Studi recenti sulle funzioni svolte dall'insulina a livello cerebrale hanno dimostrato un ruolo fondamentale dell'ormone anche nella sopravvivenza neuronale, nella plasticità sinaptica e nei processi della memoria ed è stata messa in luce una diretta implicazione dell'insulino-resistenza nella patogenesi di malattie neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer (AD) [de la Monte 2009; McNay 2010; Bosco 2011; Apostolatos 2012].

Sebbene i livelli di espressione più elevati del RI siano stati evidenziati nell'ARC dell'ipotalamo, tali recettori sono presenti anche nell'ippocampo, nelle aree olfattive, nelle regioni limbiche, nella neocorteccia, indicando che l'insulina esplica un'ampia azione neuromodulatoria a livello cerebrale [Marks 1990].

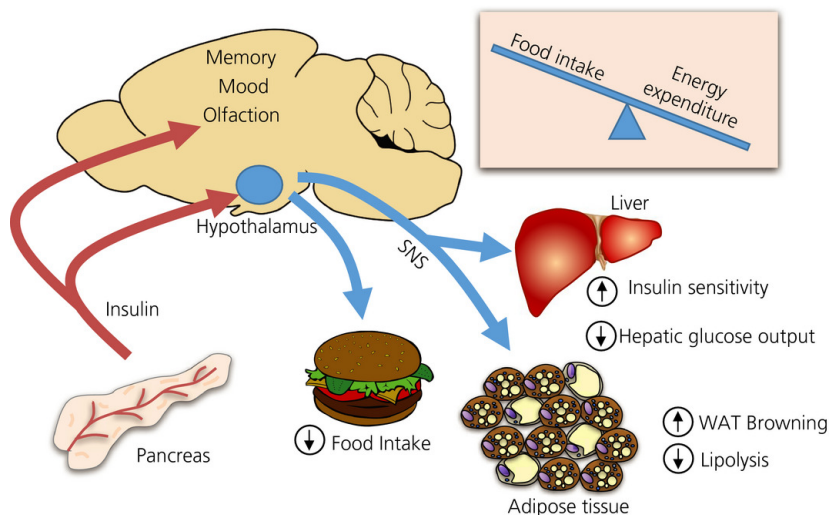


Figura 1.9 – Effetti fisiologici dell’azione dell’insulina a livello cerebrale [Dodd 2017].

È stata accertata una correlazione epidemiologica tra AD e DM2 ed è stato verificato che ciascuna delle due malattie determina un aumentato rischio di contrarre l’altra [Vieira 2017]. Sulla base di questi studi, l’AD è stato descritto come “diabete di tipo 3”, evidenziando il fatto che questa patologia, dalla eziogenesi complessa e multifattoriale, potrebbe essere considerata principalmente come una malattia metabolica, caratterizzata dalla progressiva perdita della capacità dei tessuti cerebrali di rispondere adeguatamente allo stimolo dell’insulina, con conseguente decadimento cognitivo. E’ stato quindi suggerito che l’elevata incidenza di patologie caratterizzate da insulino-resistenza, come DM2, obesità e sindrome metabolica, possa rappresentare un importante fattore di rischio in grado di contribuire significativamente alla crescita dei casi di AD a cui si assiste attualmente.

La PTP1B, svolgendo un ruolo di regolatore negativo della segnalazione insulinica e leptinica, è implicata in maniera determinante nei meccanismi attraverso i quali si sviluppano le patologie correlate ad una ridotta risposta dei tessuti target ai due ormoni.

E’ stato ampiamente dimostrato che esiste una stretta correlazione tra il malfunzionamento della PTP1B, o mutazioni a livello del gene umano PTPN1 che la codifica, e l’insorgenza sia dell’insulino-resistenza che della leptino-resistenza. Ciò si

verifica sia nei tessuti periferici bersaglio dell'insulina, come muscolo scheletrico, tessuto adiposo e fegato, sia a livello del sistema nervoso centrale, principalmente nei neuroni dell'ARC e dell'ipotalamo [Bence 2006; Nieto-Vazquez 2007; Delibegovic 2007, 2009].

Si è osservato che, nell'AD, l'aumentata attività della PTP1B è associata con una ridotta segnalazione insulinica e leptinica neuronale [Dodd 2017; Vieira 2017]. Inoltre, la PTP1B risulta sovraregolata in presenza di stress del reticolo endoplasmatico (ER), che costituisce un importante meccanismo tossico nel processo di neurodegenerazione [Vieira 2017; Jeon 2017].

Lo stress dell'ER viene attivato nei neuroni, attraverso un meccanismo che coinvolge l'attivazione del recettore del TNF- α , in risposta alla produzione degli oligomeri β -amiloidi, responsabili delle alterazioni sinaptiche e cognitive tipiche dell'AD. Nel decadimento cognitivo dell'AD risultano implicate le microglia, che sono le principali fonti di citochine pro-infiammatorie e neurotossiche, come TNF- α e IL-1 β ; ciò determina una condizione di neuroinfiammazione cronica che costituisce un aspetto patogenetico importante della malattia [Song 2016; Viera 2017; Jeon 2017]. La capacità del TNF- α di attivare lo stress dell'ER risulta correlata anche all'insulino-resistenza periferica presente nel DM2 e nell'obesità [Viera 2017].

La PTP1B, che è localizzata principalmente sulla superficie citoplasmatica dell'ER, è in grado di mediare i segnali di stress dell'ER [Vieira 2017]. L'enzima è regolato da segnali pro-infiammatori ed è altamente espresso nelle microglia dell'ippocampo nell'AD. È stato dimostrato che la trascrizione della PTP1B può essere indotta dal TNF- α attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare κ B, per cui l'infiammazione è un processo che può rivelarsi cruciale nel determinare la sovraespressione dell'enzima [Zabolotny 2008; Ito 2012].

In accordo a ciò, nei soggetti obesi o diabetici, elevati livelli di TNF- α e di altri mediatori pro-infiammatori sono riscontrati in diversi tessuti target di insulina e leptina, come fegato, muscolo, tessuto adiposo e ipotalamo [Zabolotny 2008; Ito 2012; MohammadTaghvaei 2012]. La delezione o la carenza di PTP1B negli adipociti favorisce

la loro differenziazione in adipociti bruni, che risultano più sensibili all'azione dell'insulina e protetti dall'apoptosi indotta dal TNF- α [Miranda 2010].

L'infiammazione, che è una condizione cronica presente sia nel DM2 che nell'obesità [Schmidt 2005; Meshkani 2009], appare quindi come un meccanismo "unificante" che, inducendo la sovraespressione della PTP1B in numerosi tessuti sia periferici che centrali, ha un ruolo critico nello sviluppo di insulino- e leptino-resistenza e può rappresentare una connessione causale tra obesità, diabete e neurodegenerazione.

L'infiammazione è un evento caratteristico anche nel processo di carcinogenesi ed è stato suggerito che l'associazione tra infiammazione e sovraespressione della PTP1B possa essere un evento determinante per lo sviluppo non solo di malattie metaboliche e neurodegenerative, ma anche del cancro [Zabolotny 2008].

La complessa etiopatogenesi dei tumori può essere ricondotta principalmente a errori o alterazioni della segnalazione cellulare. Considerando l'importanza cruciale che la fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine riveste nei processi di trasduzione intracellulare del segnale e, inoltre, partendo dall'osservazione che un'elevata attività di specifiche protein chinasi è presente in molti tipi di tumori umani, negli ultimi venti anni sono stati sviluppati numerosi inibitori di PTK, di cui circa trenta sono attualmente impiegati nella terapia antitumorale. Visto che le PTK possono funzionare come oncoproteine, per diversi anni è sembrato logico assumere che le PTP fossero in grado di opporsi alle trasformazioni oncogeniche promosse dalle PTK e potessero fungere da soppressori della crescita e della diffusione dei tumori. Tuttavia, più di recente, è stato riconosciuto e ampiamente dimostrato il ruolo oncogenico di almeno 19 diverse PTP, che sono in grado di promuovere e sostenere proliferazione, sopravvivenza, migrazione, invasività di diversi fenotipi neoplastici e di favorire l'angiogenesi tumorale [Lazo 2018].

In questo ambito, numerosi studi hanno riguardato la PTP1B, che ha dimostrato di poter agire come oncosoppressore o come proteina oncogenica, in base al diverso contesto cellulare [Lazo 2018; Sastry 2011]. La PTP1B, giocando un ruolo nella regolazione delle vie di segnalazione di fattori di crescita e citochine, ha delle proprietà

oncogeniche intrinseche [Lazo 2018; Blaskovich 2009]. In particolare, la sovraespressione della PTP1B è stata rilevata in diversi stadi di sviluppo di carcinoma mammario, sia HER2-dipendente che spontaneo, suggerendo che essa può rappresentare sia un evento patogenetico precoce sia una condizione in grado di sostenere e favorire la crescita e la diffusione di queste forme tumorali [Lazo 2018]. Infatti, è stato dimostrato che la sovraespressione di PTP1B nella ghiandola mammaria favorisce lo sviluppo del cancro al seno, confermando che tale fosfatasi può agire come un vero e proprio oncogeno. Inoltre, la sovraespressione della PTP1B risulta associata ad una maggiore invasività delle cellule tumorali [Lessard 2010].

E' stata evidenziata una correlazione tra l'aumentata espressione della PTP1B e quella dell'oncogene ErbB-2, in carcinomi sia mammari che ovarici, facendo supporre che vi sia una loro collaborazione nella oncogenesi [Lessard 2010]. In accordo a ciò, è stato dimostrato che, in topi con cancro al seno indotto dall'attivazione di ErbB-2, una carenza di PTP1B ritarda la progressione del tumore e protegge contro le metastasi al polmone [Julien 2007; Bentires-Alj 2007]. Quindi la PTP1B sembra svolgere un ruolo selettivo come modulatore positivo della segnalazione oncogenica indotta da ErbB-2.

Il complesso ruolo della PTP1B nella tumorigenesi (Figura 1.10) presenta comunque degli aspetti ancora da chiarire, come ad esempio il ruolo svolto dall'enzima in altri tipi di cancro o in relazione a differenti oncogeni. Inoltre, un quesito ancora aperto nasce dalla dimostrazione che i livelli di insulina e lo sviluppo del carcinoma mammario sono correlati, cioè rimane da determinare se e quanto gli effetti antitumorali conseguenti alla inibizione o soppressione della PTP1B siano correlati all'azione di regolazione della segnalazione insulinica [Yip 2010]. L'inibizione della PTP1B, promuovendo la segnalazione insulinica, determina di conseguenza una riduzione dei livelli insulinemici e ciò potrebbe contrastare la crescita tumorale.

La capacità della PTP1B di sopprimere l'attivazione di diverse tirosin-chinasi di tipo recettoriale la cui attività è correlata all'oncogenesi, tra cui l'EGFR, ha supportato l'ipotesi che questa fosfatasi possa fungere da oncosoppressore. Tuttavia, in contrasto con queste osservazioni, la delezione dell'enzima nei modelli animali PTP1B-knockout

non induce lo sviluppo di tumori. Sembra quindi poco probabile che la prolungata somministrazione di inibitori della PTP1B nel diabete o nell'obesità possa causare una maggiore incidenza di tumori [Lessard 2010].

E' possibile che la PTP1B sia regolata in modo differenziale, o attraverso la compartimentazione in distinti siti subcellulari o attraverso modificazioni post-traslazionali. Ad esempio, la PTP1B può rimanere associata al reticolo endoplasmatico, a cui normalmente è legata, oppure può essere liberata da vari fattori, tra cui la proteasi Ca^{++} -dipendente calpaina, per svolgere le sua attività catalitica su substrati presenti nel citosol o nella membrana citoplasmatica [Sastry 2011].

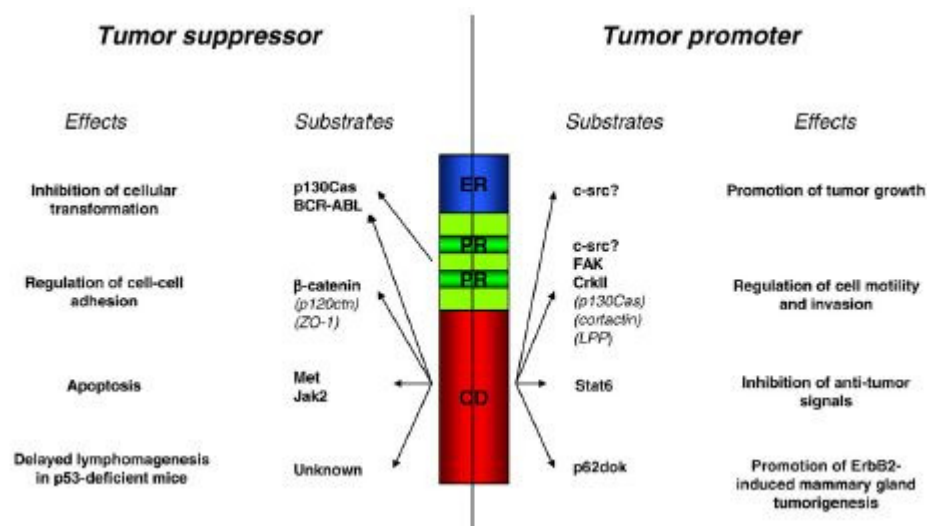


Figura 1.10– Coinvolgimento della PTP1B nella oncogenesi [Lessard 2010].

Sulla base della stretta relazione che è stata dimostrata tra la sovraespressione della PTP1B e alterazioni di vie di segnalazione cellulare implicate nell'eziopatogenesi di differenti gravi malattie correlate all'insulino-resistenza, come diabete, obesità, cancro e malattie neurodegenerative, l'inibizione di questa fosfatasi è emersa come

un'attraente strategia per la progettazione di nuovi farmaci per il trattamento di tali patologie.

E' stato evidenziato da studi indipendenti condotti su topi PTP1B-knockout che, in assenza della PTP1B, aumenta la sensibilità all'insulina e la resistenza all'obesità indotta dalla dieta e, inoltre, non si riscontra alcuna anomalia nella crescita o in altre funzioni vitali [Elchebly 1999; Klamann 2000]. In seguito alla delezione del gene che codifica l'enzima, gli effetti conseguenti all'aumento dei livelli di fosforilazione dell'IR si osservano principalmente nei tessuti muscolare ed epatico. I topi PTP1B-knockout possiedono anche una maggiore sensibilità alla leptina, associata alla maggiore fosforilazione di JAK2 e all'incrementata segnalazione attraverso tale via; ciò spiega la resistenza all'obesità indotta dalla dieta che è stata osservata in questi animali [Nichols 2006; Gurzov 2015]. E' ormai accertato, infatti, che l'inibizione della PTP1B migliora la condizione di leptino-resistenza associata all'obesità e previene l'aumento di peso indotto dalla dieta [Zabolotny 2002; Delibegovic 2009].

Studi clinici condotti con l'impiego di oligonucleotidi antisenso, hanno confermato che la repressione della sintesi della PTP1B migliora i parametri glicemici, senza indurre ipoglicemia, contrasta la condizione di insulino-resistenza e leptino-resistenza e determina riduzione del peso corporeo [Di Paola 2002; Liu 2004; Digenio 2018].

Tra i numerosi inibitori della PTP1B individuati negli ultimi due decenni, la trodusquemina (Figura 1.11), un aminosterolo naturale attivo come inibitore allosterico dell'enzima, è stata avviata ai trials clinici di fase 2 come promettente agente antidiabetico ed antiobesità. La trodusquemina inibisce la PTP1B sia a livello centrale, in particolare nell'ipotalamo, sia nei tessuti periferici, e la sua azione determina il miglioramento della segnalazione dell'insulina e della leptina e quindi l'attenuazione dell'insulino- e leptino-resistenza; tali effetti sono accompagnati dalla riduzione dei livelli plasmatici di entrambi gli ormoni, come conseguenza della migliore risposta cellulare ai loro segnali [Lantz 2010; Zhang 2015]. Questo inibitore della PTP1B si è mostrato anche in grado di contrastare la crescita di tumori mammari, in modelli animali, ed è stato anche proposto per trattamenti rigenerativi dopo infarto del miocardio [Lazo 2018].

Recenti studi hanno evidenziato gli effetti antidiabetici ed antiobesità prodotti anche da altri inibitori allosterici della PTP1B che, in modelli animali con obesità indotta dalla dieta, sono in grado di migliorare la segnalazione di insulina e leptina [Krishnan 2018]. Questi studi hanno fornito ulteriori risultati che confermano la validità dell'inibizione della PTP1B come strategia per il trattamento terapeutico di patologie caratterizzate da insulino- e/o leptino-resistenza.

La conferma che l'identificazione di inibitori allosterici della PTP1B è in grado di offrire nuove prospettive per lo sviluppo di farmaci diretti al controllo di questo enzima ha fornito un nuovo impulso alla ricerca focalizzata su questa e su altre PTP come targets di nuovi farmaci, contribuendo ad affermare la "druggability" di tali enzimi.

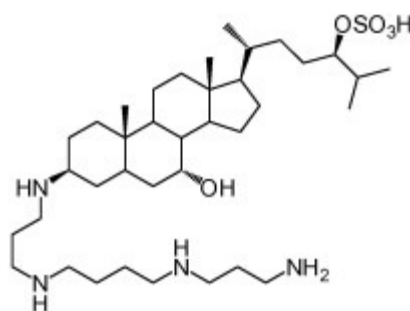


Figura 1.11 – Struttura della trodusquemina

1.3 - STRUTTURA DELLA PTP1B

La struttura della PTP1B, sia come enzima libero che come complesso co-cristallizzato con diversi ligandi, è stata ampiamente studiata attraverso l'impiego della cristallografia a raggi X [Barford 1994; Puius 1997; Scapin 2003].

La PTP1B presenta un dominio catalitico N-terminale, due motivi ricchi di prolina e una regione idrofobica C-terminale. Il dominio catalitico N-terminale è composto da un singolo dominio α/β , organizzato attorno a foglietti β avvolti. Nel dominio catalitico dell'enzima, alla base di una profonda fessura, è localizzato il sito di ricognizione del

fosfato (P-loop, His214-Ser222) che contiene il cosiddetto “PTP signature motif” (I/V)HCXAGXGR(S/T); in questa sequenza sono presenti gli aminoacidi conservati comuni alle altre PTP “cysteine-based”, tra cui il residuo di Cys215 coinvolto nel meccanismo di defosforilazione della pTyr del substrato, descritto nel paragrafo 1.1.

I bordi della fessura alla cui base si trova il P-loop sono formati da tre motivi principali: il loop WPD (Thr177-Pro185); il loop Q, contenente la Gln262 che partecipa al meccanismo di defosforilazione; il loop di ricognizione della pTyr (YRD loop), che contribuisce alla specificità per i residui fosfotirosinici ed è coinvolto nel legame con il substrato, in quanto contiene sia un residuo di Tyr46, che favorisce il legame alla pTyr del substrato attraverso interazioni π - π , sia l'Asp48 che stabilizza il complesso con il substrato attraverso legami a idrogeno (Figura 1.12) [Johnson 2002; Scapin 2003, Nichols 2006].

Il loop WPD è una regione flessibile che assume una conformazione “aperta” in assenza di substrato. Il legame del substrato alla Cys215 della PTP1B è accompagnato da una variazione conformazionale del loop WPD che porta quest'ultimo a ripiegarsi sulla catena laterale del residuo di pTyr, per creare una tasca di ricognizione; in questo modo, l'Asp181 del loop WPD si trova in posizione ottimale per agire come acido nel primo step della catalisi. In questo tipico meccanismo di “induced fit”, l'enzima assume dunque la forma cataliticamente attiva in seguito al cambiamento conformazionale indotto dal substrato [Nichols 2006]. Gli inibitori che riducono la mobilità del loop WPD possono impedire il legame della PTP1B al substrato e/o ostacolare l'attività catalitica, bloccando l'enzima nella sua conformazione inattiva. Inoltre, molecole progettate per legare la PTP1B nella conformazione “chiusa” del loop WPD, corrispondente a quella legata al substrato, sono generalmente inibitori più potenti di quelli progettati per legare la PTP1B con il loop WPD nella conformazione aperta [Koren 2007].

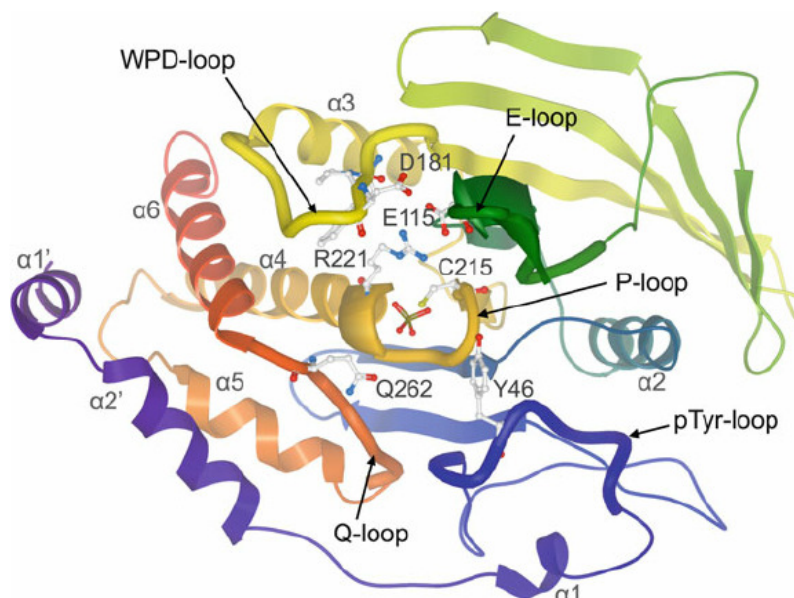


Figura 1.12 – Struttura della PTP1B (PDB ID: 2HNQ).

Il residuo di pTyr del substrato si situa all'estremità N-terminale dell'elica $\alpha 4$ (Figura 1.12); gli atomi di O del gruppo fosfato formano una serie di legami ad idrogeno con il residuo di Arg221 e con atomi di idrogeno dei gruppi amidici dello scheletro, mentre il sistema aromatico interagisce con Phe182 e Tyr46.

Anche il loop E (Figura 1.12), che contiene un residuo di Glu115, assume conformazioni diverse nella forma aperta inattiva e nella forma chiusa attiva della PTP1B: nella conformazione inattiva dell'enzima, il residuo di Glu115 si trova vicino all'Arg221 del P-loop e ne neutralizza la carica, mentre nella conformazione attiva il ripiegamento del WPD loop verso il substrato sposta il loop E, allontanandolo dal loop catalitico e permettendo all'Arg221 di formare legami a H con la pTyr del substrato.

Il sito attivo della PTP1B presenta un'elevata plasticità, cosicché possono alloggiarvi vari arilfosfati con strutture diverse. Un singolo residuo di pTyr non ha elevata affinità per l'enzima e i residui aminoacidici che lo affiancano contribuiscono ad una efficiente ricognizione del substrato [Zhang 2017]. L'interazione con i sottositi che si trovano in prossimità della cavità catalitica migliora quindi l'affinità per il substrato; inoltre, queste regioni possono essere coinvolte nel legame con gli inibitori e ne possono modulare la selettività.

I residui Tyr20, Arg24, Ala27, Phe52, Arg254, Met258, Gly259 delimitano un sito secondario di legame per l'arilfosfato, non catalitico e dotato di minore affinità rispetto al P-loop, che contribuisce alla ricognizione del substrato e al legame di quest'ultimo con l'enzima (Figura 1.13). La presenza di questa tasca secondaria, assente in altre PTP correlate, costituisce una caratteristica strutturale peculiare, che è stata sfruttata con successo per la progettazione di inibitori selettivi della PTP1B [Puius 1997; Nichols 2006]. Sono stati infatti studiati numerosi inibitori bidentati, progettati in modo da essere dotati di una porzione pTyr-mimetica, capace di interagire con il sito catalitico dell'enzima, e di una porzione con caratteristiche strutturali adatte per interagire efficacemente con la tasca secondaria di legame per l'arilfosfato non catalitica. L'opportuna combinazione di queste porzioni strutturali ha permesso di individuare numerosi inibitori della PTP1B caratterizzati da elevata potenza e selettività [Scapin 2003; Bialy 2005; Combs 2010].

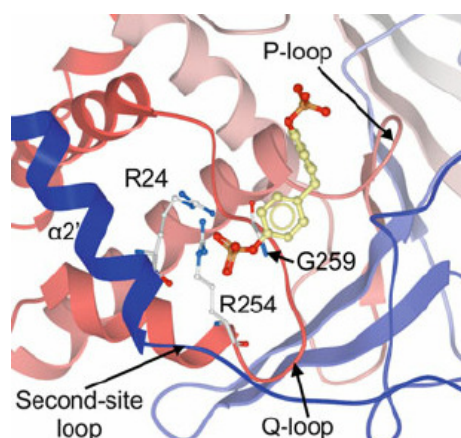


Figura 1.13 – Sito secondario di legame per l'arilfosfato, non catalitico, presente nella struttura della PTP1B.

L'analisi cristallografica a raggi X di complessi della PTP1B con alcuni inibitori non competitivi ha permesso di individuare una regione localizzata a circa 20 Å dalla tasca catalitica, tra le eliche α_3 e α_6 , con una cavità idrofobica delimitata da Leu192, Phe196 e Phe280 (Figure 1.14 e 1.15). Questi residui, che sono risultati essenziali per il legame degli inibitori a questo sito, non sono conservati in altre PTP, come LAR e TC-PTP, e ciò

influisce favorevolmente sulla selettività d'azione nei confronti della PTP1B [Liljebris 2002; Wiesmann 2004; Li 2014].

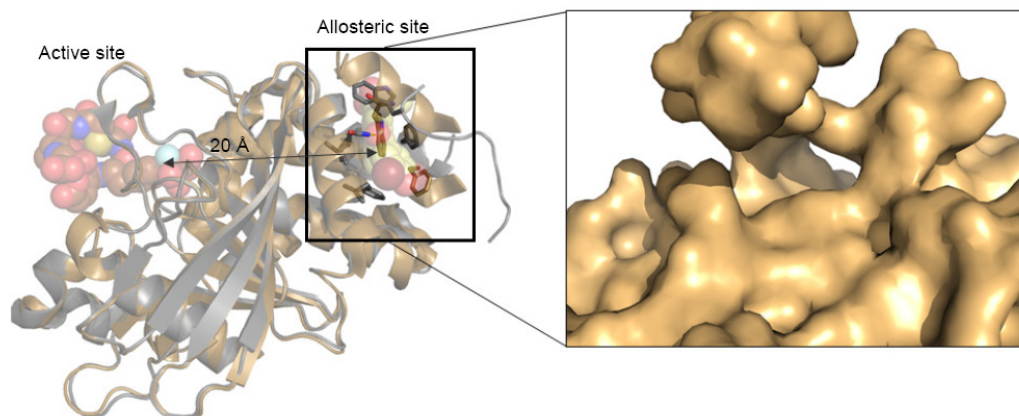


Figura 1.14 – Sito allosterico della PTP1B (PDB ID: IT48).

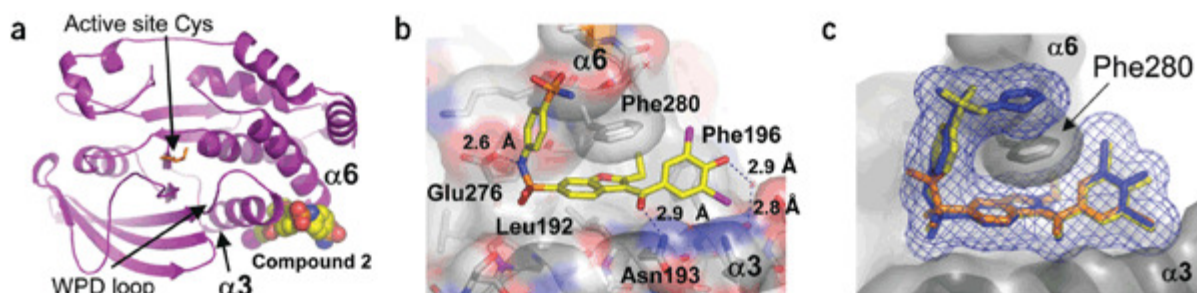


Figura 1.15 – Struttura cristallina del complesso della PTP1B con un inibitore allosterico [Wiesmann 2004].

Si è osservato che inibitori allosterici che si legano a questa regione inducono la PTP1B ad assumere una conformazione sovrapponibile alla forma aperta dell'enzima; in questo modo essi impediscono determinate interazioni e movimenti dei residui aminoacidici necessari perché la PTP1B adotti la conformazione chiusa, con il risultato che l'enzima, non potendo assumere la forma attiva, rimane bloccato nella sua conformazione aperta e inattiva [Wiesmann 2004].

In questo meccanismo d'azione viene coinvolta l'elica $\alpha 7$, che normalmente stabilizza la chiusura del loop WPD nella conformazione attiva ed è necessaria per l'attività catalitica della PTP1B [Weismann 2004]. L'elica $\alpha 7$, nella conformazione attiva dell'enzima, stabilisce con le eliche $\alpha 3$ e $\alpha 6$ delle interazioni critiche per la chiusura del loop WPD. Nei complessi dell'enzima co-cristallizzato con inibitori allosterici, l'elica $\alpha 7$ risulta disordinata e scostata dal core del sito attivo; in seguito a ciò, le sue interazioni con le eliche $\alpha 3$ e $\alpha 6$ sono impedito e questo si traduce in cambiamenti conformazionali che riducono la mobilità del loop WPD, impedendogli di ripiegarsi sulla pTyr del substrato e mantenendo così l'enzima in una conformazione inattiva [Wiesmann 2004; Schneider 2013].

La trodusquemina (Figura 1.11), di cui si è riferito sopra (paragrafo 1.2), si comporta da inibitore allosterico selettivo della PTP1B, legandosi alla regione regolatrice C-terminale dell'enzima in prossimità delle eliche $\alpha 3$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$ ed inducendo cambiamenti conformazionali che bloccano l'attività catalitica [Krishnan 2014].

1.4 – PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE DI NUOVI INIBITORI DELLA PTP1B

1.4.1 – Inibitori della PTP1B a struttura 5-ariliden-4-tiazolidinonica

Nell'ambito di una ricerca volta all'identificazione di nuovi inibitori della PTP1B, condotta nei laboratori di chimica farmaceutica dell'Università di Messina presso cui è stato svolto il lavoro oggetto di questa tesi, negli ultimi anni sono stati progettati e sintetizzati numerosi acidi 4-[(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)metil]benzoici e loro analoghi 2-ariliminici (**1-4**, Figura 1.16).

Questi composti sono stati progettati come inibitori diretti al sito attivo della PTP1B, applicando la strategia della riduzione del numero di cariche presenti sulla porzione che deve mimare l'interazione della pTyr con il target, in modo da ottenere molecole potenzialmente dotate di buona biodisponibilità. Il residuo dell'acido *p*-metilbenzoico inserito sull'N-3 dello scaffold 4-tiazolidinonico funge infatti da gruppo pTyr-mimetico monocarbossilico, mentre la porzione 5-arilidenica, su cui sono stati inseriti sostituenti

diversi, è in grado di adattarsi efficacemente alla tasca secondaria non catalitica dell'enzima, permettendo di ottenere inibitori bidentati.

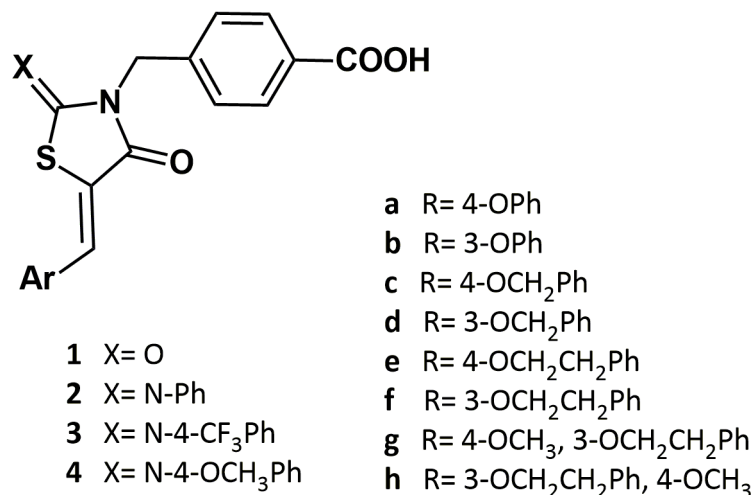


Figura 1.16 – Strutture generali di alcuni degli acidi 4-[(5-aryliden-2-aryl-imino/osso-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici **1-4** sintetizzati in precedenza [Maccari 2007a, 2009; Ottanà 2009, 2012, 2014].

Lo studio dei composti delle serie **1-4** ha permesso di individuare un buon numero di inibitori reversibili della PTP1B umana, attivi in vitro con valori di IC₅₀ nel basso range micromolare o submicromolare (Tabella 1.1, pag. 41) e con un'apprezzabile selettività nei confronti dell'enzima target rispetto ad altre PTP [Maccari 2007a, 2009; Ottanà 2009, 2012, 2014]. La potenza e la selettività di questi inibitori è marcatamente influenzata dal pattern di sostituzione della porzione 5-arylidenica; in particolare, la presenza di un sostituito aromatico aggiuntivo, come nei derivati fenossi-, benzilossi- o 2-feniletossi sostituiti in posizione *meta* o *para* dell'anello 5-benzilidenico, migliora l'attività verso la PTP1B. L'ampliamento della porzione 5-arylidenica permette infatti un più efficace adattamento alla tasca secondaria non catalitica dell'enzima, permettendo l'interazione con residui aminoacidici situati più profondamente e poco conservati tra le PTP [Maccari 2007a, 2009; Ottanà 2009, 2012, 2014].

Le relazioni struttura-attività (SAR) che sono state delineate per le serie di inibitori **1-4** hanno evidenziato che anche il pattern di sostituzione in posizione 2 dell'anello 4-tiazolidinonico può esercitare una notevole influenza sull'attività di questi composti. In particolare, l'inserimento di una porzione feniliminica (composti **2**) generalmente determina un miglioramento dell'effetto inibente la PTP1B rispetto agli analoghi 2,4-tiazolidindionici **1**.

Esperimenti di molecular docking dei composti **1-4** all'interno del sito attivo della PTP1B hanno messo in luce la capacità del residuo dell'acido *p*-metilbenzoico sull'N-3 di comportarsi, come previsto, da gruppo pTyr-mimetico che può instaurare una densa rete di legami a idrogeno e ionici tra il proprio gruppo carbossilico e i residui aminoacidici presenti nel dominio catalitico (in particolare Phe182, Cys215, Ser216, Ala217, Gly218, Arg221). L'anello aromatico del residuo benzoico contribuisce al legame inibitore/enzima attraverso contatti idrofobici con i residui aminoacidici lipofili circostanti, in particolare con la Phe182 del loop WPD (Figure 1.17 e 1.18).

Inoltre, i composti in cui la porzione 5-arilidenica è abbastanza estesa, come i derivati fenossi-, benzilossi- e (2-feniletossi)-benzilidenici che sono generalmente i più attivi, si comportano da inibitori bidentati dell'enzima, supportando l'ipotesi formulata nella fase di design di questi composti; la moiety 5-arilidenica è in grado infatti di inserirsi nella tasca secondaria non catalitica di legame per l'arilfosfato, instaurando legami favorevoli con Arg24, Arg254, Met258, Gly262 (Figure 1.17 e 1.18). I due anelli aromatici presenti nella porzione arilidenica di questi inibitori sono in grado di interagire anche con residui aminoacidici di altri loop limitrofi, come Tyr46 e Ile219; ciò fornisce un'ulteriore base razionale per spiegare la marcata influenza esercitata da questa porzione strutturale sulla potenza e sulla selettività di queste serie di inibitori [Maccari 2007a, 2009; Ottanà 2009, 2012, 2014].

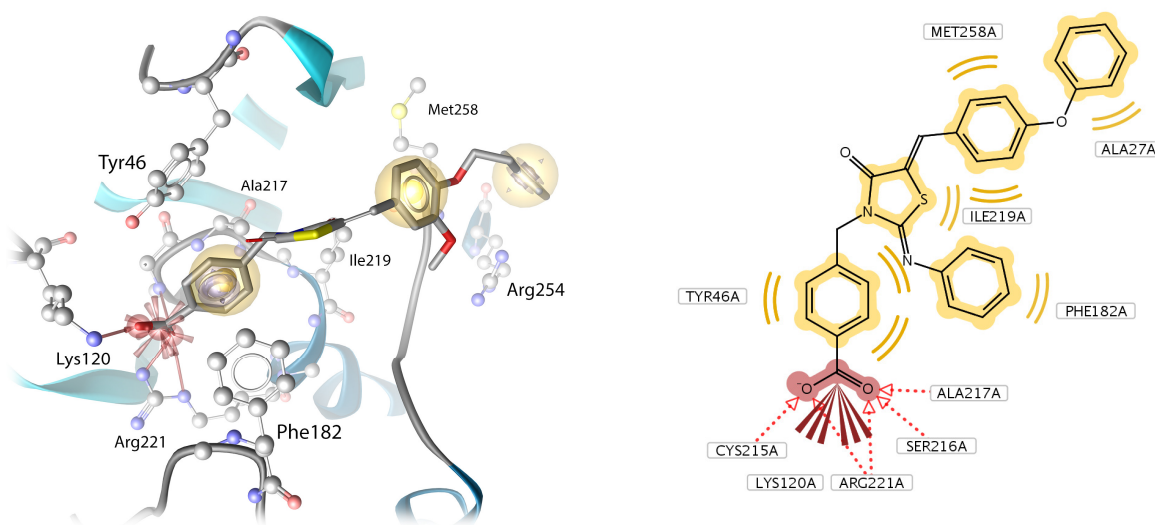


Figura 1.17 – Molecular docking di derivati delle serie **1**, **2** all'interno del sito attivo della PTP1B (PDB ID: 2QBS e 1XBO) [Ottanà 2009, 2014].

Il gruppo ariliminico in posizione 2 dell'anello pentatomico può contribuire all'aumento dell'affinità interagendo con residui aminoacidici vicini al sito catalitico della PTP1B, come Phe182, Lys120, Val49, Tyr46 (Figure 1.17 e 1.18), in accordo con i risultati relativi all'attività inibente ottenuti in vitro [Maccari 2009; Ottanà 2009, 2012, 2014]. Inoltre i dati computazionali hanno indicato con chiarezza che il gruppo 2-ariliminico e la porzione 5-arilidenica possono influenzarsi reciprocamente riguardo al posizionamento e alle modalità di binding all'interno del sito attivo della PTP1B, esercitando entrambe un marcato effetto sulla formazione del complesso enzima-inibitore e sul meccanismo d'inibizione [Ottanà 2014].

E' interessante sottolineare che derivati 2-ariliminici delle serie **3** e **4** (Figura 1.16) hanno mostrato una promettente azione insulinomimetica in colture di mioblasti murini C2C12, determinando un significativo incremento dell'uptake cellulare di glucosio, senza produrre rilevanti effetti citotossici in tali colture cellulari [Ottanà 2012, 2014].

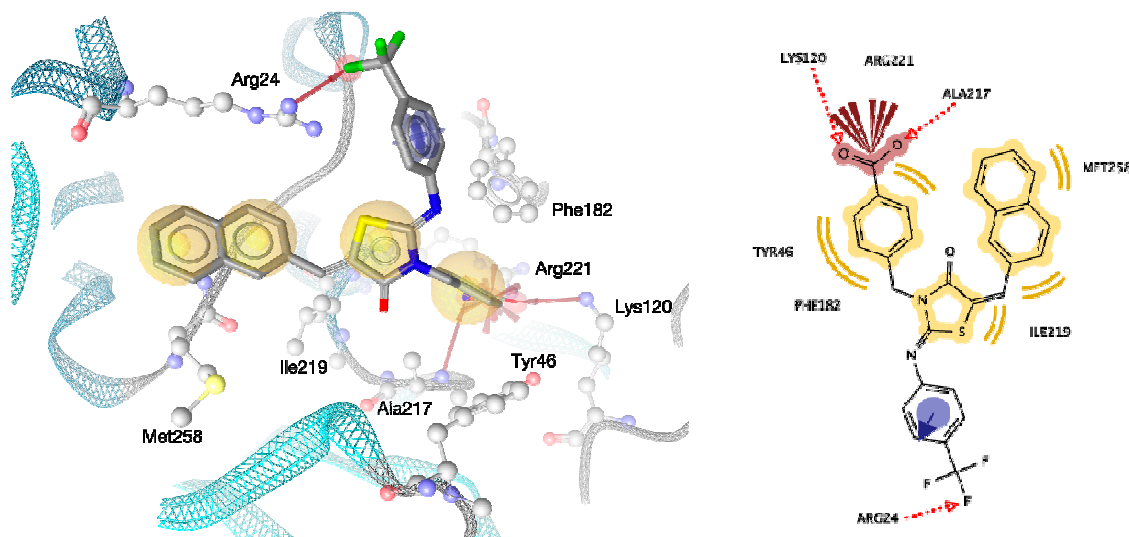


Figura 1.18 – Molecular docking di un derivato delle serie **3** all'interno del sito attivo della PTP1B (PDB ID: 2QBS e 1XBO) [Ottanà 2012].

Tra questi derivati, l'acido 4-{{[5-(4-benzilossibenziliden)-2-(4-trifluorometilfenilimino)-4-osso-3-tiazolidinil]metil}benzoico (**3c**, Figura 1.16), inibitore della PTP1B umana con $IC_{50} = 1.4 \mu M$, ha mostrato un ottimo profilo di attività insulinomimetica in colture cellulari di mioblasti murini C2C12, determinando un considerevole aumento della fosforilazione di RI e dell'uptake cellulare di 2-desossiglucosio, senza alcun effetto citotossico [Ottanà 2012]. Il composto **3c** è stato successivamente saggiato in topi con insulino-resistenza indotta dalla frammentazione del sonno; questa è una condizione in cui si osserva sovraespressione della PTP1B e, nell'uomo, costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo di obesità e sindrome metabolica. Negli animali trattati con il composto **3c**, si è potuto accertare che tutti gli effetti indotti dalla frammentazione del sonno e mediati dall'aumentata attività della PTP1B, quali incrementata assunzione di cibo, infiammazione del tessuto adiposo, insulino-resistenza e leptino-resistenza, vengono annullati, analogamente a quanto avviene in topi transgenici *ObR-PTP-1b^{-/-}* in cui è avvenuta la delezione del gene che codifica l'enzima [Gozal 2017].

Sulla base di questi risultati, è stata impostata la prosecuzione della ricerca di nuovi inibitori della PTP1B, che costituisce una parte del lavoro svolto durante il triennio di dottorato. Durante questo periodo, sono stati progettati e sintetizzati: a) acidi 4-{{[5-ariliden-2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil}benzoici (**5a-f**) e gli analoghi 2-tiosso-4-tiazolidinonici **6a-f** (Figura 1.19), con l'obiettivo di estendere le SAR e di valutare ulteriormente la modulazione dell'attività inibente determinata dalla porzione in posizione 2 dell'anello 4-tiazolidinonico [Ottanà 2017]; b) acidi 4-{{[5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil}fenilacetici (**10a-f**, Figura 1.19), nei quali è stato esteso il gruppo pTyr-mimetico rispetto agli analoghi **1**, per verificare se questa modifica possa migliorare ulteriormente l'adattamento al sito catalitico della PTP1B, aumentando la potenza di questi inibitori.

Il sostituente F è stato inserito sull'anello feniliminico dei composti **5** in quanto potrebbe contribuire alla stabilizzazione del complesso enzima-inibitore, senza determinare sfavorevoli effetti sterici visto che ha dimensioni simili a quelle dell'atomo d'idrogeno. Nei derivati **6**, l'atomo di zolfo del gruppo tiocarbonilico in 2 ha dimensioni e polarizzabilità maggiori rispetto all'atomo di ossigeno del carbonile bioisostero presente negli analoghi **1**; queste caratteristiche potrebbero permettere l'instaurarsi di nuove interazioni con residui aminoacidici del dominio catalitico dell'enzima target o di regioni circostanti. Inoltre, la maggiore lipofilia dei composti **6** e **10** rispetto agli analoghi 2,4-tiazolidindionici **1** e, allo stesso tempo, il loro più basso peso molecolare rispetto ai 2-arilimino-4-tiazolidinoni **2-4** potrebbero migliorare il profilo di attività, soprattutto per quanto concerne la farmacocinetica.

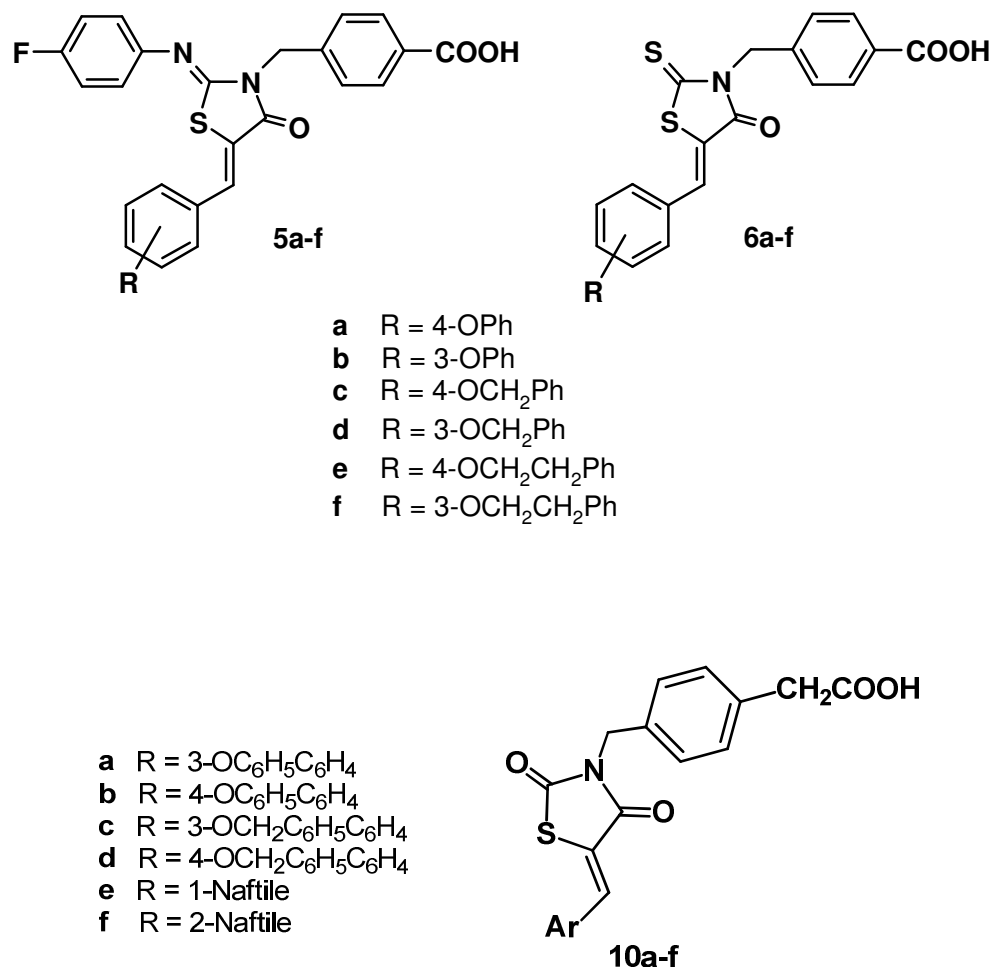


Figura 1.19 – Strutture degli acidi 4-[(5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici **5** e **6** e degli acidi 4-{[5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil}fenilacetici **10**.

Sulla base delle SAR precedentemente acquisite, in tutti i composti **5**, **6** è stata inserita una porzione 5-arilidenica in cui sono presenti due anelli aromatici; in particolare, sull'anello 5-benzilidenico, sono presenti i gruppi fenossi, benzilossi e 2-feniletossi che erano risultati particolarmente utili per migliorare gli effetti inibenti dei composti **1-4** già esplorati. Per i composti **10**, le porzioni fenossibenzilidenica, benzilossibenzilidenica e naftalenica in posizione 5 dell'anello tiazolidindionico sono apparse più adatte a

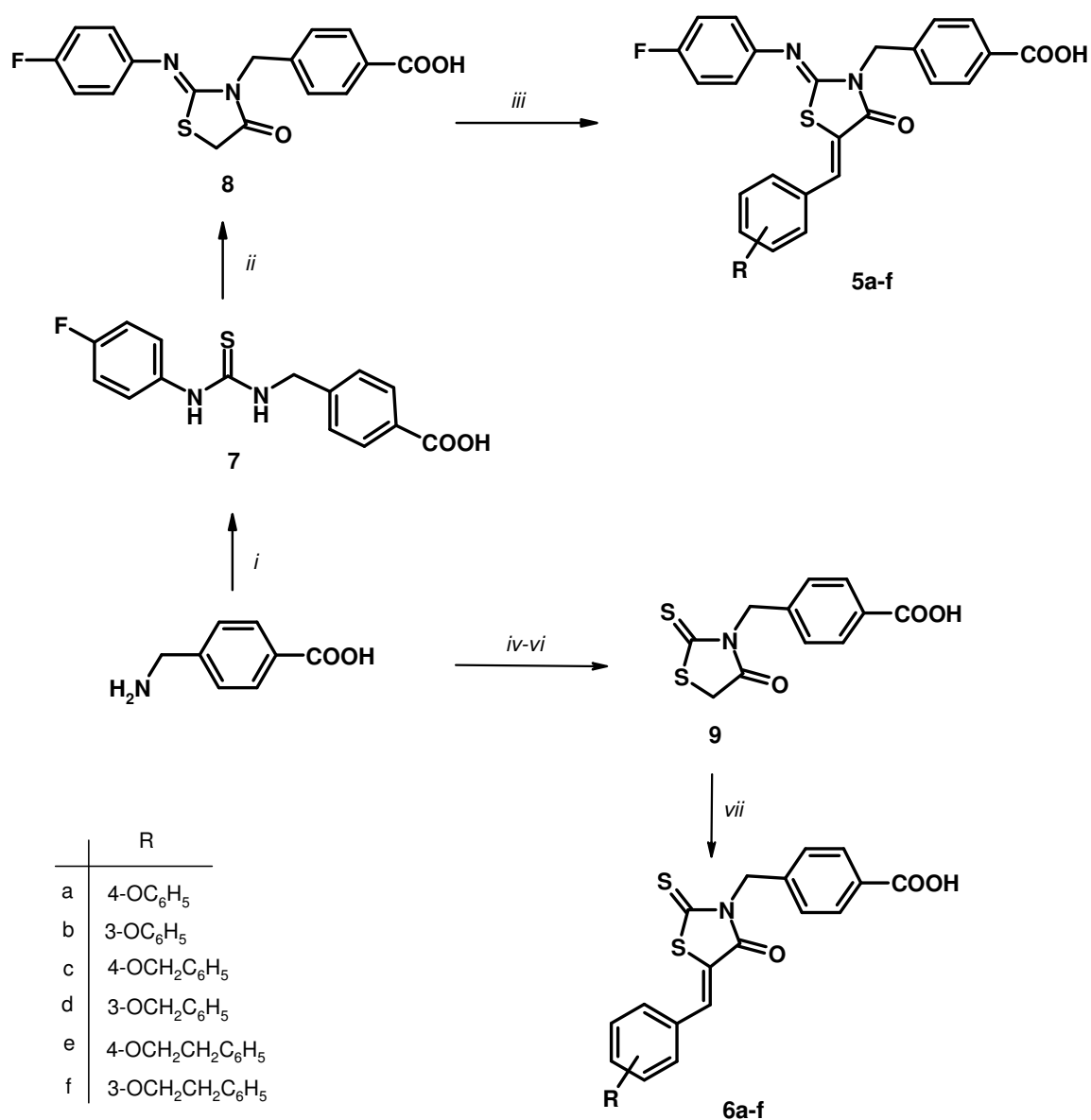
garantire una buona interazione con il sito attivo della PTP1B, considerando complessivamente le maggiori dimensioni molecolari di questi derivati.

Chimica

Gli acidi 4-{{5-ariliden-2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoici (**5a-f**) sono stati sintetizzati seguendo un procedimento multistep simile a quello impiegato per la sintesi degli analoghi ariliminici **2-4** [Ottanà 2009, 2012, 2014]. Dalla reazione dell'acido 4-(aminometil)benzoico con il 4-fluorofenilisotiocianato si ottiene l'acido 4-{{3-(4-fluorofenil)tioureido}metil}benzoico (**7**) con alte rese (Schema 1.1). La condensazione di **7** con il cloruro di cloroacetile, in etanolo a riflusso in presenza di trietilamina, fornisce l'acido 4-{{2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**8**) che, per condensazione di Knoevenagel con l'opportuna arilaldeide, in etanolo a riflusso in presenza di piperidina, ha prodotto i composti desiderati **5** (Schema 1.1) [Ottanà 2017].

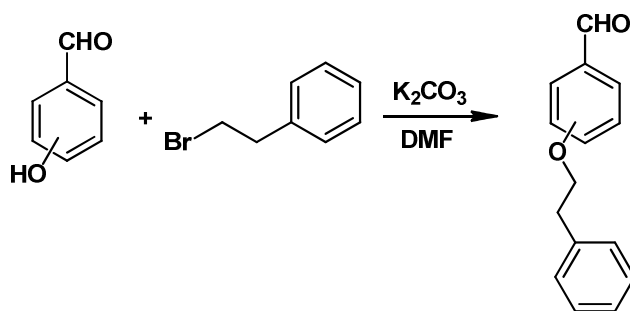
Per la sintesi degli acidi 4-{{5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}metil}benzoici (**6a-f**) è stato necessario preparare il precursore, acido 4-{{4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**9**), per ciclizzazione dell'acido 4-(aminometil)benzoico con solfuro di carbonio e sodio bromoacetato, in soluzione acquosa in presenza di sodio idrossido. La condensazione dell'acido **9** con l'opportuna arilaldeide, in acido acetico a riflusso in presenza di sodio acetato, ha prodotto i derivati **6a-f** (Schema 1.1).

Mentre per la sintesi dei composti **5a-d** e **6a-d** sono state utilizzate arilaldeidi commercialmente disponibili, la sintesi degli analoghi **5e**, **6e**, **5f**, **6f** ha richiesto l'impiego della 4-(2-feniletossi)benzaldeide e della 3-(2-feniletossi)benzaldeide, che sono sintetizzate per *O*-alchilazione della 4/3-idrossibenzenalaldeide con (2-bromoetil)benzene, secondo un procedimento riportato in precedenza (Schema 1.2) [Ottanà 2014].



i: 4-FC₆H₄NCS, EtOH, Δ; *ii*: ClCH₂COCl, Et₃N, EtOH, Δ; *iii*: RC₆H₄CHO, C₅H₁₁N, EtOH, Δ;
iv: NaOH, CS₂; *v*: BrCH₂COONa; *vi*: HCl; *vii*: RC₆H₄CHO, CH₃COONa, CH₃COOH, Δ.

Schema 1.1 – Sintesi degli acidi 4-{[5-ariliden-2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil}benzoici **5a-f** e degli acidi 4-[(5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoici **6a-f**.



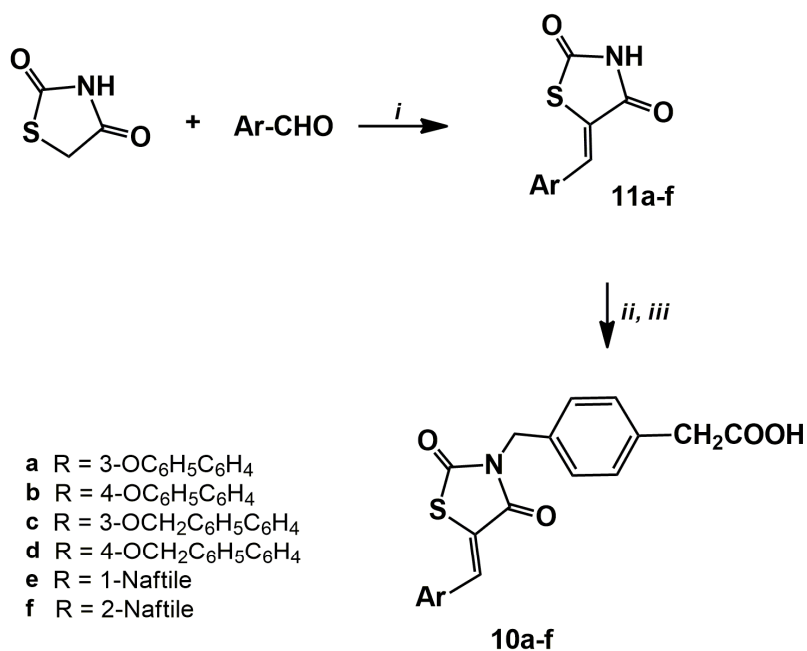
Schema 1.2 – Sintesi della 4-(2-feniletossi)benzaldeide e della 3-(2-feniletossi)benzaldeide.

Gli acidi 4-{[5-aryliden-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil}fenilacetici **10a-f** sono stati sintetizzati partendo dal 2,4-tiazolidindione commerciale che, per condensazione di Knoevenagel con le opportune aldeidi, in etanolo a refluxo e in presenza di piperidina, permette di ottenere i 5-aryliden-2,4-tiazolidindioni **11** in buone rese, secondo un procedimento sintetico riportato in precedenza [Maccari 2005]. Per *N*-alchilazione dei composti **11** con acido 4-(bromometil)fenilacetico, in acetone a refluxo con l'impiego di potassio carbonato come base, si ottengono i composti **10** (Schema 1.3).

Le strutture di tutti i composti **5**, **6** e **10** sono state assegnate sulla base dei loro dati analitici e spettroscopici (v. Parte sperimentale).

La risonanza del gruppo metilidenico sull'*N*-3 del tiazolidinone dei composti **5** e **6** ha dato origine ad un singoletto diagnostico che appare a 5.12-5.13 ppm nello spettro ^1H NMR e a 45.6-47.0 ppm nello spettro ^{13}C NMR. Negli spettri ^1H NMR dei composti **10** il segnale attribuibile a questi protoni si trova nel range 4.77-5.44 ppm, mentre il gruppo metilenico della porzione acetica risuona nel range 3.35-3.65 ppm. La presenza di un singoletto a 7.76-7.96 ppm, attribuibile alla risonanza del protone 5-metilidenico, si è rivelata critica per confermare la struttura dei composti finali **5**, **6** e **10**. La condensazione di Knoevenagel con le aldeidi aromatiche ha fornito un solo isomero dei composti finali **5a-f**, **6a-f** e **10a-f**, come indicato dalla risonanza del gruppo 5-

metilidenico che ha dato solo un segnale in entrambi gli spettri ^1H e ^{13}C NMR, in analogia ai 5-ariliden-4-tiazolidinoni precedentemente riportati, la cui geometria Z è stata individuata tramite cristallografia a raggi X [Bruno 2002; Ottanà 2005].



i: EtOH, piperidina, Δ

ii: BrCH₂C₆H₄CH₂COOH, K₂CO₃, acetone Δ ; iii: HCl

Schema 1.3 – Sintesi degli acidi 4-[[5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenilacetici **10a-f**.

Valutazione degli effetti inibenti in vitro nei confronti della PTP1B ricombinante umana

I composti **5a-f** e **6a-f** sono stati sottoposti alla valutazione in vitro dei loro effetti inibenti verso la PTP1B umana. Il saggio di inibizione ha utilizzato l'enzima ricombinante, ottenuto per espressione in *E. coli* come proteina di fusione con la glutatione S-transferasi (GST), e successivamente isolato e purificato. L'attività della

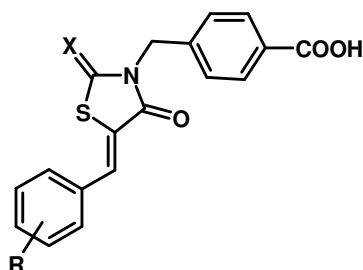
PTP1B è stata misurata a 37°C usando il *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) come substrato, a pH = 7,0. Lo ione *p*-nitrofenato, proveniente dall'idrolisi enzimatica del *p*NPP, è stato determinato misurando l'assorbanza a 405 nm.

I composti **5a-f** e **6a-f** hanno mostrato buone proprietà inibenti verso l'enzima target, con valori di IC₅₀ generalmente inferiori a 10 µM. Tra di essi, i composti **5c**, **5e** e **6f** sono emersi come gli inibitori più potenti, con valori di IC₅₀ nel basso range micromolare (1.5 µM-1.9 µM) (Tabella 1.1). La valutazione dei derivati fenilacetici **10a-f** è attualmente in corso e i dati non sono ancora disponibili.

Dai risultati dei saggi enzimatici in vitro e dal confronto dell'attività dei nuovi composti **5**, **6** con quella degli analoghi tiazolidinonici **1-4** precedentemente esplorati, emergono SAR interessanti [Ottanà 2017]. Infatti, nella serie dei derivati 4-fluorofenilimino sostituiti **5**, si possono osservare delle SAR coerenti con quelle delle precedenti serie **1-4**: la presenza di un sostituito aromatico in posizione *para* dell'anello 5-benzilidenico, così come l'allungamento del linker tra i due anelli aromatici, appaiono correlati ad una maggiore potenza inibente e, in accordo a ciò, il derivato 5-[4-(2-feniletossi)]benziliden sostituito **5e** è l'inibitore più attivo della serie, seguito dall'analogo 4-benzilossi sostituito **5c** (Tabella 1.1).

Al contrario, l'influenza esercitata dalla porzione 5-arilidenica sull'effetto inibente degli analoghi 2-tiosso-4-tiazolidinoni **6a-f** non è sempre in accordo con le SAR precedenti. Infatti, i derivati 5-(3-fenossi)benziliden- e 5-[3-(2-feniletossi)]benziliden sostituiti **6b** e **6f** sono risultati inibitori della PTP1B più potenti dei corrispondenti analoghi *para*-sostituiti, **6a** e **6e** (Tabella 1.1). Inoltre, i composti **6b** e **6f** sono più attivi dei corrispondenti 2,4-tiazolidindioni **1b** e **1f**, mentre negli altri casi la sostituzione del gruppo carbonilico in 2 dell'anello tiazolidindionico con il gruppo bioisostero tiocarbonilico ha determinato una generale, seppur contenuta, riduzione della potenza (Tabella 1.1).

Tabella 1.1 – Attività inibente in vitro verso la PTP1B ricombinante umana dei composti **5a-f** e **6a-f**, espressa come IC₅₀ (μM),^a in confronto con gli analoghi precedentemente sintetizzati **1-4**.



	Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4	Comp 5	Comp 6	
R	X=O	X=NPh	X=N-4-CF ₃ Ph	X=N-4-OCH ₃ Ph	X=N-4-FPh	X=S	
a	4-OC ₆ H ₅	2.8 ± 0.2 ^b	1.1 ± 1.0 ^c	2.2 ± 0.1 ^e	2.5 ± 0.5 ^e	5.1 ± 0.14	10.6 ± 0.8
b	3-OC ₆ H ₅	18.0 ± 1.0 ^b	1.9 ± 0.1 ^c	10.4 ± 0.6 ^e	10.9 ± 0.3 ^e	10.0 ± 0.45	7.1 ± 0.2
c	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	1.6 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.1 ^c	1.4 ± 0.1 ^e	3.0 ± 0.2 ^e	1.9 ± 0.05	5.0 ± 0.2
d	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	1.1 ± 0.1 ^b	3.8 ± 0.1 ^c	5.6 ± 0.1 ^e	5.1 ± 0.9 ^e	4.2 ± 0.07	5.7 ± 0.3
e	4-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	2.6 ± 0.3 ^d	1.5 ± 0.3 ^d	---	---	1.5 ± 0.06	3.5 ± 0.1
f	3-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	9.5 ± 0.2 ^d	4.6 ± 0.2 ^d	---	---	14.5 ± 0.6	1.9 ± 0.02

^a I valori di IC₅₀ sono stati determinati con analisi di regressione ed espressi come media ± SE di tre repliche. ^b Maccari 2007a. ^c Ottanà 2009. ^d Ottanà 2014. ^e Ottanà 2012.

D'altra parte, sia nei composti **5** che negli analoghi **6**, l'allungamento della catena linker tra i due anelli aromatici della porzione 5-arilidenica determina un apprezzabile aumento della potenza inibente, sebbene nell'inibitore più attivo **5e** il sostituente 2-feniletossilico si trovi in posizione *para* dell'anello 5-benzilidenico, mentre nel composto **6f**, il più attivo della serie **6**, sia posizionato in *meta*.

Questi risultati hanno suggerito che la sostituzione della porzione 4-fluorofeniliminica in posizione 2 del tiazolidinone con il gruppo tiocarbonilico possa influenzare il posizionamento della porzione 5-arilidenica all'interno del sito attivo della PTP1B,

determinandone uno spostamento o, eventualmente, permettendo l'interazione con un sito allosterico, e facendo quindi variare il profilo di attività.

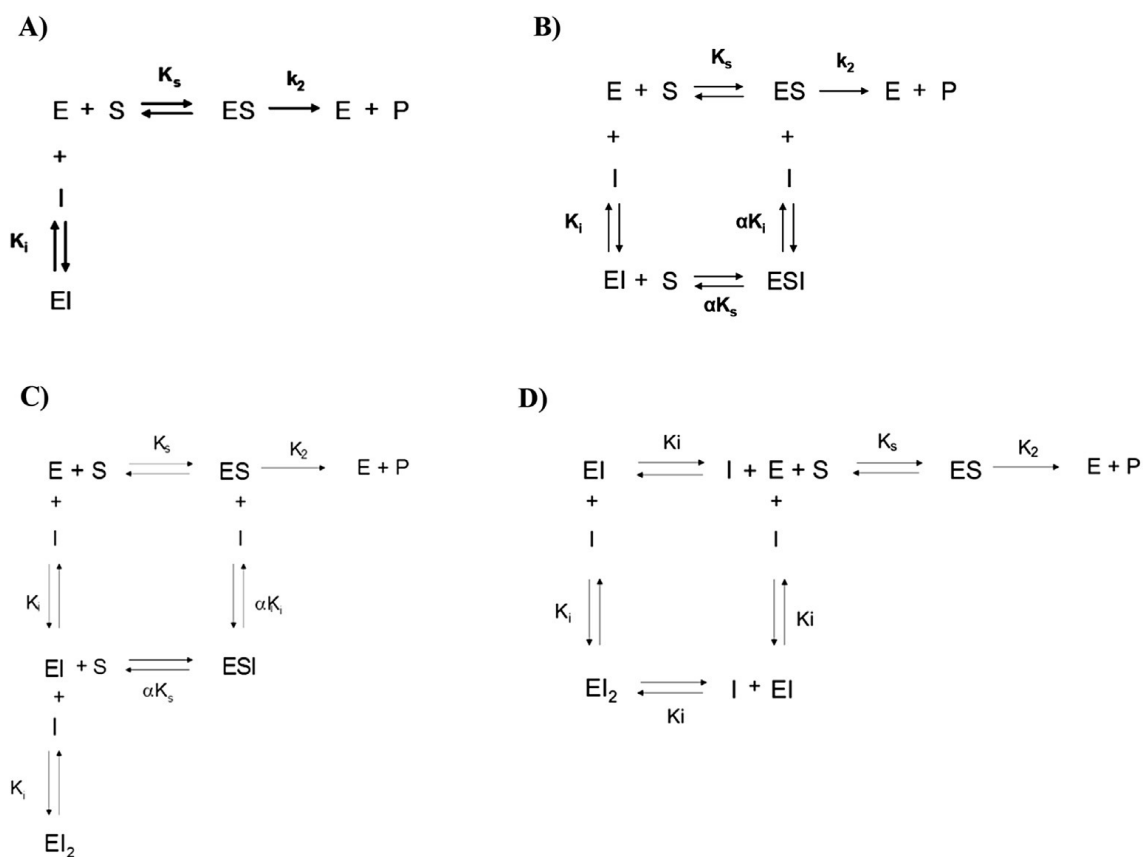
Ulteriori test hanno permesso di stabilire che i composti **5c** e **6a-f** si comportano da inibitori reversibili della PTP1B, mentre con i composti **5a**, **5b**, **5d-f** l'inibizione del target risulta parzialmente reversibile o irreversibile.

Per determinare il tipo di inibizione, sono stati eseguiti degli studi cinetici, analizzando i risultati del saggio di inibizione enzimatica con il metodo dei doppi reciproci (diagramma di Lineweaver-Burk). È emerso che i composti saggiati presentano meccanismi di inibizione differenti tra loro [Ottanà 2017].

In particolare, i 2-arilimino-4-tiazolidinoni **5a-c** si comportano da inibitori competitivi, in grado di legarsi solo all'enzima libero formando un complesso enzima-inibitore inattivo (Schema 1.4A); diversamente, gli analoghi **5d-f** si comportano da inibitori misti non competitivi, cioè possono legarsi sia all'enzima libero che al complesso enzima-substrato, producendo un complesso enzima-substrato-inibitore non produttivo (Schema 1.4B).

Nel caso dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni **6a-c**, si è osservato un comportamento simile ai composti **5d-f**, attribuibile ad un'inibizione di tipo misto, in quanto all'aumentare della concentrazione dell'inibitore si verifica sia un aumento dei valori della costante di Michaelis-Menten (K_m) sia una riduzione della velocità massima della reazione enzimatica (V_{max}) [Ottanà 2017]. Tuttavia, l'andamento iperbolico dei valori di K_m in funzione della concentrazione dell'inibitore (Figura 1.20) suggerisce l'esistenza di due siti di legame non mutualmente esclusivi: il legame dell'inibitore al primo sito può causare una riduzione della V_{max} e un lieve incremento della K_m , mentre il legame dell'inibitore al secondo sito riduce fortemente l'affinità del substrato per l'enzima (aumento più marcato della K_m) (Schema 1.4C). Basandosi su questo modello, non si può escludere che una molecola di inibitore si leghi al sito catalitico della PTP1B e, simultaneamente, una seconda molecola possa legarsi ad una regione diversa del target [Ottanà 2017].

Al contrario, l'interazione dei composti **6d-f** con l'enzima provoca un incremento della K_m , senza far variare la V_{max} , indicando un'inibizione di tipo competitivo. Tuttavia, l'andamento anche in questo caso iperbolico dei valori di K_m (Figura 1.20), in funzione della concentrazione dell'inibitore, suggerisce un'inibizione competitiva multipla, in cui due molecole di inibitore possono legarsi simultaneamente alla PTP1B impedendo il legame del substrato al sito attivo dell'enzima (Schema 1.4D).



Schema 1.4 – Modelli di inibizione: A) inibizione competitiva; B) inibizione di tipo misto; C) inibizione di tipo misto quando l'inibitore lega due siti; D) inibizione competitiva multipla. Nello schema E: E, enzima libero; ES complesso enzima-substrato; EI, complesso enzima-inibitore; ESI, complesso ternario enzima-substrato-inibitore; P, prodotto di reazione; K_s costante di dissociazione del complesso enzima-substrato; k_2 , costante della cinetica di reazione; K_i , costante di dissociazione del complesso EI; αK_s e αK_i , costanti di dissociazioni del complesso enzima-substrato-inibitore ($\alpha > 1$).

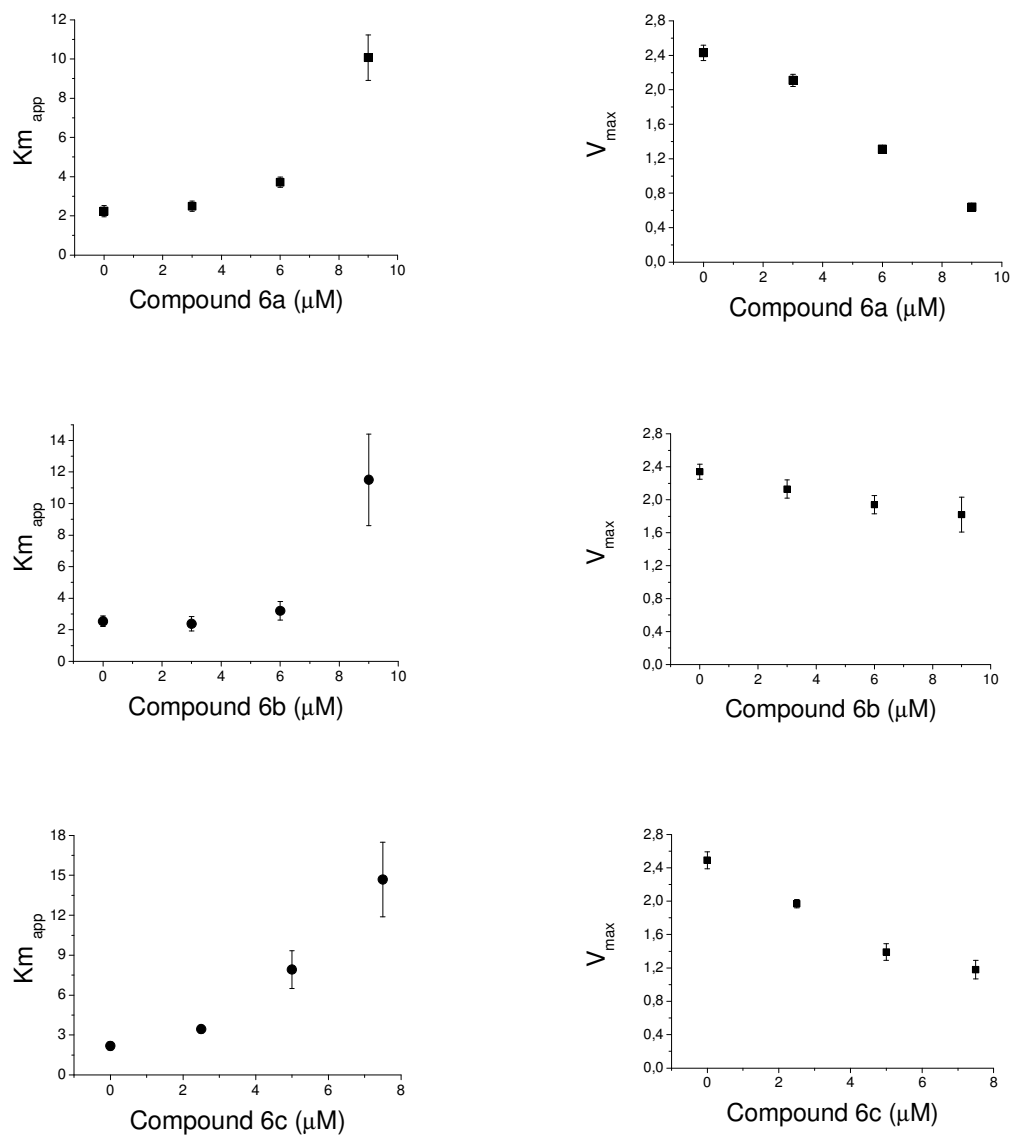


Figura 1.20 – Valori di Km e V_{max} a differenti concentrazioni dei composti **6a-f** (continua).

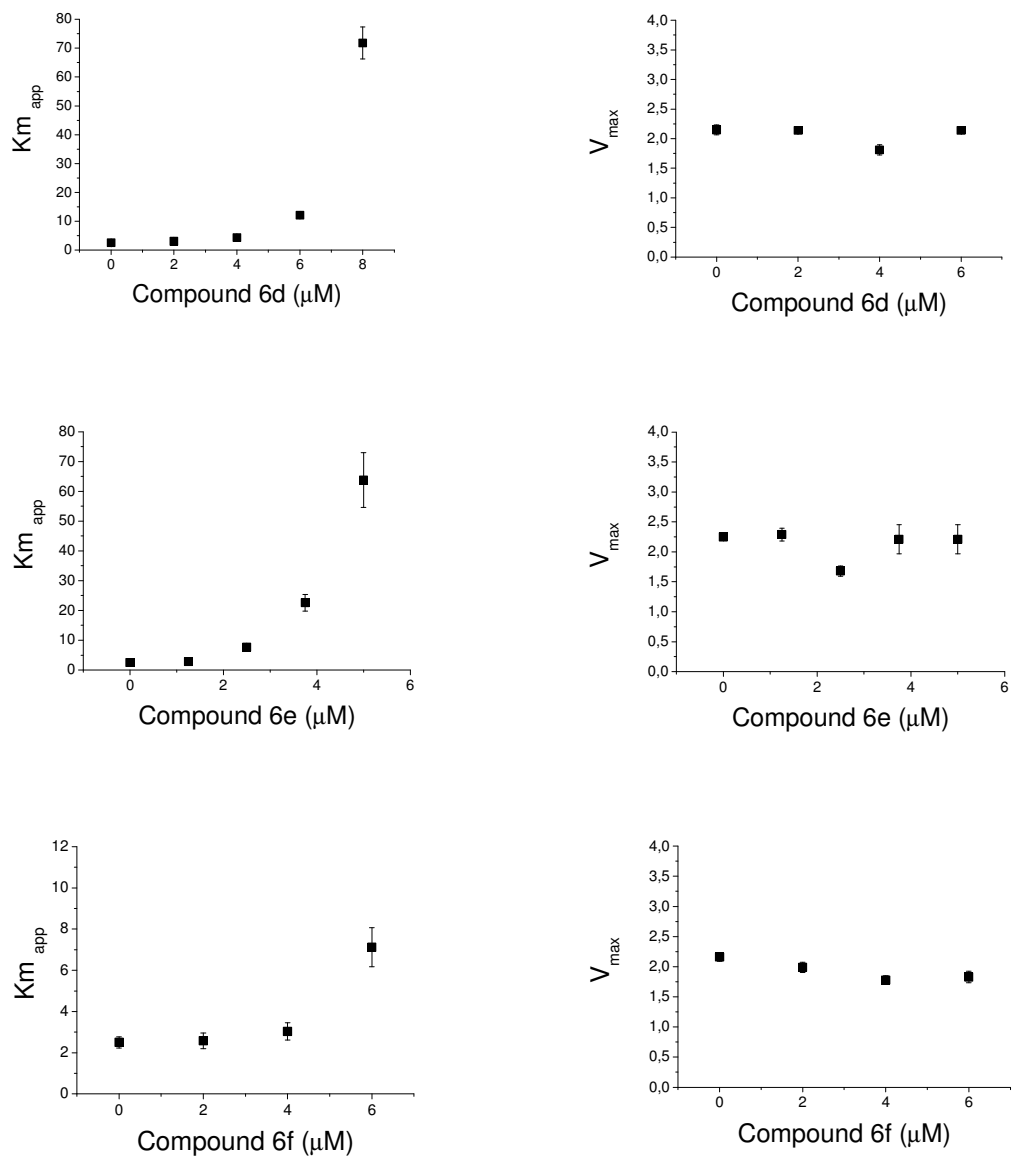


Figura 1.20 – (continua) Valori di K_m e V_{max} a differenti concentrazioni dei composti **6a-f**.

Studi di docking molecolare

I risultati degli studi cinetici discussi sopra indicano chiaramente differenti meccanismi di inibizione, suggerendo quindi differenti modalità di binding dei composti **5** e **6** nei confronti dell'enzima target. Per razionalizzare i diversi comportamenti osservati, sono stati condotti studi di docking molecolare non solo nel sito attivo della PTP1B, ma sull'intera superficie della proteina, per poter individuare eventuali altri siti di legame.

Tutti gli studi di modellistica molecolare riportati in questa tesi sono stati condotti grazie ad una proficua collaborazione con il gruppo di Computer-Aided Molecular Design della Freie Universität di Berlino. Durante il triennio di dottorato, ho svolto un periodo semestrale di ricerca presso questo gruppo di ricerca, apprendendo alcune tecniche di molecular modeling ed eseguendo parte degli studi di docking molecolare qui riportati, sotto la guida del Prof. Gerhard Wolber.

In Figura 1.21 sono riportate le modalità di legame proposte per i due analoghi [4-(2-feniletossi)]benziliden sostituiti **5e** e **6e**. I due composti mostrano un modello di interazione all'interno del sito catalitico dell'enzima target simile a quello di altri inibitori riportati precedentemente [Andersen 2000]. Entrambi i ligandi stabiliscono interazioni ioniche e legami a idrogeno tra il carbossilato del gruppo pTyr-mimetico ed i residui di Arg221 e Ser216. Il sostituito feniletossilico si inserisce nel sito secondario di legame, non catalitico, per l'arilfosfato, mostrando caratteristiche chimiche e complementarità sterica ottimali che possono spiegare l'apprezzabile attività inibente di entrambi i composti **5e** e **6e** (Figura 1.21).

Le cinetiche parzialmente non-competitive osservate sperimentalmente per i composti **5d-f** e **6a-c** suggeriscono l'esistenza di almeno un sito di legame addizionale.

Esperimenti di molecular docking all'interno del sito allosterico riportato in letteratura, posizionato tra le eliche $\alpha 3$ e $\alpha 6$ come descritto sopra [Wiesmann 2004], non hanno prodotto buoni risultati in termini di complementarità farmacoforica e non sono stati in grado di spiegare le SAR osservate. Studi di docking eseguiti invece considerando

l'intera superficie della proteina (PDB code 1Q6T) hanno evidenziato un secondo sito allosterico posizionato tra il foglietto β che comprende i residui Leu71 e Lys73 e una cavità lipofila chiusa dal loop Leu204-Pro210 [Ottanà 2017]. Questa tasca lipofila è connessa al residuo Cys215 del sito catalitico tramite un filamento β di soli cinque aminoacidi. E' quindi ragionevole ipotizzare che il legame a questo sito allosterico possa influenzare la posizione del foglietto β e quindi determinare variazioni nella conformazione della regione catalitica.

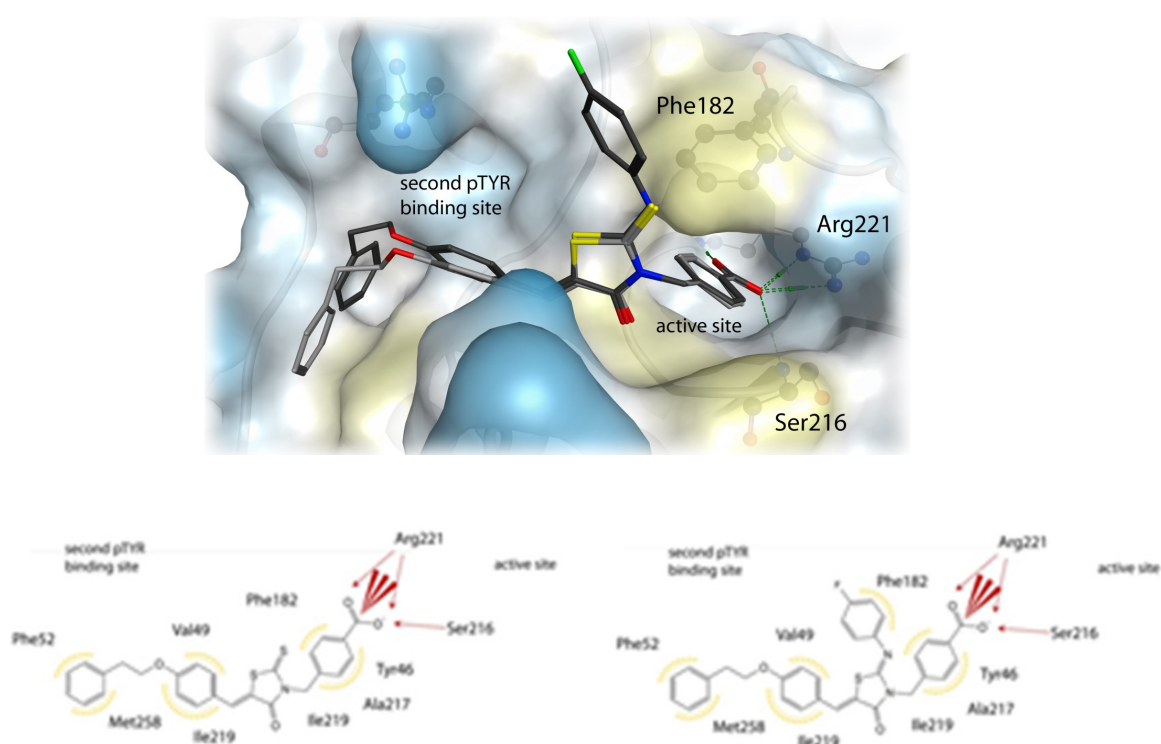


Figura 1.21 – Modalità di binding proposte per **6e** (grigio) e **5e** (nero) nella PTB1B (PDB code 2VEV) in 3D (in alto) and 2D (in basso a sinistra: **6e**, in basso a destra: **5e** [Ottanà 2017]).

In Figura 1.22 sono riportate come rappresentative le modalità di binding a questo nuovo sito allosterico dei composti **5e** e **6d**. I composti **6** possono stabilire legami ionici con la Lys237 e legami a idrogeno con Gln78 e Ser80; la porzione benzilossilica si inserisce nella cavità lipofila delimitata da Arg79, Pro206 e Pro210 (Figura 1.22). Gli

esperimenti di docking hanno indicato che, per il binding dei composti **6** a questo sito, la sostituzione in *meta* dell'anello benzilidenico è più adatta rispetto a quella in *para*.

I composti **5** possono inserire la loro estremità arilidenica nella stessa tasca lipofila occupata dai composti **6**, ma con una migliore interazione per i sostituenti in *para* determinata da un differente binding mode del resto della molecola; infatti, la porzione 2-arilimino-4-tiazolidinonica si proietta verso la Lys58 piuttosto che verso la Lys237 (Figura 1.22), verosimilmente a causa della presenza del sostituente ariliminico che determina un differente binding rispetto ai composti **6**, in accordo con le differenze cinetiche osservate sperimentalmente [Ottanà 2017].

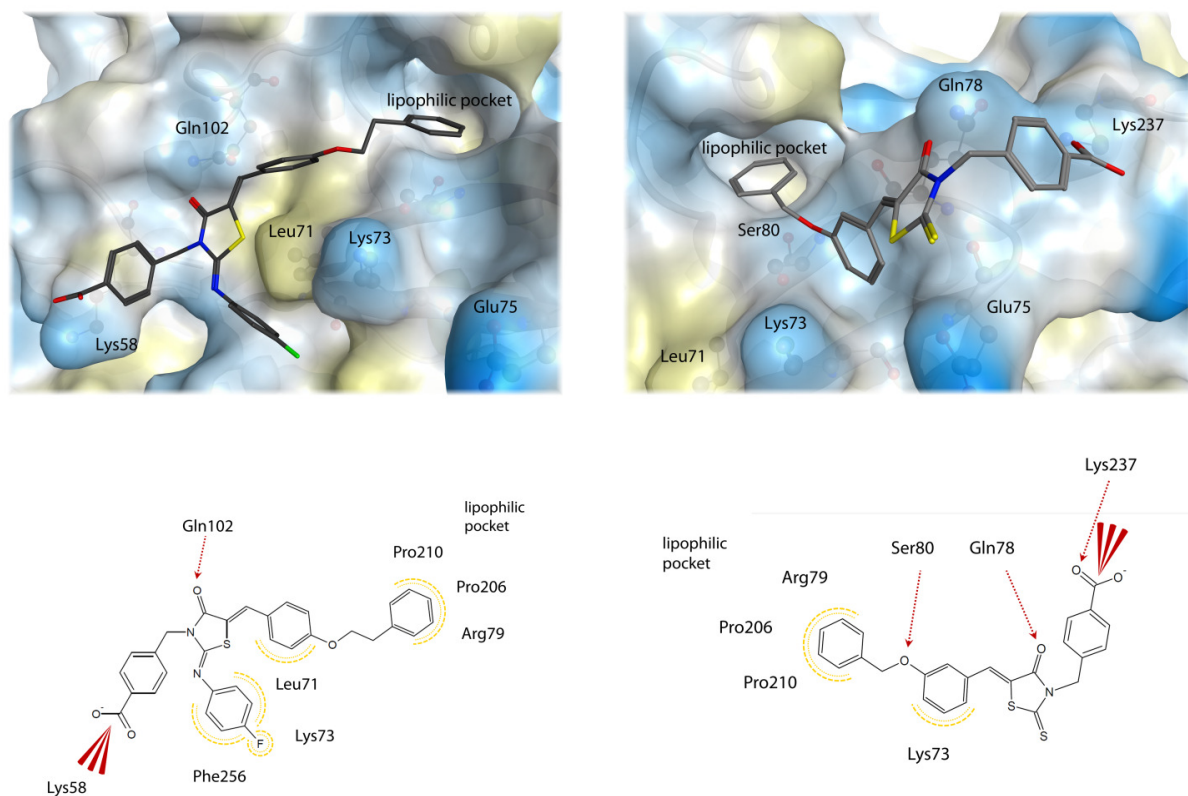


Figura 1.22 – Molecular docking dei composti **5e** (a sinistra) and **6d** (a destra) nel sito allosterico individuato nella PTB1B (PDB code 1Q6T) in 3D (in alto) e 2D (in basso) [Ottanà 2017].

Saggi cellulari

Per valutare la tossicità dei composti **5**, **6** è stato eseguito il saggio MTT, impiegando colture di cellule HepG2 incubate per 24 ore con i composti alla concentrazione finale di 25 μ M. Il saggio ha dimostrato che i livelli di vitalità cellulare non si riducono significativamente in presenza dei composti in esame (Figura 1.23); risultati simili sono stati ottenuti anche impiegando colture di mioblasti murini [Ottanà 2017].

Successivamente, sono stati valutati gli effetti insulinomimetici sulle stesse cellule HepG2. Le cellule sono state stimulate con insulina o trattate con i composti in esame per 30 minuti prima di essere sottoposte a lisi. La presenza della forma attiva del recettore RI è stata determinata con l'impiego di anticorpi specifici per questa forma recettoriale.

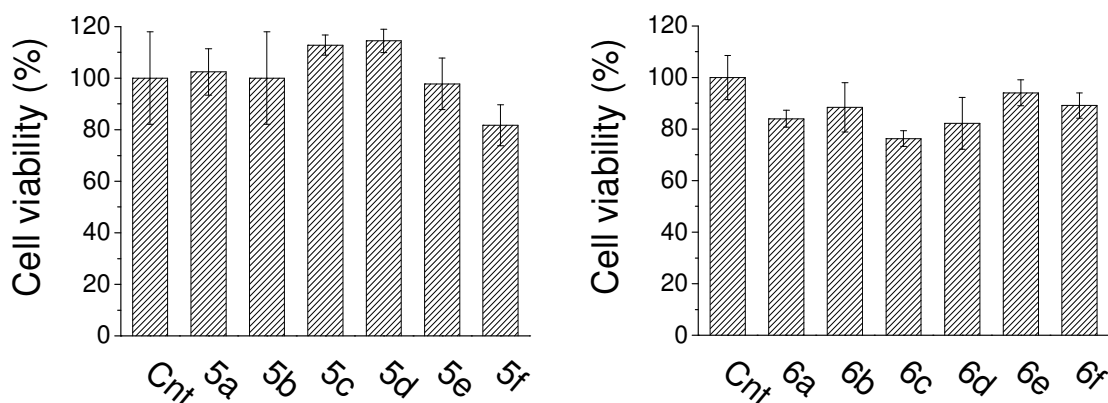


Figura 1.23 – Vitalità cellulare di cellule HepG2 in presenza dei composti **5** e **6** alla concentrazione finale di 25 μ M [Ottanà 2017].

Il trattamento delle cellule con i composti **5a-d** ha prodotto un incremento (da moderato per **5c** a notevole per **5b**) della fosforilazione delle subunità β di RI (Figura 1.24 A). A valle dell'attivazione di RI, si osserva tuttavia solo un debole aumento dei

livelli di fosforilazione della proteina Akt, probabilmente a causa di un andamento tempo-dipendente dell'effetto insulinomimetico, che decresce dopo 30 minuti. Al contrario, non è stato osservato alcun incremento dei livelli di fosforilazione di RI per trattamento delle cellule epatiche con i composti **6a-f**.

Risultati migliori sono stati ottenuti impiegando colture di cellule muscolari scheletriche murine C2C12, sulle quali tutti i composti **5a-f** hanno mostrato effetti insulinomimetici, determinando un aumento significativo dei livelli di fosforilazione delle subunità β di RI; tra essi, il derivato più attivo **5b** ha mostrato un effetto quantitativamente simile a quello dell'insulina (10 nM) (Figura 1.24 B), analogamente a quanto osservato nelle colture di epatociti HepG2 (Figura 1.24 A). I composti **5a** e **5b** hanno anche prodotto un aumento dei livelli di fosforilazione della proteina Akt, mentre l'allungamento del linker tra i due anelli della porzione 5-arilidenica si è rivelato poco favorevole per l'attivazione di questo componente della segnalazione insulinica.

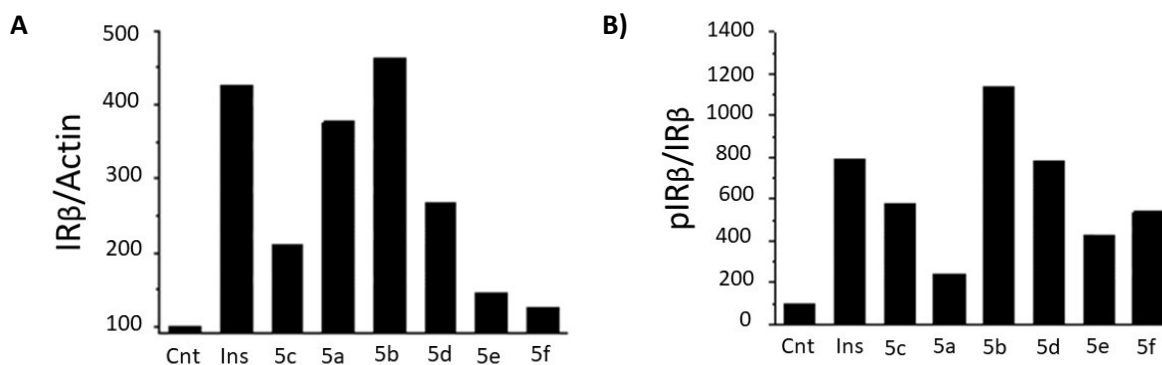


Figura 1.24 – Attività insulinomimetica dei composti **5a-f** su colture di cellule epatiche HepG2 (A) e cellule muscolari scheletriche murine C2C12 (B) trattate con insulina (Ins) (10 nM) o con i composti **5a-f** (50 μ M) [Ottanà 2017].

Successivamente, il composto **5b** è stato incubato in colture delle stesse cellule C2C12 per valutare il suo effetto sull'uptake cellulare di glucosio: il composto in esame ha prodotto un notevole incremento dell'assorbimento di 2-desossiglucosio, ancora una volta con livelli di attività simili a quelli dell'insulina (Figura 1.25).

Considerando che, come discusso nei paragrafi precedenti, l'infiammazione ha un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza ed è strettamente correlata alla sovraespressione della PTP1B, è sembrato interessante valutare anche il profilo anti-infiammatorio dei derivati 4-tiazolidinonici **5**, **6**. A questo scopo, sono state impiegate colture di cheratinociti umani (NCTC 2544) esposti a IFN- γ ed istamina, quest'ultima impiegata per incrementare l'attivazione dei cheratinociti indotta dall'IFN- γ [Ottanà 2017].

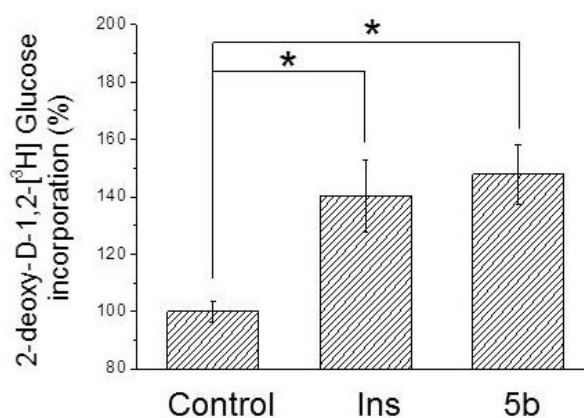


Figura 1.25 – Uptake di 2-desossiglucosio in colture di mioblasti C2C12 trattate per 30 minuti con insulina (10 nM) o con il composto **5b** (50 μ M). I dati riportati in figura rappresentano la media di tre repliche \pm S.E.M. (* p < 0.05). [Ottanà 2017].

Il saggio preliminare di tossicità sulle cellule NCTC 2544 ha mostrato che i composti **5b**, **6a-f** non interferiscono o hanno scarsi effetti (**6e**, **6f**) sulla vitalità cellulare alla concentrazione saggiata (10 μ M), mentre gli altri analoghi **5** esercitano effetti tossici non trascurabili su questo tipo di cellule. Di conseguenza, solo i composti non citotossici per i cheratinociti sono stati sottoposti alla valutazione della loro capacità di modulare alcuni eventi critici della segnalazione infiammatoria indotta da IFN- γ ed

istamina, quali in particolare l'espressione di molecole di adesione (ICAM-1), della NO-sintasi inducibile (iNOS) e della cicloossigenasi-2 (COX-2).

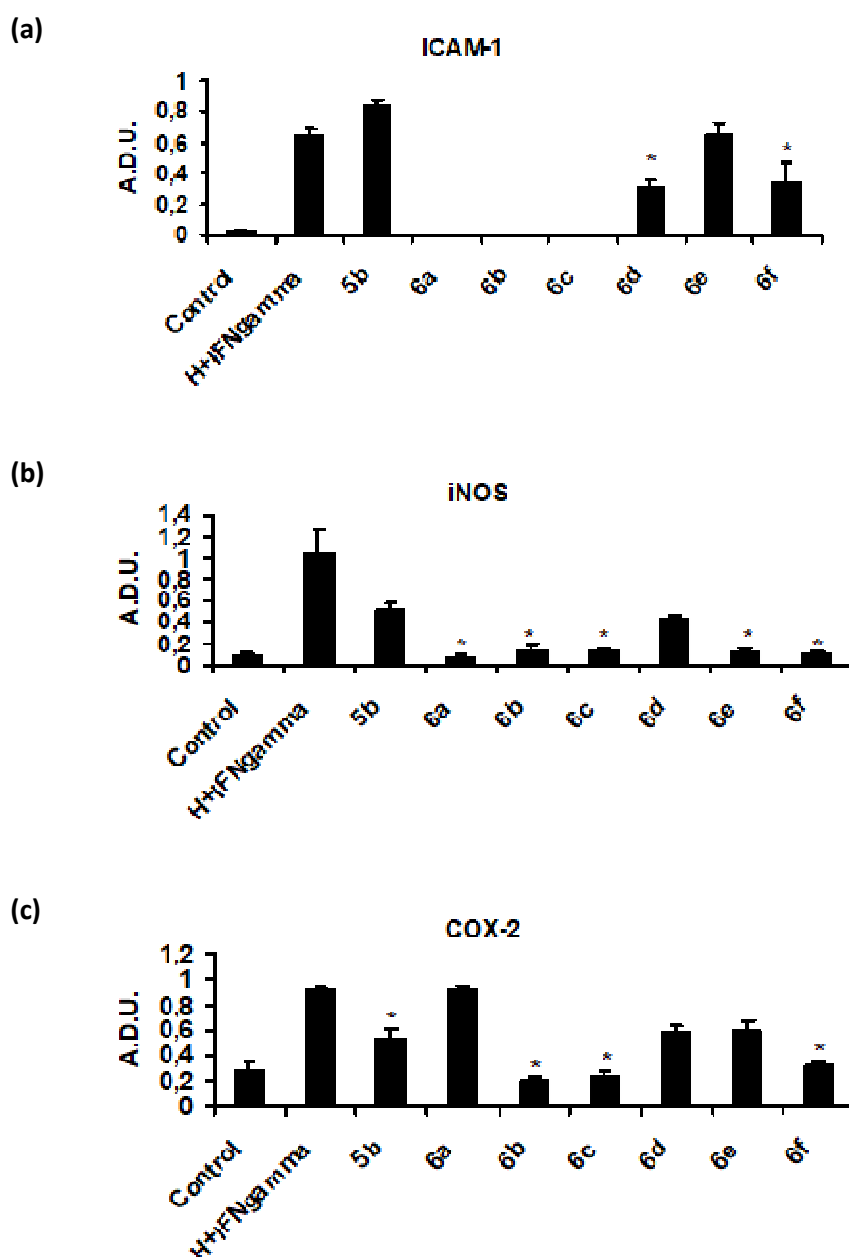


Figura 1.26 – Attività anti-infiammatoria dei composti **5** e **6** su cheratinociti umani stimolati con IFN- γ ed istamina. Risultati relativi all'espressione di ICAM-1 (a), iNOS (b) e COX-2 (c).

In questi saggi cellulari, i composti **6a-d** e **6f** hanno represso l'espressione sia di ICAM-1 che di iNOS, mentre **6e** ha ridotto i livelli di espressione solo dell'iNOS, rispetto alle

cellule stimulate con IFN- γ e istamina e non trattate (Figura 1.26). In particolare, i composti **6a-c** si sono rivelati i più potenti, riportando la produzione di queste molecole pro-infiammatorie ai livelli basali o, nel caso dell'ICAM-1, inibendo del tutto la loro espressione. I 2-tiosso-4-tiazolidinoni **6b**, **6c** e **6f** hanno inoltre ridotto significativamente l'espressione della COX-2. L'analogo **5b** ha prodotto una riduzione dell'espressione di iNOS e di COX-2 indotta da IFN- γ ed istamina, mentre non ha mostrato effetti sulla produzione di ICAM-1 (Figura 1.26).

L'insieme dei risultati ottenuti dalla valutazione dei derivati 4-tiazolidinonici **5a-f** e **6a-f** come inibitori della PTP1B e come potenziali agenti insulinomimetici ed anti-infiammatori permette di trarre alcune interessanti conclusioni. Dalle SAR osservate, emerge che il pattern di sostituzione nelle posizioni 2 e 5 dello scaffold tiazolidinonico può esercitare un marcato effetto non solo sulla potenza inibente, ma anche sul meccanismo di inibizione della PTP1B; infatti, l'estensione della porzione 5-arilidenica è in grado di modulare l'efficacia dell'interazione con la tasca secondaria non catalitica adiacente al sito attivo dell'enzima, ma può anche determinare un adattamento efficace ad un nuovo sito allosterico individuato sulla superficie dell'enzima. La natura del sostituente in posizione 2 dello scaffold sembra determinante per l'interazione con questa regione allosterica, in particolare il gruppo 2-tiocarbonilico dei composti **6** appare più adatto rispetto alla porzione 4-fluorofeniliminica, più lipofila e di maggiori dimensioni, presente negli analoghi **5**.

La possibilità di modulare l'attività dell'enzima attraverso l'interazione con il nuovo sito, individuato tra il foglietto β comprendente Leu71 e Lys73 e la tasca lipofila chiusa dal loop Leu204-Pro210, rappresenta un altro risultato interessante di questa ricerca, in quanto apre nuove prospettive nel design di inibitori allosterici della PTP1B.

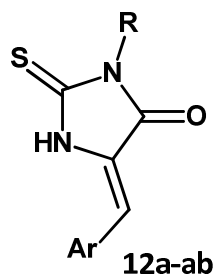
Per quanto riguarda l'effetto insulinomimetico, valutato su colture cellulari di tipo diverso, i derivati 4-fluorofeniliminici **5** hanno mostrato livelli di attività significativamente più elevati rispetto agli analoghi **6**. L'acido 4-[[2-(4-fluorofenilimino)-4-ossido-5-(3-fenossibenziliden)-tiazolidin-3-il]metil]benzoico (**5b**) è risultato particolarmente promettente, in quanto ha esibito eccellente azione

insulinomimetica: in colture di mioblasti murini C2C12, infatti, è in grado di attivare la segnalazione insulinica, mediante l'aumento dei livelli di fosforilazione del recettore RI e della chinasi Akt, e di determinare un significativo aumento dell'uptake cellulare di 2-desossiglucosio. Il composto **5b** presenta inoltre proprietà antiinfiammatorie non trascurabili, che si inseriscono favorevolmente nel suo profilo di attività come potenziale agente antidiabetico.

1.4.2 – 3-Aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni, inibitori allosterici della PTP1B

Partendo dalle SAR delineate per gli inibitori della PTP1B a struttura 4-tiazolidinonica e considerando che, come discusso nei paragrafi precedenti, la modulazione delle PTP attraverso meccanismi di inibizione non-competitiva rappresenta una strategia promettente per l'individuazione di nuovi potenziali farmaci, nel proseguimento della ricerca abbiamo adottato un approccio finalizzato al design di inibitori allosterici della PTP1B.

A questo scopo, sono stati progettati e sintetizzati i 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12** (Figura 1.27), come possibili bioisosteri degli inibitori a struttura 4-tiazolidinonica. In posizione 1 dell'anello imidazolidinonico, al posto dell'atomo di zolfo del tiazolidinone, è presente un NH che rende possibili interazioni, come legami ad idrogeno, potenzialmente utili per la stabilizzazione del complesso enzima/inibitore. Il gruppo pTyr-mimetico diretto al sito catalitico dell'enzima, che era presente sull'N-3 dei tiazolidinoni **1-6** e **10**, è stato rimosso e sull'N-3 dello scaffold imidazolidinonico è stata inserita invece una porzione aromatica, che può contribuire all'interazione con l'enzima e, allo stesso tempo, determina un aumento di lipofilia che può essere utile per migliorare la biodisponibilità di tali derivati. Nelle posizioni 2 e 4 sono stati mantenuti rispettivamente un tiocarbonile ed un carbonile, in analogia ai 2-tiosso-4-tiazolidinoni **6**, che avevano mostrato requisiti strutturali favorevoli per l'interazione con il sito allosterico localizzato tra il foglietto β che comprende i residui Leu71 e Lys73 e il loop Leu204-Pro210.



Comp.	R	Ar	Comp.	R	Ar
12a	C ₆ H ₄ -4-F	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	12o	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3,4-(OCH ₃) ₂
12b	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	12p	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3,4-(OH) ₂
12c	C ₆ H ₄ -4-SCH ₃	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	12q	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ -4-OH
12d	1-naftile	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	12r	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OH-4-OCH ₃
12e	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-C ₆ H ₅	12s	C ₆ H ₅	C ₆ H ₂ -3,4,5-(OCH ₃) ₃
12f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OC ₆ H ₅	12t	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ -4-F
12g	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	12u	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -4-NHCOCH ₃
12h	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCH ₂ C ₆ H ₅	12v	C ₆ H ₅	1-naftile
12i	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OCH ₂ C ₆ H ₅	12w	C ₆ H ₅	2-naftile
12j	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCH ₃	12x	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-(OCH ₃) ₂
12k	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	12y	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₂ -3,4,5-(OCH ₃) ₃
12l	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-SCH ₃	12z	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₃ -3-OH-4-OCH ₃
12m	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCF ₃	12aa	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ -4-OH
12n	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-SCF ₃	12ab	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₃ -3,4-(OH) ₂

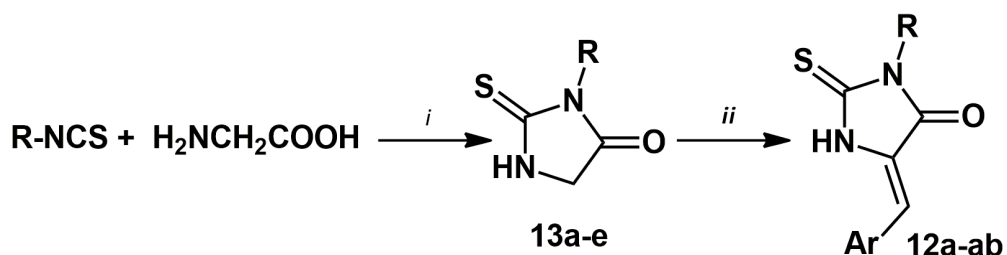
Figura 1.27 – Struttura dei 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12a-ab**.

Chimica

I 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12a-ab** sono stati sintetizzati secondo la procedura riportata nello Schema 1.5.

I 3-aril-2-tiosso-4-imidazolidinoni precursori **13a-e** sono stati ottenuti per reazione della glicina con l'opportuno arilisotiocianato, in soluzione idroalcolica a riflusso. La successiva condensazione di Knoevenagel dei composti **13** con l'appropriata

arilaldeide, in etanolo a riflusso e in presenza di piperidina, produce i 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12** con buone rese (Schema 1.5). La condensazione di Knoevenagel può anche essere condotta in acido acetico a riflusso, in presenza di sodio acetato; in questo caso, i composti **12** vengono ottenuti con rese generalmente più basse.



i: EtOH, H₂O, Δ
ii: ArCHO, EtOH, C₅H₁₁, Δ

Schema 1.5 – Sintesi dei 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12a-ab**.

I dati analitici e spettroscopici (¹H and ¹³C NMR) e l'analisi diffrattometrica a raggi X hanno permesso l'attribuzione della struttura dei composti **12**. Nei loro spettri ¹H NMR, la presenza di un singoletto a 6.53-7.23 ppm, attribuibile alla risonanza dei protoni del metilidene in 5, e la scomparsa del segnale a 4.28-4.33 ppm, che nei precursori **13** era dovuto alla risonanza del 5-CH₂, risultano diagnostiche per l'attribuzione della struttura.

Negli spettri ¹³C NMR è caratteristica la presenza dei segnali dovuti alla risonanza del gruppo 5-metilidenico a 49.7 ppm, del gruppo 4-carbonilico a 171.8 ppm e di quello 2-tiocarbonilico a 183.6 ppm.

Inoltre, la presenza di un solo set di segnali negli spettri NMR, è indicativo del fatto che la sintesi ha prodotto uno solo dei due isomeri geometrici. L'analisi diffrattometrica a raggi X del 3-fenil-5-(4-fenossibenzilidene)-2-tiosso-4-imidazolidinone **12g** (Figura 1.28)

[Maccari 2018] ha permesso di attribuire inequivocabilmente la configurazione Z ai composti sintetizzati; ciò è in accordo con quanto precedentemente osservato per i 5-arilidene-4-tiazolidinoni **1-6** e **10**, che sono stati sempre ottenuti come isomeri geometrici Z più stabili [Maccari 2007, 2009a; Ottanà 2009, 2012, 2014].

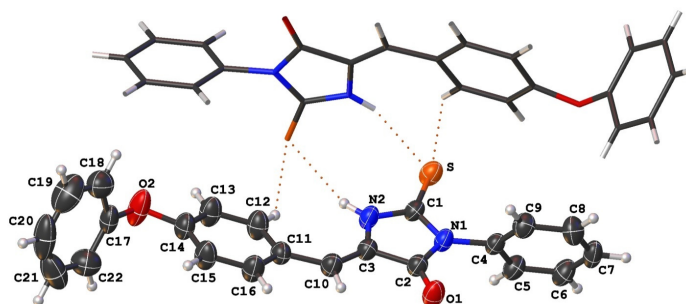


Figura 1.28 - ORTEP del 3-fenil-5-(4-fenossibenzilidene)-2-tiosso-4-imidazolidinone **12g** insieme con il *b*-asse cristallografico che evidenzia i legami a H e lo schema di numerazione. Le dimensioni degli atomi di idrogeno sono arbitrarie [Maccari 2018].

Valutazione degli effetti inibenti in vitro nei confronti della PTP1B ricombinante umana

I 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12a-w** sono stati sottoposti alla valutazione dei loro effetti inibenti in vitro nei confronti della PTP1B ricombinante umana, impiegando il *p*-nitrofenilfosfato come substrato. I composti **12a**, **12b**, **12c**, **12e**, **12f**, **12i**, **12o** e **12w** hanno mostrato ottime proprietà inibenti, con valori di $IC_{50} < 10 \mu M$, mentre gli analoghi **12d**, **12g**, **12h**, **12i**, **12n**, **12r**, **12v** hanno potenza leggermente inferiore, con valori di IC_{50} di poco superiori a $10 \mu M$ (Tabella 1.2). Gli analoghi **12j**, **12k**, **12p**, **12q**, **12s**, **12t**, **12u** sono risultati invece scarsamente attivi ($IC_{50} > 50 \mu M$) (Tabella 1.2).

Dai risultati del saggio enzimatico, è evidente che sia il sostituente aromatico in 3 sia la porzione 5-arilidenica dei composti **12** giocano un ruolo critico nell'inibizione del

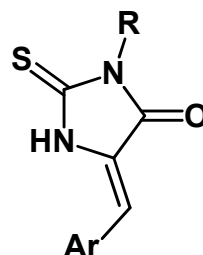
target, evidentemente determinando l'instaurarsi di interazioni con residui aminoacidici critici dell'enzima.

Infatti, l'attività inibente dei 4-imidazolidinoni **12e-w**, che in posizione 3 dello scaffold pentatomico hanno tutti lo stesso gruppo fenilico non sostituito, varia in modo marcato in funzione della natura e della posizione dei gruppi presenti nella porzione 5-arilidenica. In particolare, la presenza di un sostituito aromatico sull'anello 5-benzilidenico (composti **12e-12i**) o di un sistema naftilico (composti **12v, 12w**) appaiono generalmente favorevoli per l'affinità verso l'enzima target; tuttavia, l'allungamento del linker tra i due anelli aromatici determina una riduzione della potenza inibente, come emerge dal confronto tra il derivato 4-fenilbenzilidenico **12e** e i suoi analoghi 4-fenossibenzilidenico **12g** e 4-benzilossibenzilidenico **12i** (Tabella 1.2). Un'altra SAR riguarda la posizione dei sostituenti fenossilico e benzilossilico che, se si trovano nella posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico, producono un effetto migliore (composti **12f** e **12h**) rispetto a quando sono inseriti in posizione *para* (composti **12g** e **12i**).

L'inserimento di un metossile al posto del gruppo fenossilico o benzilossilico sull'anello 5-benzilidenico ha portato agli analoghi **12j** e **12k**, sostanzialmente inattivi. La sostituzione del gruppo 4-metossilico con il suo isostero tiometilico determina un significativo incremento di attività (composto **12l**, con $IC_{50}=5.6 \mu M$), mentre la presenza del sostituito trifluorometilico in questa stessa posizione riduce la potenza inibente, dimezzandola rispetto all'analogo **12l** (composto **12n**, $IC_{50}=10.2 \mu M$).

Tra gli altri composti **12** che presentano un solo anello aromatico nella porzione 5-arilidenica, il composto 3,4-dimetossibenziliden sostituito **12o** produce un'apprezzabile attività inibente ($IC_{50}=5.6 \mu M$), circa 10 volte superiore a quello dei composti 3- o 4-metossibenziliden sostituiti **12j** e **12k** ($IC_{50} > 50 \mu M$). Quando uno o entrambi i gruppi metossilici di **12o** vengono rimossi per essere sostituiti con altrettanti gruppi idrossile o con un fluoro, la potenza inibente subisce un dimezzamento (composto **12r**) o una ancora più drastica riduzione (composti **12p, 12q, 12t**), così come quando viene aggiunto un terzo gruppo metossilico (composto **12s**) (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 – Attività inibente in vitro nei confronti della PTP1B ricombinante umana dei composti **12a-w**, espressa come IC₅₀ (μM).^a



<i>Comp</i>	<i>R</i>	<i>Ar</i>	<i>IC</i> ₅₀ (μM)
12a	C ₆ H ₄ -4-F	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	3.5 ± 0.3
12b	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	7.4 ± 0.4
12c	C ₆ H ₄ -4-SCH ₃	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	3.5 ± 0.2
12d	1-naftile	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	15.2 ± 1.0
12e	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-C ₆ H ₅	2.9 ± 0.2
12f	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OC ₆ H ₅	2.7 ± 0.24
12g	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OC ₆ H ₅	15.3 ± 0.5
12h	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCH ₂ C ₆ H ₅	12.1 ± 0.90
12i	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OCH ₂ C ₆ H ₅	16.8 ± 1.70
12j	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCH ₃	>50
12k	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	>50
12l	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-SCH ₃	5.6 ± 0.1
12m	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -3-OCF ₃	49.7 ± 1.3
12n	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-SCF ₃	10.2 ± 0.2
12o	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3,4-(OCH ₃) ₂	5.6 ± 0.1
12p	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3,4-(OH) ₂	>50
12q	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ -4-OH	>50
12r	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OH-4-OCH ₃	12.2 ± 0.40
12s	C ₆ H ₅	C ₆ H ₂ -3,4,5-(OCH ₃) ₃	>50
12t	C ₆ H ₅	C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ -4-F	>50
12u	C ₆ H ₅	C ₆ H ₄ -4-NHCOCH ₃	>50
12v	C ₆ H ₅	1-naftile	10.6 ± 0.5
12w	C ₆ H ₅	2-naftile	6.0 ± 0.4

^a I valori di IC₅₀ sono stati determinati con analisi di regressione ed espressi come media ± SE di tre repliche.

Per quanto riguarda l'influenza della porzione aromatica in posizione 3 dell'anello imidazolidinonico, i dati finora a disposizione indicano che la presenza di sostituenti sull'anello benzenico può influenzare favorevolmente l'effetto inibente, portando ad incrementi di potenza fino a 5 volte rispetto ai derivati non sostituiti, mentre la presenza di un sistema aromatico più esteso, come quello 1-naftilico, non determina variazioni di attività. Considerando che il numero di derivati sostituiti sull'anello aromatico in 3 e saggiati (composti **12a-d**) è ancora limitato, sarà necessario sintetizzare e valutare altri analoghi per poter confermare questa SAR. Con questo obiettivo, sono stati sintetizzati gli analoghi 3-(4-metossifenil)-5-arilidene-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12x-ab** (Figura 1.27), la cui valutazione in vitro è ancora in corso.

Per chiarire il meccanismo d'azione di questa nuova classe di inibitori della PTP1B a struttura imidazolidinonica, sono state eseguite ulteriori studi impiegando i composti **12d**, **12e**, **12f**, **12h**, **12i**, **12r**. La Figura 1.29 riporta il diagramma di Lineweaver-Burk (o dei doppi reciproci) ottenuti a concentrazioni crescenti degli inibitori, dai quali emerge che i composti **12d**, **12f**, **12h** e **12r** si comportano da inibitori non-competitivi puri, che sono in grado di legare sia l'enzima libero sia il complesso enzima-substrato dando origine ad un complesso enzima-substrato-inibitore non produttivo (Schema 1.6). Infatti, il loro comportamento cinetico ha prodotto dei grafici in cui linee rette si intersecano sull'asse $1/[S]$ (Figura 1.29). Inoltre, concentrazioni crescenti di ciascun inibitore hanno provocato una riduzione dei valori di V_{max} , mentre i valori di K_m sono risultati indipendenti dalla concentrazione dell'inibitore.

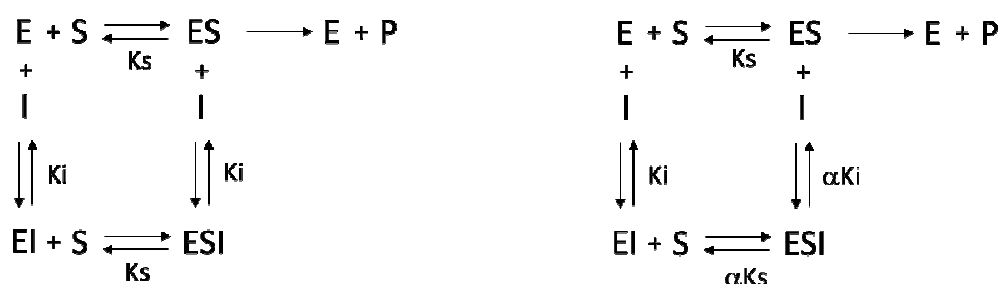
I composti **12e** e **12i** hanno mostrato un comportamento cinetico più complesso, dimostrando di agire come inibitori non-competitivi di tipo misto (Schema 1.6). Infatti, nel diagramma dei doppi reciproci, danno origine a linee rette che si intersecano in un punto del quadrante di sinistra (Figura 1.29) e, inoltre, si è osservato che la concentrazione dell'inibitore determina variazioni sia dei valori di V_{max} che di quelli di K_m .

Osservando il pattern di sostituzione della porzione 5-arilidenica, sembra ragionevole dedurre che la presenza di un sostituente in posizione *meta* dell'anello benzilidenico,

come nei composti **12f**, **12h**, **12r**, possa svolgere un ruolo determinante nell'interazione con il sito allosterico, dando origine ad un meccanismo d'inibizione di tipo non-competitivo puro. Ciò è in accordo con le SAR osservate nei derivati 2-tiosso-4-tiazolidinonici **6** riportati nel paragrafo precedente.

La sostituzione in *para*, come nei composti **12e**, **12i**, sembra favorire l'interazione con due siti, di cui uno allosterico, che non si escludono a vicenda, determinando un profilo cinetico più complesso in cui, comunque, il meccanismo di inibizione non-competitiva ha un ruolo principale. In questo quadro, il comportamento non-competitivo lineare osservato con il derivato 5-(4-fenossibenziliden) sostituito **12d** sembrerebbe un'eccezione, ma potrebbe essere influenzato dalla presenza del sistema 1-naftilico sull'N-3 dell'anello imidazolidinonico, al posto di quello benzenico presente negli altri analoghi analizzati.

Gli studi cinetici confermano dunque l'ipotesi iniziale su cui si è basato il design dei 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni **12**, indicando che questi inibitori, privi di un gruppo pTyr-mimetico carbossilico, interagiscono preferibilmente con una regione allosterica della PTP1B, piuttosto che con il sito carico positivamente del target.



Schema 1.6 - A) inibizione non-competitiva B) inibizione non-competitiva di tipo misto; E, enzima libero; ES, complesso enzima-substrato; EI, complesso enzima-inibitore; ESI, complesso ternario enzima-substrato-inibitore; P, prodotto di reazione; K_s , costante di dissociazione del complesso enzima-substrato; K_i , costante di dissociazione del complesso enzima-inibitore; αK_s e αK_i , costanti di dissociazione del complesso ESI ($\alpha > 1$).

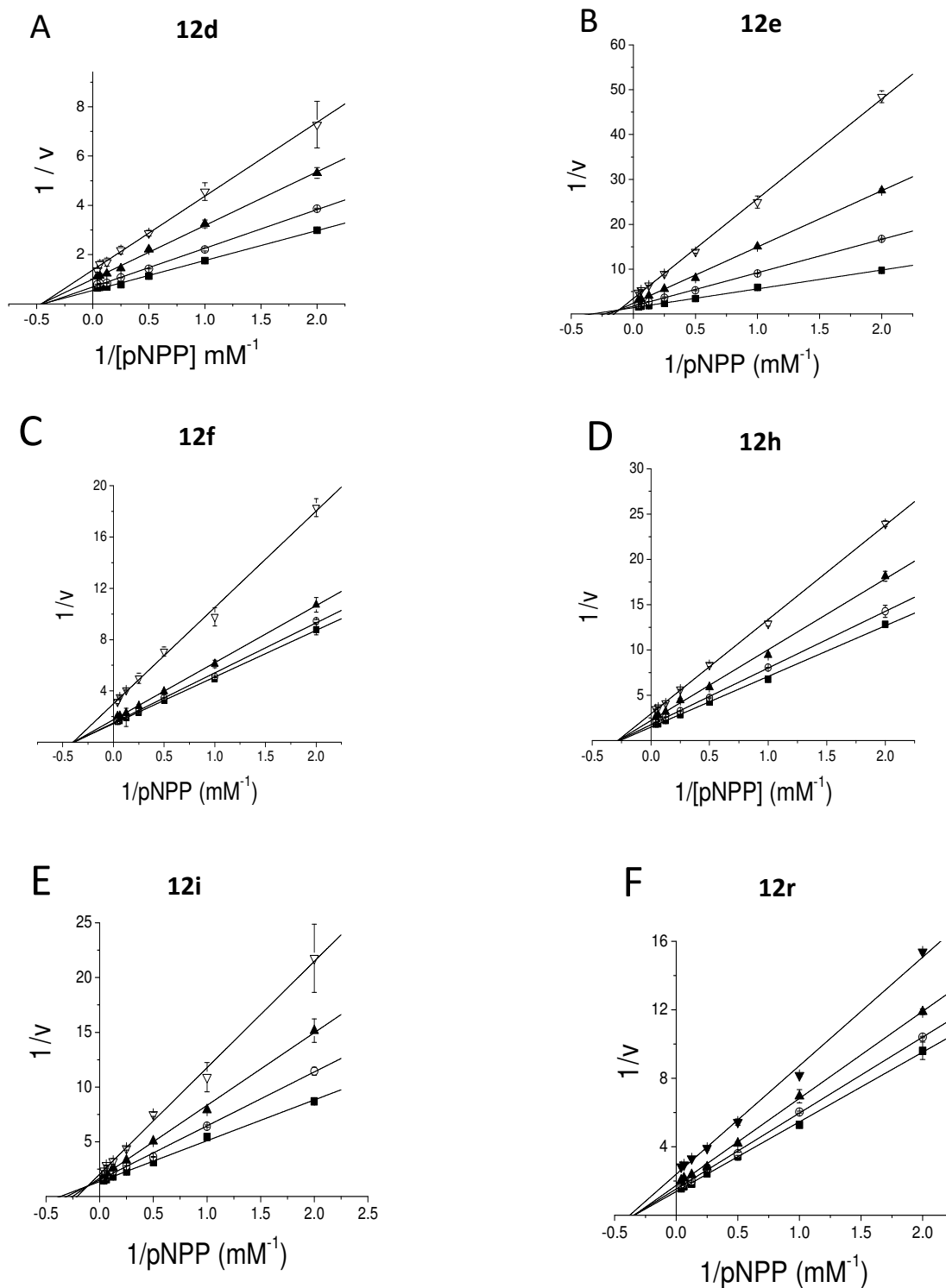


Figura 1.29 - Grafici dei doppi reciproci ottenuti con la PTP1B umana. A) **12d**. ■, 0 μM ; ○, 6 μM ; ▲, 12 μM ; ▽, 24 μM . B) **12e**. ■, 0 μM ; ○, 1 μM ; ▲, 3 μM ; ▽, 5 μM . C), **12f**. ■, 0 μM ; ○, 2.5 μM ; ▲, 5 μM ; ▽, 10 μM . D) **12h**. ■, 0 μM ; ○, 3 μM ; ▲, 5 μM ; ▽, 7 μM . E) **12i**. ■, 0 μM ; ○, 1 μM ; ▲, 2 μM ; ▽, 4 μM . F) **12r**. ■, 0 μM ; ○, 2.5 μM ; ▲, 5 μM ; ▽, 7.5 μM .

Studi di docking molecolare

Esperimenti di molecular docking, eseguiti sull'intera superficie della proteina target, hanno messo in evidenza la capacità degli inibitori della PTP1B **12** di interagire con una regione allosterica dell'enzima, fornendo così una razionalizzazione ai risultati ottenuti sperimentalmente. Gli studi in silico sono stati condotti impiegando i composti **12f**, **12g**, **12h**, **12i**, **12l**, **12o**, **12r**, **12v**, **12w**, selezionati come rappresentativi di questa nuova classe di inibitori.

Dagli studi di docking molecolare è risultato che, per i composti **12**, le uniche pose possibili per l'interazione con la PTP1B sono quelle in cui gli inibitori si legano al sito allosterico descritto sopra, posizionato tra il foglietto β comprendente i residui Leu71 e Lys73 e una cavità lipofila chiusa dal loop Leu204-Pro210.

In Figura 1.30 è riportato il docking all'interno del sito allosterico per uno dei composti saggiati (**12f**). La porzione aromatica in posizione 3 dell'anello imidazolidinonico si inserisce nella tasca lipofila tra i residui di Pro206 e Pro210, mentre il gruppo carbonilico in 4 forma un legame a idrogeno con la Ser80 e il tiocarbonile in 2 forma un altro legame a idrogeno con la catena laterale del residuo di Gln78.

L'ampiezza della tasca lipofila suggerisce che l'inserimento di adatti sostituenti sull'anello arilico in posizione 3 dell'anello imidazolidinonico potrebbe essere favorevole per migliorare l'interazione enzima/inibitore, come viene indicato anche dai bassi valori di IC_{50} ottenuti nel saggio di inibizione enzimatica per i composti **12a-c**, che presentano un sostituito nella posizione *para* dell'anello aromatico sull'N-3 (Tabella 1.2).

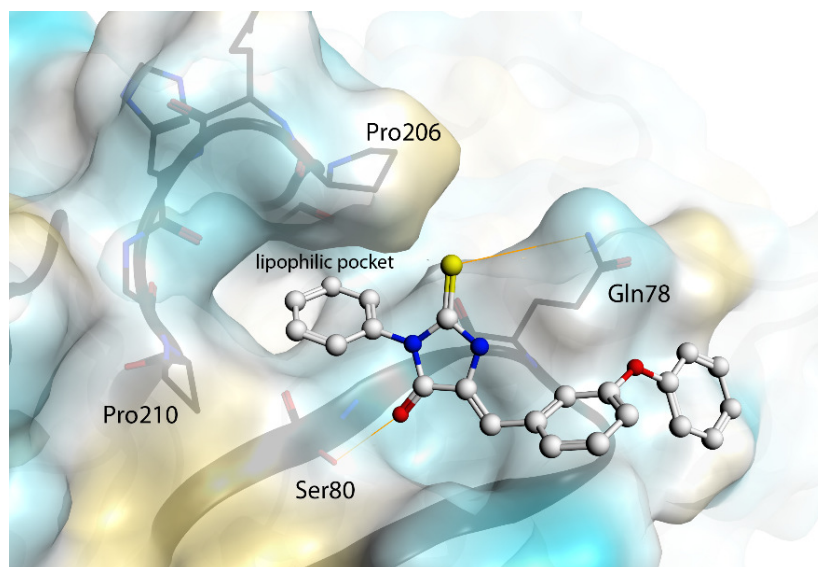


Figura 1.30 - Docking del composto **12f** nel sito allosterico della PTP1B.

Questa parte della ricerca di nuovi inibitori della PTP1B è risultata dunque particolarmente fruttuosa, in quanto ha permesso di individuare una nuova classe di inibitori allosterici dell'enzima, attivi a concentrazioni nel basso range micromolare.

L'inibizione allosterica della PTP1B, come discusso sopra, è considerata oggi una strategia tra le più promettenti, che potrebbe portare, in un prossimo futuro, ad avere dei nuovi candidati farmaci da sottoporre a valutazione clinica. Attualmente, gli inibitori allosterici della PTP1B riportati in letteratura sono ancora poco numerosi e, in questo contesto, i composti della serie **12** che hanno mostrato i migliori livelli di attività potranno essere assunti come dei promettenti lead compounds da ottimizzare nel proseguimento della ricerca.

Dati preliminari ottenuti dalla valutazione dei composti più attivi della serie **12** in colture cellulari di epatociti HepG2, che è attualmente in corso, mostrano che questi inibitori della PTP1B sono in grado di migliorare notevolmente la segnalazione insulinica, determinando un significativo incremento dei livelli di fosforilazione della chinasi Akt. Ciò aumenta l'interesse verso questa classe di composti e stimola a proseguire la ricerca.

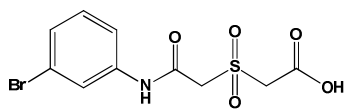
1.4.3 – Acidi 2-arilcarbamoilbenzoici

Parallelamente alla progettazione e sintesi di inibitori allosterici della PTP1B, di cui si è discusso nel precedente paragrafo, ci si è posti l'obiettivo di proseguire anche la ricerca di nuovi inibitori diretti al sito attivo dell'enzima bersaglio, progettando composti dotati di strutture diverse rispetto a quella 4-tiazolidinonica degli inibitori **1-6** e **10**, in modo da ampliare ed esplorare meglio lo spazio chimico in cui individuare nuove molecole attive come inibitori di questo target.

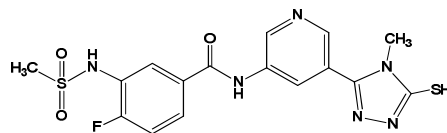
In collaborazione con il gruppo di Computer-Aided Molecular Design della Freie Universität di Berlino, è stato intrapreso uno studio di virtual screening su librerie di composti disponibili come prodotti commerciali, che ha permesso, alla fine, di individuare quattordici hits (composti **14-27**, Figura 1.31) potenzialmente in grado di interagire in modo efficace con la PTP1B.

Questi composti sono stati quindi selezionati per una valutazione preliminare in vitro sulla PTP1B ricombinante umana. Nel saggio di inibizione enzimatica, tra gli hits selezionati, si sono distinti come migliori inibitori i composti **21**, **22** e **23** (Figura 1.31), che hanno prodotto, rispettivamente, un'inibizione del 65%, del 44% e del 40% dell'attività enzimatica alla concentrazione di 50 μ M (Figura 1.32). Sebbene si tratti di livelli moderati di attività, questi composti sono comunque apparsi interessanti per porre le basi del design di nuovi inibitori della PTP1B.

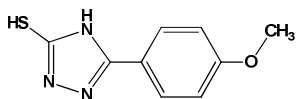
Infatti, mentre il composto **23** è un derivato 2,4-tiazolidindionico, contenente alcune porzioni molecolari sovrapponibili al farmacoforo individuato per gli inibitori tiazolidinonici **1-6** e **10** di cui si è discusso sopra, i composti **21** e **22** hanno strutture del tutto diverse.



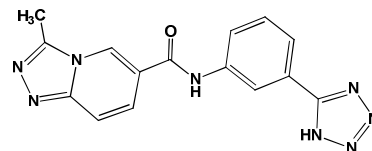
14



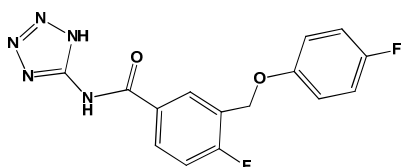
15



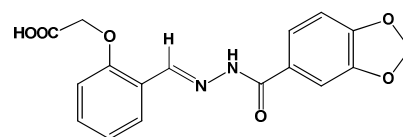
16



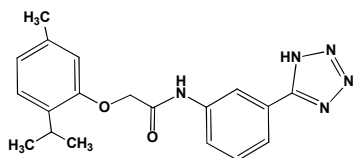
17



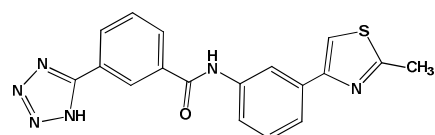
18



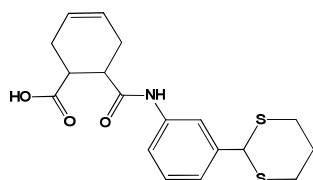
19



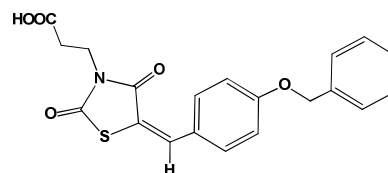
20



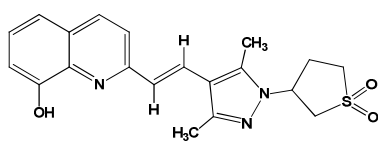
21



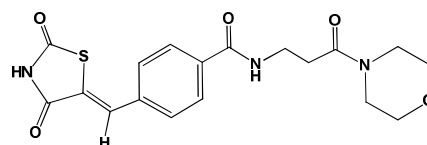
22



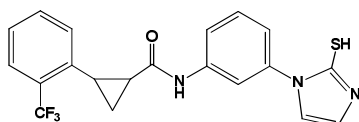
23



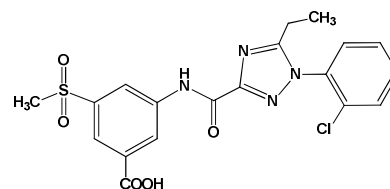
24



25



26



27

Figura 1.31 – Strutture dei composti selezionati tramite virtual screening come potenziali inibitori della PTP1B.

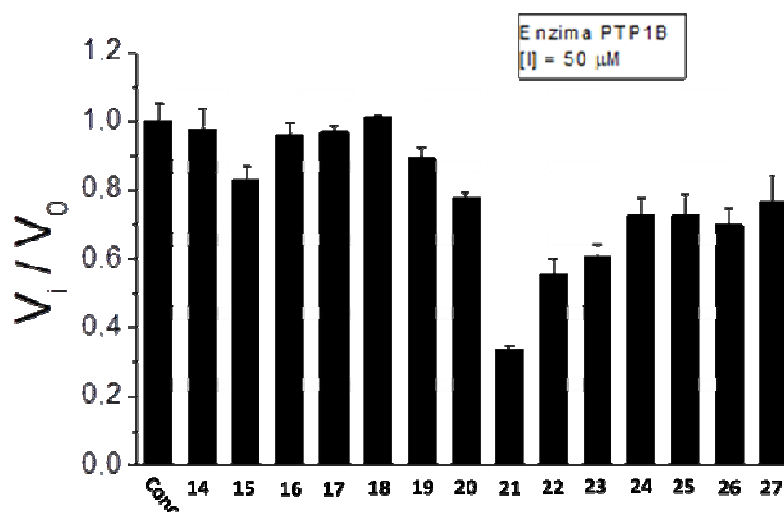


Figura 1.32 – Attività inibente dei composti **14-27** nei confronti della PTP1B ricombinante umana, alla concentrazione di 50 μM .

I due hits **21** e **22** presentano tra loro alcune somiglianze strutturali, in particolare la presenza di un legame amidico adiacente ad un anello benzenico, una funzionalità acida (il gruppo carbossilico in **22** ed il bioisotero tetrazolo in **21**) e un secondo anello nella posizione *meta* dell'anello benzenico. Nell'interazione con la PTP1B, il gruppo acido e l'anello a cui è legato possono mimare le interazioni del residuo di pTyr con residui aminoacidici del sito catalitico, mentre la porzione lipofila costituita dall'anello benzenico carbamoil-sostituito e dal suo sostituito ciclico possono instaurare interazioni con regioni circostanti il sito catalitico, in particolare con la tasca secondaria non catalitica di legame per l'arilfosfato.

Partendo da queste osservazioni e dai risultati preliminari di inibizione enzimatica, i composti **21** e **22** sono stati assunti come lead compounds per la progettazione di acidi 2-arilcarbamoilbenzoici (**28a-q**, Figura 1.33) come nuovi inibitori della PTP1B. Nei composti **28** sono state incluse porzioni strutturali potenzialmente favorevoli all'interazione con l'enzima target e che potrebbero migliorare la potenza inibente rispetto ai composti "hits" di partenza. In particolare: a) è presente il residuo dell'acido benzoico, che può fungere efficacemente da gruppo pTyr-mimetico, analogamente al residuo dell'acido *p*-metilbenzoico presente sull'N-3 dell'anello tiazolidinonico dei

composti **1-6**; b) in analogia ai composti **21** e **22**, è presente un gruppo amidico a cui è legata una porzione lipofila, potenzialmente in grado di interagire con loop adiacenti il sito catalitico e/o con la tasca secondaria non catalitica. Questa porzione lipofila è stata diversamente funzionalizzata, variando le caratteristiche elettroniche, lipofile e steriche dei sostituenti che includono sempre un anello di natura aromatica o alifatica (Figura 1.33).

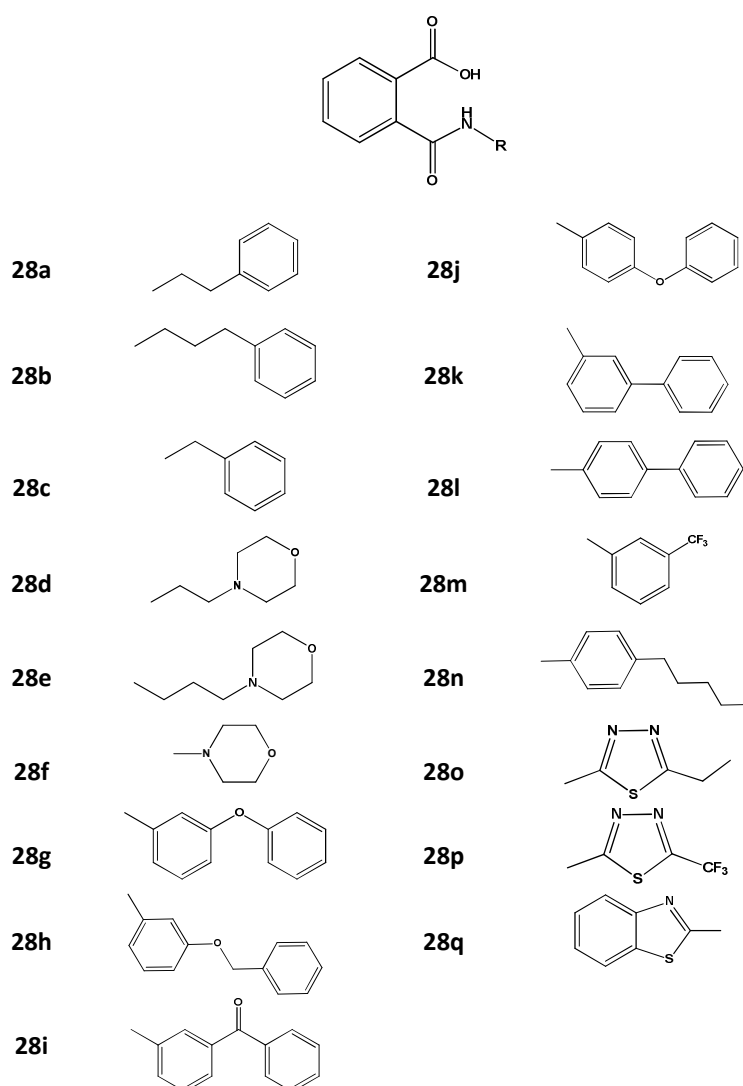
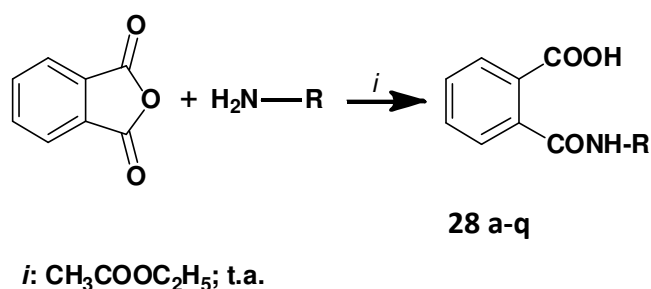


Figura 1.33 – Struttura degli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici **28 a-q**.

Gli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici **28a-q** sono stati sintetizzati per reazione dell'anidride ftalica con l'opportuna amina, in acetato di etile a temperatura ambiente; dopo aver mantenuto la miscela di reazione sotto agitazione per 3-5 ore ed aver evaporato il solvente a pressione ridotta, il grezzo ottenuto viene cristallizzato da etere etilico o da metanolo per fornire il corrispondente composto **28** puro (Schema 1.7).

In queste condizioni di reazione non si assiste alla formazione di imidi ftaliche N-aril sostituite, che derivano dall'addizione nucleofila intramolecolare tra l'NH amidico e il carbossile degli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici **28**. Le ftalimidi invece vengono prodotte, in percentuali variabili, per riscaldamento a refluxo della miscela di reazione o eseguendo la sintesi in solventi protici come gli alcoli.



Schema 1.7 – Sintesi degli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici **28**.

Le strutture dei composti **28** sono state attribuite sulla base dei loro dati analitici e spettroscopici (v. Parte sperimentale).

Negli spettri ¹H NMR, è presente un segnale attribuibile alla risonanza dell'NH amidico. Lo splitting e il range di questo segnale variano in funzione del sostituente legato all'atomo di azoto. Infatti, nei composti **28 a-e** si presenta come un tripetto/multipletto, nel range 8.25 ppm e 8.95 ppm, evidenziando l'accoppiamento con i protoni del gruppo metilenico adiacente. Negli spettri ¹H NMR dei composti **28 g-q**, nei quali l'NH amidico è legato ad un sistema aromatico, si osserva un singoletto nel range tra 10.25 ppm e 10.76 ppm; a causa del rapido scambio protonico tra l'NH

amidico e il gruppo carbossilico, in questi spettri si osserva un singolo segnale attribuibile a entrambi i protoni. Negli spettri ^{13}C NMR, sono diagnostici i segnali dovuti alla risonanza dei differenti gruppi carbonilici, di cui quello carbossilico cade a circa 167.5 ppm e quello amidico a 172.8-173.4 ppm. Nel caso del derivato 3-benzoil sostituito **28i**, è presente un ulteriore segnale a 194.5 ppm attribuibile al carbonile benzofenonico.

Gli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici **28 a-q** sono stati sottoposti alla valutazione in vitro della loro attività inibente nei confronti della PTP1B ricombinante umana, con lo stesso procedimento descritto sopra. Il saggio è attualmente in corso e i risultati di inibizione enzimatica non sono ancora disponibili.

Capitolo 2

PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE DI “DESIGNED MULTIPLE LIGANDS” COME POTENZIALI FARMACI PER IL TRATTAMENTO DEL DIABETE MELLITO E DELLE SUE COMPLICANZE

2.1 - “MULTI-TARGET DRUGS”: UN PARADIGMA EMERGENTE NELLO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

I farmaci in uso oggi sono stati scoperti, per la maggior parte, sulla base del concetto solitamente indicato come “una molecola – un target – una malattia”, che ha dominato la ricerca farmaceutica soprattutto fino alla fine del XX secolo, portando a risultati di fondamentale importanza, e che verosimilmente verrà seguito anche negli anni a venire. L’ipotesi di base che supporta questa strategia è che, indirizzando un composto attivo verso un unico target molecolare, si possono ottenere farmaci potenzialmente privi di effetti collaterali dovuti ad azioni interferenti su altri bersagli. Tuttavia, è sempre possibile che compaiano effetti indesiderati o tossici non previsti in fase di progettazione; inoltre, oggi è noto che molti farmaci progettati per agire su un singolo bersaglio devono in realtà la loro azione terapeutica ad effetti multipli su più di un bersaglio: ne sono esempi alcuni farmaci antiinfiammatori, antidiabetici, antitumorali [Csermely 2005; Costantino 2017]. Nello stesso tempo, bisogna tenere presente che, nonostante i notevoli sforzi della ricerca, per alcune malattie particolarmente complesse non sono ancora disponibili terapie del tutto adeguate [Gattrell 2013; Costantino 2017].

Tutte queste considerazioni hanno spinto la ricerca verso nuovi approcci, tra cui il design di agenti multi-target che oggi rappresenta una nuova frontiera nello sviluppo dei farmaci.

E’ ormai accertato che malattie complesse, come il diabete mellito (DM), il cancro, l’ipertensione, l’aterosclerosi, il morbo di Alzheimer, presentano una etiopatogenesi

multifattoriale e, di conseguenza, nell'ultimo decennio, si è affermata l'idea che queste patologie possano ricevere trattamenti più idonei impiegando farmaci capaci di modulare simultaneamente un determinato numero di bersagli selezionati ("multi-target drugs") [Morphy 2005; Csermely 2005; Hopkins 2008; Gattrell 2013; Bansal 2014; Fu 2017; Costantino 2017].

La strategia multi-target, che rientra nell'ambito della cosiddetta "polifarmacologia", è stata proposta come una possibile alternativa alla somministrazione di più farmaci in associazione. Infatti, la terapia polifarmacologica può essere messa in atto impiegando associazioni di farmaci diversi, somministrati in formulazioni farmaceutiche distinte o combinati in un'unica formulazione, oppure con l'impiego di un unico farmaco capace di svolgere simultaneamente azioni multiple su più bersagli biologici coinvolti nella patologia (Figura 2.1).

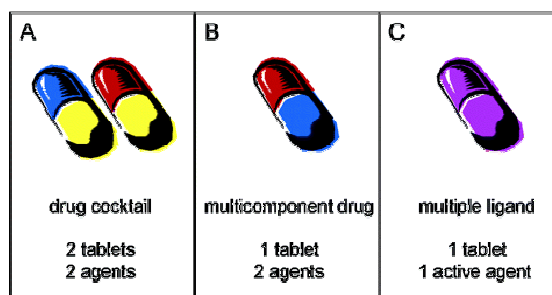


Figura 2.1 - I tre principali tipi di terapia multi-target [Morphy 2005].

Le terapie che fanno uso di cocktail di farmaci, per quanto oggi siano impiegate per il trattamento di numerose patologie, possono presentare una serie di inconvenienti. Infatti, possono essere limitate dai possibili rischi dovuti ad interazioni tra i farmaci o essere compromesse dalla scarsa compliance dei pazienti o dalla variabilità dei risultati, dovuta alle complesse relazioni tra farmacocinetica e farmacodinamica dei diversi componenti [Morphy 2005; Csermely 2005; Hopkins 2008]. Al contrario, la somministrazione di un singolo farmaco con azioni multiple mirate al trattamento di

una determinata patologia presenta dei vantaggi, sia in termini tecnologici sia per quanto riguarda gli aspetti farmacocinetici.

Recenti studi suggeriscono inoltre che agenti multi-target possono presentare un'efficacia terapeutica maggiore rispetto a farmaci selettivi, che a volte si rivelano insufficienti: infatti, nonostante gli agenti multi-target siano spesso ligandi con affinità relativamente bassa per i loro bersagli, la parziale inibizione di un numero ristretto di targets selezionati, in particolare enzimi, può risultare più efficace rispetto al totale controllo di un singolo target [Csermely 2005; Hopkins 2008].

I farmaci multi-target hanno ricevuto finora svariate definizioni, come "dual ligands", "multiple blockers", "promiscuous drugs", "pan-agonists". Uno dei termini che definiscono meglio questo tipo di molecole bioattive è quello coniato da Morphy e Rankovic, i quali hanno proposto il termine "designed multiple ligands" (DMLs) per indicare composti il cui profilo biologico multiplo sia stato progettato razionalmente per il trattamento di una determinata patologia, con il preciso obiettivo di controllare simultaneamente più meccanismi patogenetici correlati alla malattia e di migliorare così l'efficacia e/o la sicurezza d'uso rispetto a farmaci strettamente selettivi. I DMLs non possono quindi essere confusi con ligandi genericamente non selettivi, cioè agenti che, accanto all'azione sul target desiderato, presentano attività non trascurabili nei confronti di altri bersagli non correlati alla patologia, che possono dare origine ad effetti collaterali indesiderati [Morphy 2005].

La progettazione razionale di DMLs presenta indubbiamente delle difficoltà, che nascono a) dalla necessità di mettere a punto dei metodi che possano validare l'approccio multiplo rivolto a determinati targets, permettendo di verificare se gli effetti prodotti sono quelli desiderati, b) dallo studio delle strutture dei siti di binding dei bersagli selezionati e dei requisiti farmacoforici dei ligandi, che devono avere degli aspetti comuni. Inoltre, la successiva fase di studio delle SAR multiple e di ottimizzazione, mantenendo proprietà drug-like nei composti finali, è certamente più complessa rispetto allo sviluppo di farmaci diretti ad un singolo target [Morphy 2005; Hopkins 2008; Costantino 2017].

E' possibile progettare agenti multi-target attraverso approcci che nascono dalla conoscenza già acquisita dei bersagli che devono essere modulati. Queste strategie di drug design possono essere "target-based", cioè basate sulla conoscenza delle strutture dei siti attivi dei targets selezionati, oppure "ligand-based", cioè basate su modelli farmacoforici che presuppongono quindi l'esistenza di composti capaci di interagire con ciascun bersaglio [Costantino 2017]. Recentemente, è emerso anche un approccio diverso, basato su moderni screening fenotipici, che permettono contemporaneamente l'individuazione di agenti multi-target e la selezione dei relativi bersagli. Lo screening fenotipico è un saggio che valuta gli effetti (o fenotipi) che una sostanza induce in cellule, tessuti o modelli in vivo rappresentativi di una data patologia, indipendentemente dal target, permettendo l'individuazione di nuove entità molecolari strutturalmente e meccanicisticamente differenti; una volta individuata una molecola attiva, se ne studia il meccanismo d'azione e si individuano quindi i bersagli molecolari sui quali il composto agisce producendo gli effetti farmacologici osservati. E' un processo che ricorda i saggi in vivo che nel passato, partendo spesso da approcci "random", condussero alla scoperta di importanti farmaci. Anche di recente, nel decennio 1999-2008, il 37% dei nuovi composti attivi approvati dalla FDA sono stati individuati attraverso screening fenotipici. Strategie "ibride" che combinano screening fenotipici e progettazione "target-based" sono considerate utili per aumentare il grado di successo della ricerca di nuove classi di molecole dotate di effetti terapeutici [Costantino 2017].

Tra le strategie per la progettazione razionale di DMLs, quelle "target-based" e "ligand-based" rientrano nei cosiddetti "knowledge-based approaches", basati su dati biologici relativi a farmaci noti o ai bersagli scelti, mentre gli screening fenotipici rientrano nei cosiddetti "screening approaches", che coinvolgono la valutazione di librerie di composti più o meno ampie per l'individuazione di composti attivi.

Per ottenere DMLs, una strategia di drug design frequentemente impiegata assume come base di partenza la conoscenza dei distinti farmacofori di agenti attivi su ciascuno dei singoli bersagli e consiste nell'integrazione di tali elementi farmacoforici in un'unica struttura per ottenere molecole "ibride". L'ibridizzazione deve avvenire in

modo che gli elementi farmacoforici inseriti nel DML mantengano la capacità di interagire con specifici siti di ciascun target, agendo simultaneamente sui bersagli selezionati e producendo così gli effetti desiderati.

Le strategie per integrare due farmacofori in un DML possono essere diverse (Figura 2.2). Si possono coniugare i due farmacofori (“conjugated-pharmacophore”) connettendoli attraverso opportuni linker, anche metabolicamente instabili cioè che possono venire rimossi in vivo per liberare i due farmaci-parent. Per ottenere molecole di dimensioni contenute e quindi dotate di proprietà drug-like più appropriate, si preferisce spesso sovrapporre parzialmente i due farmacofori; in base al minore o maggiore grado di sovrapposizione, la struttura ottenuta viene definita come “fused-pharmacophore” o “merged-pharmacophore”, rispettivamente (Figura 2.2) [Fu 2017].

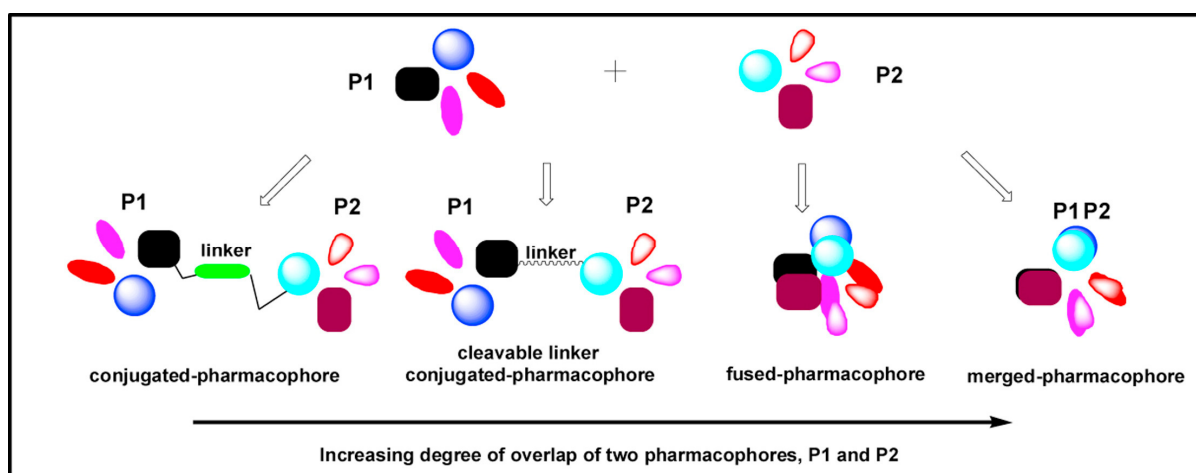


Figura 2.2 – Modelli multi-farmacoforici di tipo diverso, ottenuti dall’integrazione di due distinti farmacofori [Fu 2017].

Applicando i diversi approcci possibili per il design di DMLs, è abbastanza raro che venga identificato un lead compound con attività appropriata verso entrambi i bersagli designati (A e B, Figura 2.3); è invece più probabile che si ottengano inizialmente composti altamente attivi verso uno solo dei due targets (con scarsa attività sull’altro) oppure moderatamente selettivi in grado di agire in una certa misura su entrambi i bersagli prescelti.

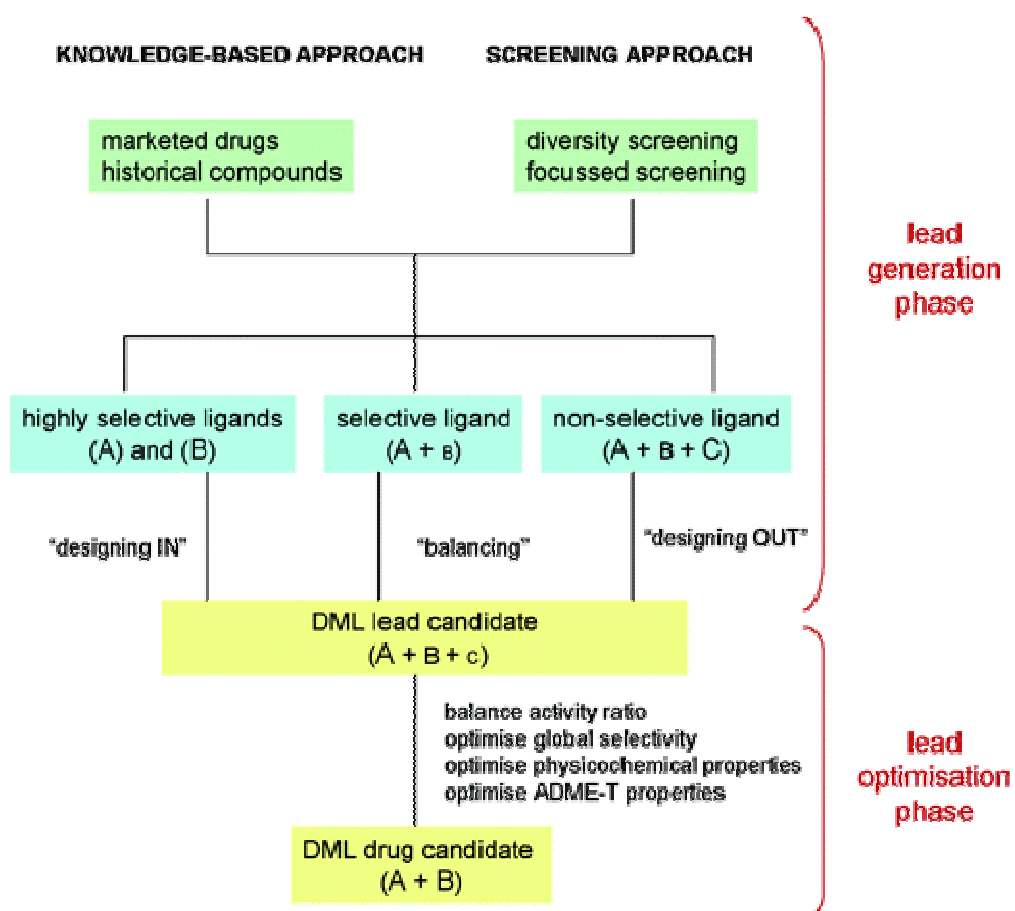


Figura 2.3 - Strategie di progettazione di DMLs (designed multiple ligands) [Morphy 2005].

Per migliorare le caratteristiche del lead, gli stadi successivi del processo di drug design possono coinvolgere approcci diversi definiti come: a) "designing in", b) "balancing" e c) "designing out" (Figura 2.3).

Il processo indicato in Figura 2.3 come "designing in" coincide sostanzialmente con quello descritto sopra come ibridizzazione, cioè elementi strutturali di ligandi selettivi per ciascuno dei due bersagli vengono combinati in una singola molecola, legati tramite opportuni linkers, oppure fusi o ricombinati per sovrapposizione di parti strutturali comuni, per dare origine a molecole più piccole e semplici che presentino

affinità verso i due bersagli. Questo processo può riguardare sia la fase iniziale che porta all'identificazione di DMLs come lead compounds, sia la successiva fase di potenziamento dell'attività della molecola ibrida, in cui si possono valutare combinazioni diverse degli elementi farmacoforici.

Nel processo di "balancing", al lead compound iniziale vengono apportate modifiche strutturali che sono mirate a modulare e bilanciare l'attività verso i due target, già presente, fino a raggiungere un rapporto ottimale.

Nel caso del "designing out", infine, si pone il problema opposto al primo, cioè la necessità di apportare modifiche strutturali al DML lead che permettano di ridurre o eliminare l'attività rivolta verso altri bersagli non desiderati (C, Figura 2.3), dalla quale possono derivare effetti collaterali o tossici [Morphy 2005].

L'ulteriore fase di ottimizzazione prevede, analogamente ai più comuni farmaci diretti verso un unico bersaglio, ulteriori appropriate modifiche strutturali finalizzate a migliorare la selettività, le proprietà chimico-fisiche e la farmacocinetica dei composti attivi (Figura 2.3). Tuttavia, questa fase di ottimizzazione è più complessa e delicata rispetto a quella che riguarda farmaci attivi su un singolo bersaglio: infatti, bisogna sempre tenere presente il rischio che le successive manipolazioni della struttura possano alterare l'equilibrio tra i due profili di attività desiderati. Inoltre, ogni modifica strutturale volta a migliorare l'attività su uno o entrambi i targets può modificare le proprietà chimico-fisiche e di conseguenza il profilo farmacocinetico o determinare la comparsa di eventuali effetti indesiderati o tossici.

Un'ulteriore sfida che accompagna lo sviluppo di DMLs come farmaci è la messa a punto di saggi appropriati che, specialmente in vivo, permettano la valutazione dei molteplici effetti derivati dalla somministrazione di un ligando multi-target. A questo scopo, si stanno mettendo a punto diversi modelli con colture di cellule, che devono esprimere entrambi i bersagli molecolari del DML in esame, permettendo di valutare già in vitro se gli effetti del ligando multi-target siano di tipo additivo o sinergico. Nel caso in cui i targets siano espressi in tessuti diversi, il DML dovrà essere valutato in vivo [Gattrell 2013].

In letteratura sono presenti diversi esempi di molecole attive come DMLs, progettate principalmente come potenziali agenti antitumorali, anti-Alzheimer, antidiabetici, impiegando l'approccio basato sulla combinazione di elementi farmacoforici diversi [Morphy 2005; Bansal 2014; Fu 2017; Costantino 2017].

Il DM, e in modo particolare il DM2 che ne rappresenta la forma più diffusa, è una patologia multifattoriale, caratterizzata da un progressivo deterioramento dei sistemi deputati all'omeostasi glicemica. La condizione di iperglicemia, caratteristica di tutte le forme di DM, determina una serie di squilibri metabolici, a cui seguono, nel tempo, la comparsa di alterazioni a carico di vari distretti micro- e macrovascolari e il conseguente sviluppo di gravi complicazioni croniche, come sarà descritto più dettagliatamente nel paragrafo seguente.

Non potendo disporre di trattamenti causali che possano portare ad una remissione completa della malattia, l'approccio terapeutico è volto principalmente a controllare i livelli glicemici, mantenendoli il più possibile vicini ai valori fisiologici, con l'impiego di farmaci antidiabetici orali e/o con la somministrazione di insulina. Nel caso del DM2, le linee guida internazionali raccomandano l'uso di combinazioni di farmaci quando la monoterapia con farmaci antiperglicemizzanti orali non riesca a mantenere un adeguato controllo della glicemia, evento che può verificarsi con elevata probabilità nel corso del trattamento.

I problemi che possono accompagnare il trattamento con associazioni di farmaci, anche combinati in un'unica formulazione farmaceutica, di cui si è discusso sopra, incidono particolarmente sulla terapia antidiabetica, che deve garantire il mantenimento di livelli glicemici ottimali durante tutto l'arco della giornata, obiettivo non facile da raggiungere, e che inoltre deve essere seguita scrupolosamente dal paziente per tutta la vita.

Nel tentativo di risolvere questi problemi, è stato recentemente suggerito che la progettazione di DMLs capaci di agire simultaneamente su due o più targets coinvolti nei meccanismi eziopatogenetici del DM2 e delle sue complicanze possa rappresentare una strategia innovativa, utile per l'individuazione di nuovi agenti antidiabetici.

Nonostante la progettazione di DMLs comporti obiettivamente una serie di difficoltà, la necessità di individuare nuovi regimi terapeutici per il DM2 ha spinto diversi gruppi di ricerca ad intraprendere questo percorso impegnativo.

Un esempio recente di DMLs diretti al trattamento del DM2 è rappresentato da composti in cui sono stati combinati l'azione agonista verso il recettore GPR119, che aumenta la secrezione del glucagon-like peptide-1 (GLP-1) da parte delle cellule endocrine L intestinali, e l'azione inibente verso la serina proteasi dipeptidil peptidasi IV (DPP-IV), che inattiva velocemente il GLP-1 [Gattrell 2013]. Il GLP-1 è un'incretina in grado di stimolare il rilascio di insulina da parte delle cellule β pancreatiche e di inibire la produzione di glucagone, producendo così un abbassamento dei livelli glicemici. La combinazione in un'unica molecola dell'azione incretino-secretagoga con l'azione inibente verso la DPP-IV ha prodotto risultati incoraggianti in modelli animali [Gattrell 2013].

Nel contesto della ricerca rivolta all'identificazione di nuovi DMLs come potenziali antidiabetici, si inserisce l'idea che inibitori duplici dell'aldoso reduttasi (ALR2), enzima coinvolto nello sviluppo delle complicazioni croniche associate al DM, e della PTP1B possano rappresentare potenziali agenti innovativi per la terapia del DM e, al tempo stesso, per il controllo o la prevenzione delle patologie associate.

2.2 - L'ALDOSE REDUTTASI, ENZIMA CHIAVE NELLO SVILUPPO DELLE COMPLICANZE DIABETICHE E DI ALTRE PATOLOGIE DI NATURA INFIAMMATORIA

L'aldoso reduttasi (ALR2; AKR1B1) è un enzima citoplasmatico appartenente alla classe delle aldo-cheto reduttasi (AKR), presente nella maggior parte delle cellule umane. Nel corso degli ultimi quattro decenni, questo enzima è stato ampiamente studiato, in quanto coinvolto in modo determinante nell'insorgenza e nella progressione di diverse patologie associate al DM.

Nel DM, l'iperglicemia prolungata e la resistenza all'insulina provocano danni neurologici e vascolari, alterazioni a livello della segnalazione cellulare e insorgenza di

complicanze a lungo termine, come retinopatia, cataratta, neuropatia, nefropatia, aterosclerosi e aumentato rischio di malattie cardiovascolari, che sono le principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti diabetici. La normalizzazione della glicemia, mediante tempestive terapie con opportuni agenti anti-iperglicemizzanti, permette generalmente di ritardare lo sviluppo delle complicanze diabetiche a lungo termine causate da danno microvascolare, senza riuscire tuttavia a ridurre l'aumentato rischio cardiovascolare derivante da lesioni macrovascolari. Di conseguenza, la comparsa di queste patologie debilitanti sembra essere inevitabile nella maggior parte dei pazienti diabetici; ciò avviene anche in considerazione del fatto che, nel momento in cui il DM2 viene diagnosticato, l'iperglicemia può essersi instaurata da tempo a livelli asintomatici e quindi alcuni dei danni tissutali causati da tale condizione possono già essersi verificati. Questo rende l'identificazione di nuovi farmaci utili per il trattamento delle complicazioni diabetiche un'esigenza terapeutica urgente.

E' stato dimostrato che, alla base del danno tissutale provocato dall'iperglicemia, ci sono diversi meccanismi cellulari, connessi tra loro, di cui i principali sono: l'incrementato flusso di glucosio metabolizzato attraverso le vie dei polioli e dell'esosamina, l'aumento della produzione intracellulare di prodotti di glicazione (advanced glycation-end products, AGEs), l'anormale attivazione della protein chinasi C (PKC) (Figura 2.4) [Brownlee 2001, 2005]. L'attivazione di queste differenti vie metaboliche è la conseguenza di un unico evento intracellulare indotto dall'iperglicemia, che è stato identificato nell'aumentata produzione di superossido da parte della catena di trasporto elettronico mitocondriale. Anche l'insulino-resistenza è coinvolta nell'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei mitocondri delle cellule endoteliali macrovascolari, attraverso l'aumentato flusso di acidi grassi liberi che vanno incontro ad ossidazione [Brownlee 2005].

L'aumento della produzione di superossido mitocondriale è ritenuta responsabile dell'inibizione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e del conseguente incremento della concentrazione di gliceraldeide-3-fosfato che, a sua volta, contribuisce alla formazione degli AGEs e all'attivazione della PKC. L'inibizione della GAPDH provoca anche un aumento dei livelli di fruttosio, il quale è uno dei principali

agenti glicanti e partecipa alla formazione degli AGEs (Figura 2.4) [Brownlee 2001, 2005]. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che oligonucleotidi antisenso della GAPDH causano un identico aumento intracellulare negli AGEs, anche in assenza di iperglicemia.

Nella via dell'esosammina, il fruttosio-6-fosfato proveniente dalla glicolisi viene convertito in glucosamina-6-fosfato dall'enzima glutamina-fruttosio-6-fosfato amidotransferasi (GFAT) (Figura 2.4). Successivamente, la N-acetilglucosamina che si forma viene trasferita a residui di serina e treonina di fattori di trascrizione. L'attivazione della via dell'esosammina dovuta all'iperglicemia può quindi provocare cambiamenti sia nell'espressione genica che nella funzione delle proteine, contribuendo alla patogenesi delle complicazioni diabetiche [Brownlee 2001, 2005].

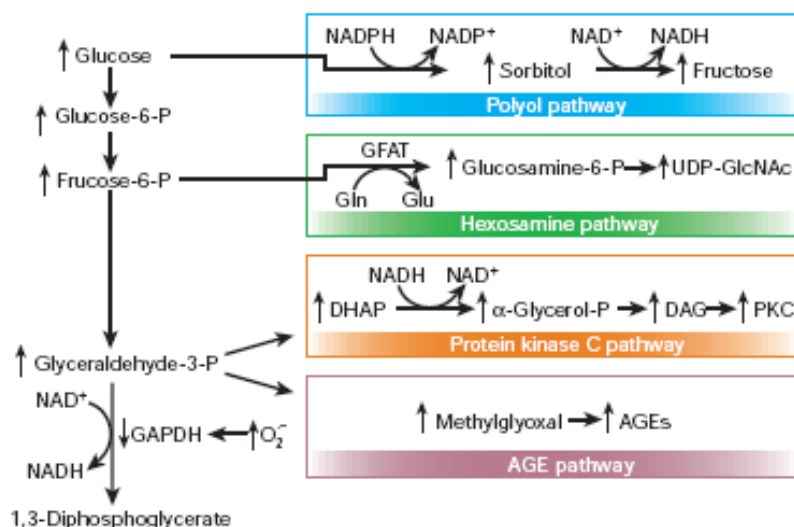


Figura 2.4 - Principali meccanismi di danno tissutale indotto da iperglicemia [Brownlee 2001].

Tra i meccanismi che mediano il danno tissutale indotto dall'iperglicemia, l'aumento del flusso di glucosio attraverso la via dei polioli gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo delle complicanze diabetiche croniche. L'ALR2 è l'enzima limitante la velocità

di questa via metabolica, nella quale catalizza la riduzione NADPH-dipendente del glucosio a sorbitolo. Quest'ultimo viene successivamente ossidato a fruttosio da una sorbitolo deidrogenasi (SDH), con concomitante riduzione di NAD^+ (Figura 2.5) [Brownlee 2001].

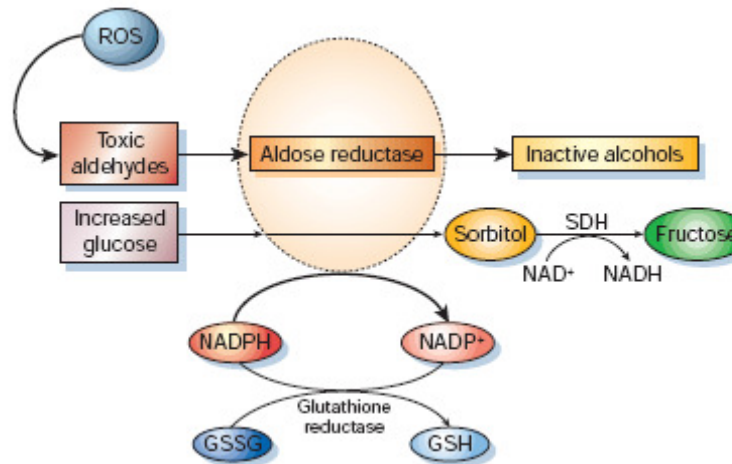


Figura 2.5 - Via dei polioli [Brownlee 2001].

In condizioni euglicemiche, la metabolizzazione del glucosio attraverso questa via è piuttosto limitata (meno del 3% della quantità di glucosio totale), in quanto l'ALR2 presenta un'affinità relativamente bassa nei confronti di questo substrato. Normalmente, infatti, il glucosio entra principalmente nella via glicolitica, dopo essere stato convertito a glucosio-6-fosfato grazie all'azione della esochinasi, enzima verso il quale ha un'affinità nettamente maggiore rispetto all'ALR2.

D'altra parte, il ruolo fisiologico principale dell'ALR2 sembra essere la riduzione di aldeidi tossiche, a catena media o lunga, che hanno origine dalla perossidazione lipidica, come il 4-idrossi-2-nonenale (HNE), e i loro prodotti di condensazione con il glutatione. L'ALR2 ha affinità per una grande varietà di substrati carbonilici aromatici e alifatici, di cui catalizza la riduzione NADPH-dipendente, ed è accertato che la sua efficacia catalitica è nettamente superiore verso aldeidi idrofobiche sature o insature

piuttosto che verso gli aldosi, in particolare il glucosio. Un'altra funzione dell'ALR2 sembra essere la modulazione dell'osmolarità cellulare, attraverso la produzione di composti osmoticamente attivi, come il sorbitolo, a livello dei reni. Inoltre, recentemente è emerso un coinvolgimento dell'ALR2 anche nella crescita e nella segnalazione cellulare, indicando che l'enzima può svolgere altre funzioni fisiologiche [Srivastava 2005; Ramana 2006; Del Corso 2008].

In condizioni di iperglicemia, come nel DM, in seguito alla saturazione dell'esochinasi, l'eccesso di glucosio intracellulare subisce la conversione a sorbitolo catalizzata dall'ALR2 nella via dei polioli, principalmente nei tessuti ed organi che possiedono un assorbimento del glucosio insulino-indipendente, come cristallino, retina, nervi periferici, rene, eritrociti. Il significativo aumento del flusso di glucosio nella via dei polioli attiva diverse vie di segnalazione cellulare, tra cui quella infiammatoria, dando origine ad una complessa cascata di eventi che possono culminare in danni tissutali e vascolari; in particolare, si verificano danni endoteliali, riduzione del flusso di sangue ai nervi, diminuzione della velocità di conduzione nervosa, che contribuiscono in modo determinante alla comparsa delle complicanze croniche associate al DM (Figura 2.6) [Brownlee 2001; Oyama 2006; Alexiou 2009; Maccari 2015].

Nel cristallino, lo stress osmotico conseguente all'accumulo intracellulare di sorbitolo, molecola osmoticamente attiva, provoca gonfiore e cambiamenti di permeabilità della membrana che promuovono la comparsa della cataratta (Figura 2.6). Negli altri tessuti, come ad esempio nei vasi sanguigni, nei nervi e nella retina, il danno indotto dall'iperglicemia attraverso l'attivazione della via dei polioli, invece, è mediato prevalentemente dalla maggiore suscettibilità delle cellule allo stress ossidativo. Infatti, in condizioni iperglicemiche, l'aumentata conversione del glucosio a sorbitolo catalizzata dall'ALR2, con la contemporanea ossidazione del NADPH, causa una deplezione significativa di questo coenzima che, di conseguenza, compromette l'attività di altri enzimi NADPH-dipendenti, in particolare della glutatione reduttasi. Si verifica così uno squilibrio tra la produzione di ROS e l'azione degli antiossidanti deputati alla difesa cellulare, come il glutatione. In concomitanza, l'alterato rapporto NADH/NAD⁺ (descritto come "pseudoipossia"), che deriva dal consumo di NAD⁺ da

parte della sorbitolo deidrogenasi durante l'ossidazione del sorbitolo a fruttosio, comporta ulteriori cambiamenti metabolici e di segnalazione, esacerbando così lo squilibrio redox.

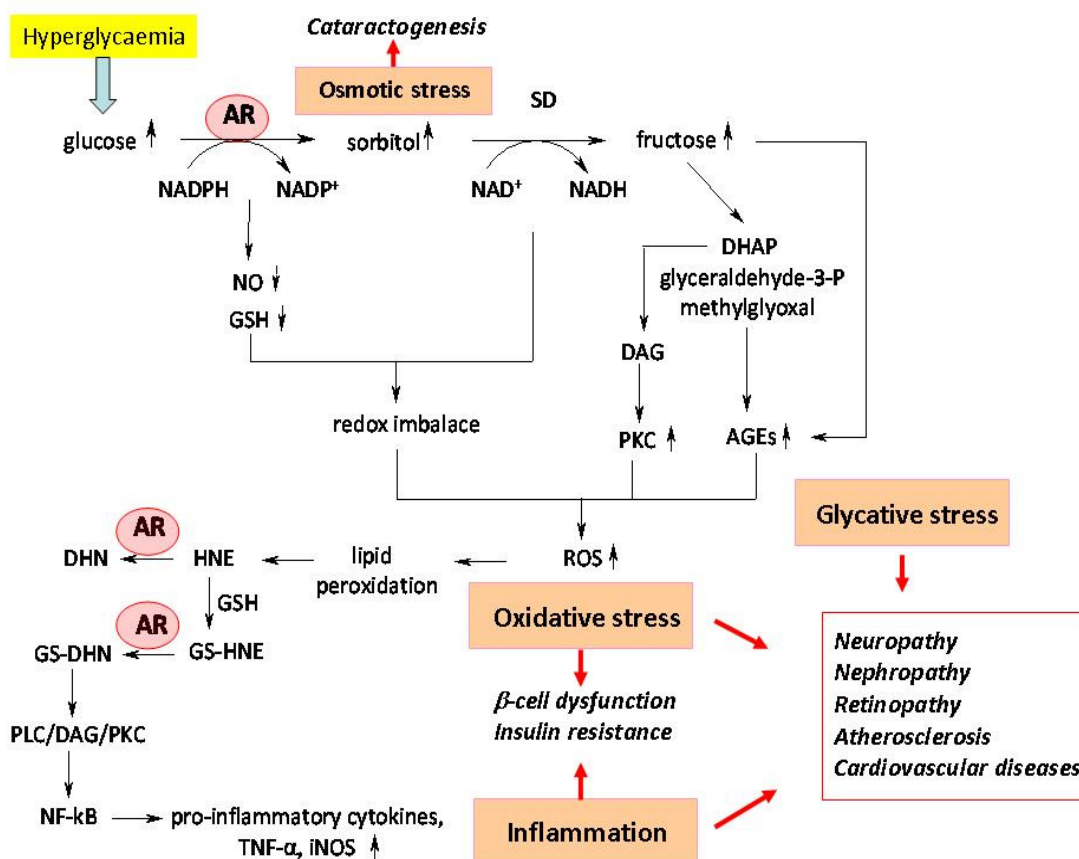


Figura 2.6 - Ruolo dell'AR nello sviluppo delle complicazioni diabetiche [Maccari 2015].

L'aumento del flusso di glucosio metabolizzato attraverso la via dei polioli produce anche uno stress glicativo, promuovendo la formazione intracellulare di AGEs. Infatti, il prodotto finale della via dei polioli, il fruttosio, è un agente glicante più efficace rispetto al glucosio ed è in grado di reagire con i gruppi amminici delle proteine per formare basi di Schiff, che, a loro volta, attraverso una serie di reazioni, danno origine agli AGEs. Questi ultimi possono alterare le funzioni delle proteine, oltre ad ostacolare la segnalazione cellulare e, allo stesso tempo, contribuiscono alla produzione

intracellulare di ROS, incrementando così lo stress ossidativo intracellulare [Costantino 1999; Maccari 2010].

Dal fruttosio hanno origine anche altri composti carbonilici reattivi, come diidrossiacetone fosfato (DHAP), gliceraldeide-3-fosfato e metilgliossale, che contribuiscono ulteriormente alla formazione di AGEs (Figure 2.4 e 2.6). Inoltre, il DHAP viene ridotto a glicerolo-3-fosfato, che è un precursore del diacilglicerolo (DAG), il quale, a sua volta, attiva la protein chinasi C (PKC) che promuove la produzione intracellulare di ROS [Brownlee 2001; Ramana 2005, 2006].

In condizioni iperglicemiche, la perossidazione lipidica indotta dai ROS con formazione di aldeidi citotossiche, come HNE, è una delle più importanti conseguenze dell'aumentato stress ossidativo. L'HNE causa la sovraregolazione dell'ALR2, dando origine ad un feedback positivo che, attraverso l'aumentata attività dell'enzima, amplifica lo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia.

A causa della sua elevata reattività, l'HNE può agire come secondo messaggero citotossico in grado di propagare il segnale ossidativo. Infatti, ad alte concentrazioni, è in grado di reagire con vari nucleofili cellulari, come residui amminoacidici di proteine. Le proteine HNE-modificate possono provocare danni tissutali e sono state utilizzate anche come marcatori dello stress ossidativo; la loro presenza è stata riconosciuta in diverse condizioni patologiche, come aterosclerosi, malattie neurodegenerative e autoimmuni [Srivastava 2011; Shoeb 2014; Castro 2017].

L'ALR2 svolge parte della sua azione detossificante convertendo l'HNE e il suo addotto con glutazione GS-HNE a 1,4-diidrossinonene (DHN) e GS-DHN, rispettivamente. Tuttavia, queste reazioni di riduzione, se da un lato proteggono i tessuti dall'azione citotossica dell'HNE, dall'altro sono responsabili della produzione di altri mediatori di stress ossidativo, principalmente del GS-DHN. Infatti, in presenza di glutazione intracellulare, l'HNE reagisce velocemente formando il GS-HNE, che è quindi il metabolita predominante derivato da HNE. Il GS-HNE è la sola molecola che può essere convertita in GS-DHN, poiché il DHN libero è incapace di reagire con nucleofili quali il glutazione. Pertanto, a seguito della riduzione del GS-HNE catalizzata dall'ALR2, si

generano notevoli quantità di GS-DHN e, infatti, l'inibizione dell'ALR2 è in grado di ridurre i livelli cellulari di questo metabolita [Srivastava 2000; Shoeb 2014].

Recenti studi hanno dimostrato che il GS-DHN agisce come un potente mediatore della via di segnalazione cellulare indotta dallo stress ossidativo, attivando la cascata fosfolipasi C (PLC)/DAG/PKC/fattore di trascrizione nucleare κ B (NF- κ B) (Figura 2.6). L'attivazione del fattore NF- κ B è un evento cruciale nella risposta infiammatoria, in quanto regola la trascrizione di numerosi geni che determinano l'espressione di citochine proinfiammatorie, molecole di adesione, fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), e NO sintasi inducibile (iNOS). L'infiammazione e lo stress ossidativo che ne derivano possono promuovere l'apoptosi delle cellule endoteliali, l'iperplasia vascolare, l'infiltrazione e l'adesione delle cellule infiammatorie alle pareti vascolari, tutti eventi coinvolti in serie complicanze associate al DM, quali l'aterosclerosi, la nefropatia diabetica, la retinopatia diabetica e l'ischemia del miocardio [Evans 2002; Ramana 2004, 2005; Reddy 2010; Roy 2017; Zhang 2017].

L'infiammazione svolge un ruolo chiave non solo nell'etiopatogenesi delle complicanze diabetiche, ma anche nello sviluppo del DM stesso. Infatti, l'espressione di iNOS, indotta da citochine infiammatorie, contribuisce a determinare una ridotta segnalazione di insulina nei tessuti bersaglio, esacerbando l'insulino-resistenza tipica del DM2. Inoltre, come discusso nel Capitolo 1, il TNF- α è in grado di indurre la sovraespressione della PTP1B, enzima con un ruolo cruciale nei meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo del DM2. In accordo a ciò, è stato dimostrato in modelli animali che infiammazione e insulino-resistenza possono essere associati con la produzione di HNE e dei suoi metaboliti GS-HNE e GS-DHN, indotta negli adipociti da elevati livelli di glucosio e dallo stress ossidativo [Frohnert 2014].

La risposta infiammatoria conseguente all'attivazione di NF- κ B può indurre anche apoptosi delle cellule β del pancreas, conducendo quindi ad una ridotta secrezione di insulina, che è tipica del DM1 ma può comparire anche nel corso del DM2 [Schmidt 2005].

È stato dimostrato che l'attivazione della via dei polioli indotta dall'iperglicemia ha un ruolo nell'attivazione della via PLC/DAG/PKC/NF- κ B, attraverso il metabolismo di HNE e la produzione di GS-DHN; infatti, l'inibizione dell'ALR2, che si trova a monte di questa cascata, può estinguere questi eventi di segnalazione, riducendo così il rischio di comparsa di danni tissutali e di alterazioni della segnalazione insulinica tipici del DM e delle sue complicanze (Figura 2.6) [Evans 2002; Ramana 2004, 2005; Reddy 2010].

Recentemente, è stato individuato un nuovo meccanismo mediato dall'ALR2 coinvolto nella cascata infiammatoria. L'aumentato flusso di glucosio nella via dei polioli diminuisce anche il rapporto NAD⁺/NADH e, in topi diabetici, si è osservato che ciò compromette l'attività delle sirtuine e di altre deacetilasi NAD⁺-dipendenti. Questo, a sua volta, impedisce la deacetilazione di Egr-1 ("immediate early response gene") mediata dalla sirtuina-1 e mantiene questo gene nella sua forma acetilata, la quale innesca eventi protrombotici e proinfiammatori determinando disfunzione endoteliale, lesioni vascolari e aterosclerosi [Vedantham 2014].

Sulla base di tutti questi dati, è evidente il ruolo cruciale che lo stress ossidativo e l'infiammazione, indotti dall'iperglicemia, svolgono come meccanismi patogenetici implicati sia nello sviluppo delle complicanze diabetiche a lungo termine che nella carenza di insulina e nella resistenza all'ormone che si verificano nel DM. L'ALR2 si è rivelato un mediatore chiave in questi processi e ciò convalida ulteriormente questo enzima come bersaglio fondamentale per lo sviluppo di nuovi farmaci utili per la terapia di patologie associate al DM.

Inoltre, recenti studi, condotti sia in colture cellulari che in modelli animali, hanno dimostrato che l'attività dell'ALR2 è criticamente implicata nel processo infiammatorio, non solo nel DM, ma anche in condizioni normoglicemiche. Infatti, fattori diversi ed estranei al DM, come lipopolisaccaridi, citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e allergeni, possono stimolare la produzione di ROS intracellulari (Figura 2.7). In molti tipi di cellule infiammatorie, come fagociti, monociti e macrofagi, questi fattori possono attivare la NADPH ossidasi, enzima che catalizza la formazione di anioni superossido, tramite un processo di riduzione NADPH-dipendente dell'ossigeno. Gli

anioni superossido generano ulteriori ROS, che incrementano lo stress ossidativo cellulare e possono indurre perossidazione lipidica e quindi maggiore espressione dell'ALR2. Pertanto, anche in condizioni normoglicemiche, in presenza di stress ossidativo, l'ALR2 viene sovraespressa. La riduzione di aldeidi derivate dai lipidi coniugate con glutazione, come la conversione di GS-HNE a GS-DHN che è catalizzata dall'ALR2 come descritto sopra, rappresenta un evento chiave in grado di propagare lo stato ossidativo e infiammatorio attraverso l'attivazione della cascata PLC/PKC/NF- κ B (Figura 2.7). La conseguente trascrizione di numerosi geni pro-infiammatori regolati da NF- κ B amplifica e sostiene l'infiammazione e determina effetti citotossici. È stato accertato che l'inibizione dell'ALR2 è in grado di ostacolare sia l'attivazione di NF- κ B che la produzione di citochine pro-infiammatorie e mediatori dell'infiammazione, come NO, prostaglandine E₂ (PGE₂), e cicloossigenasi 2 (COX-2) in macrofagi attivati dai lipopolisaccaridi; infatti, diversi inibitori dell'enzima hanno mostrato proprietà potenzialmente utili per la cura di malattie infiammatorie [Ramana 2006; Srivastava 2011, Chang 2013; Panico 2013; Zeng 2013; Maccari 2014].

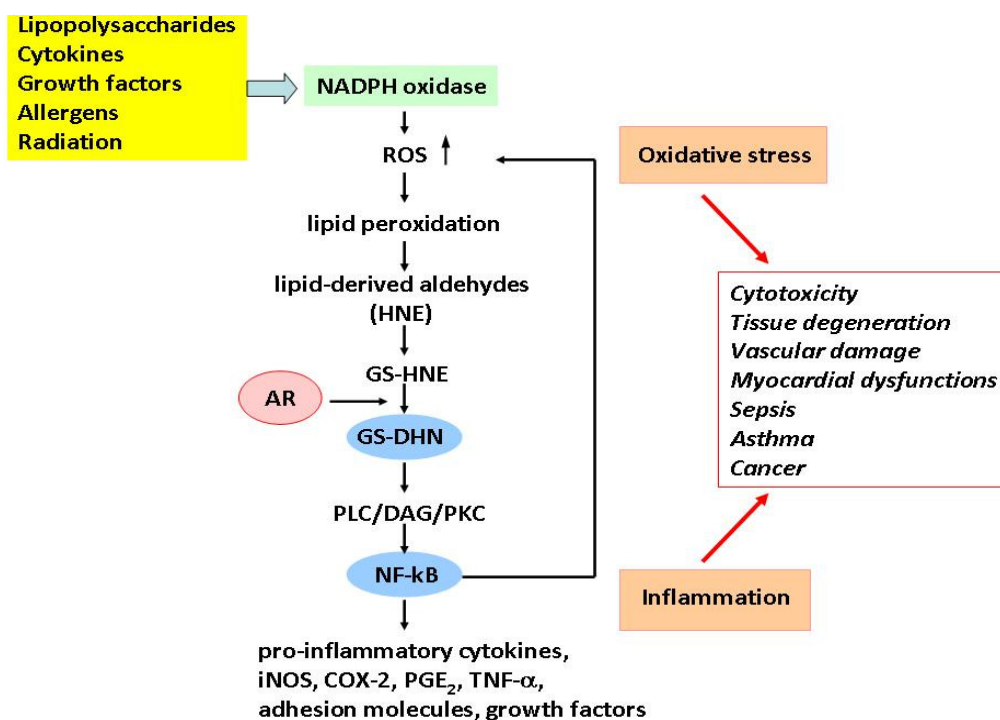


Figura 2.7 - Implicazioni dell'AR nella segnalazione infiammatoria in condizioni normoglicemiche [Maccari 2015].

Quindi l'ALR2, oltre a rivestire un ruolo chiave nella patogenesi del DM e delle sue complicanze, può contribuire in maniera determinante allo sviluppo di diverse patologie con un'importante componente infiammatoria, come artrite reumatoide, sepsi, asma, malattie cardiovascolari e cancro (Figura 2.7).

Esistono già numerose evidenze del coinvolgimento dell'ALR2 nella etiopatologia delle malattie cardiovascolari, come aterosclerosi, vasculopatie, ipertensione, disfunzione endoteliale e ischemia miocardica, in individui normoglicemici. Nell'ambito di questi studi, si è dimostrato che l'inibizione dell'ALR2 è utile per ridurre l'attivazione di NF- κ B e per attenuare la sovraregolazione delle molecole di adesione indotta dal TNF- α nelle cellule endoteliali; inoltre, vengono attenuati stress ossidativo e apoptosi, con conseguente riduzione del rischio di ischemia cardiaca. Si è dunque fatta strada l'idea che l'ALR2 possa essere presa in considerazione come target per trattare e prevenire danni vascolari e disfunzioni del miocardio non solo in pazienti diabetici, ma anche negli individui normoglicemici [Reddy 2010].

Inoltre, studi recenti hanno rivelato che l'ALR2 è sovraespressa o sovraregolata in una vasta gamma di tumori solidi e leucemie [Laffin 2012]. L'enzima risulta coinvolto nella cascata infiammatoria responsabile della cancerogenesi e può anche conferire alle cellule maligne resistenza verso alcuni farmaci antitumorali [Alexiou 2009; Laffin 2012]. E' stato quindi suggerito che inibitori dell'ALR2 potrebbero essere utili in combinazione con farmaci antitumorali noti, per diverse ragioni, tra cui la loro capacità di aumentare la sensibilità delle cellule bersaglio ai chemioterapici, la riduzione del rischio di chemioresistenza e la prevenzione di alcuni gravi effetti collaterali, come la cardiotoxicità indotta dalle antracicline [Sonowal 2017, 2018].

La riduzione di GS-HNE a GS-DHN, che, come descritto sopra, promuove la propagazione del segnale citotossico, è il principale meccanismo catalizzato dall'ALR2 nello stress ossidativo presente nella cancerogenesi. La successiva attivazione di NF- κ B promuove la trascrizione di geni responsabili della sopravvivenza, proliferazione e adesione delle cellule tumorali e dell'angiogenesi, favorendo così la progressione e l'invasività del tumore [Tammali 2011; Laffin 2012].

Nelle cellule tumorali del colon umano, l'inibizione dell'ALR2 si è dimostrata in grado di contrastare l'attivazione di NF- κ B e PKC, la sovraespressione di COX-2 e la produzione PGE₂ indotta dal TNF- α ; viene anche inibita la produzione di HNE e GS-HNE, mentre l'effetto citotossico di GS-DHN prodotto prima della somministrazione dell'inibitore dell'ALR2 non riesce ad essere contrastato [Tammali 2007]. In seguito all'inibizione dell'ALR2, viene anche indotta l'apoptosi delle cellule tumorali, tramite un processo di up-regulation di proteine pro-apoptotiche e di down-regulation di proteine utili per la sopravvivenza cellulare. Inoltre viene ridotta la produzione di fattori di crescita e di molecole di adesione che promuovono l'angiogenesi, prevenendo così la crescita e l'invasività dei tumori [Tammali 2011]. L'inibizione dell'ALR2, attraverso il controllo dello stress ossidativo e di alcune vie infiammatorie attivate dal NF- κ B, riesce anche ad attenuare i sintomi della cachessia neoplastica [Kawamura 1999].

Recentemente, la capacità di inibire la formazione e la crescita di alcuni tipi di tumore, come quello colon-rettale, mostrata da diversi farmaci antiinfiammatori non steroidei, è stata messa in relazione non solo alla loro attività inibente verso la COX, ma anche alla capacità di bloccare specifici processi catalizzati dall'ALR2 [Steuber 2011].

Nonostante i dati sull'efficacia degli inibitori dell'ALR2 siano stati ottenuti soprattutto sul cancro al colon, recenti ricerche stanno facendo luce sul coinvolgimento di questo enzima anche in altri tipi di tumore, come leucemie, cancro pancreatico, mammario ed epatico [Zhao 2017; Reddy 2017]. Nel fegato, l'ALR2 è espressa soltanto durante l'embriogenesi, mentre è assente nel fegato sano degli adulti; tuttavia, si osserva un aumento molto significativo dell'espressione dell'enzima nei tessuti tumorali epatici. È stato dimostrato che l'ALR2 sovraespressa in questi tessuti, oltre che attivare la cascata infiammatoria sopra descritta, può interagire con la proteina AKT1, con il risultato di promuovere la segnalazione AKT/mTOR che, a sua volta, culmina in un aumento dello stress ossidativo e della segnalazione infiammatoria, contribuendo così all'epatocarcinogenesi [Zhao 2017].

Nel loro insieme, questi risultati costituiscono una solida base scientifica che consente di assumere l'ALR2 come un nuovo promettente bersaglio per agenti chemioterapici e

chemio-preventivi utili per trattare il cancro e migliorare l'efficacia di alcuni farmaci antitumorali.

2.3 - STRUTTURA DELL'ALDOSE REDUTTASI

Le strutture dell'ALR2 proveniente da placenta umana e da cristallino di maiale furono risolte per mezzo della cristallografia a raggi X, per la prima volta nel 1992 [Wilson 1992; Rondeau 1992]; successivamente, sono state riportate diverse altre strutture dell'enzima co-cristallizzato con substrati e inibitori diversi, che hanno fornito preziose informazioni riguardo ai siti di legame e alle modalità di interazione di substrati e inibitori [Urzhumtsev 1997; El-Kabbani 2004].

L'ALR2 umana è costituita da una singola catena peptidica di 316 residui amminoacidici, che si ripiega formando un cilindro β/α a otto filamenti, con un piccolo foglietto β nella parte N-terminale e un'estensione C-terminale comprendente i residui 275-315. Il sito di legame del substrato si trova nella parte C-terminale, in una grande e profonda fessura, con il cofattore piridinico NADP⁺ legato sul fondo, ed è delimitato da loop che collegano i foglietti β centrali con le α -eliche esterne (Figura 2.8) [Wilson 1992].

Il cofattore NADPH è trattenuto all'interno della tasca catalitica da un loop flessibile (residui Gly213-Ser226) denominato "safety belt loop" che, attraverso modifiche conformazionali, è responsabile del legame o del rilascio del cofattore. Nella maggior parte delle strutture note dell'oloenzima è presente una conformazione "chiusa", con il cofattore parzialmente coperto dal safety belt loop e quindi bloccato nella tasca. In un piccolo numero di molecole di ALR2 oloenzima è stata osservata una conformazione parzialmente aperta di questo loop. In assenza del cofattore, invece, il safety belt loop dell'apoenzima assume una conformazione "aperta". I residui di Gly213, Ser214 e Ser226 agiscono come cardini che permettono al loop d'interconvertire la sua conformazione. Anche Trp219 gioca un ruolo chiave, stabilendo interazioni con Cys298 e Arg293 che stabilizzano rispettivamente le conformazioni "chiusa" e "aperta".

Inoltre, nella conformazione chiusa del loop, il residuo di Trp219 può instaurare interazioni efficaci con i ligandi [Biadene 2007].

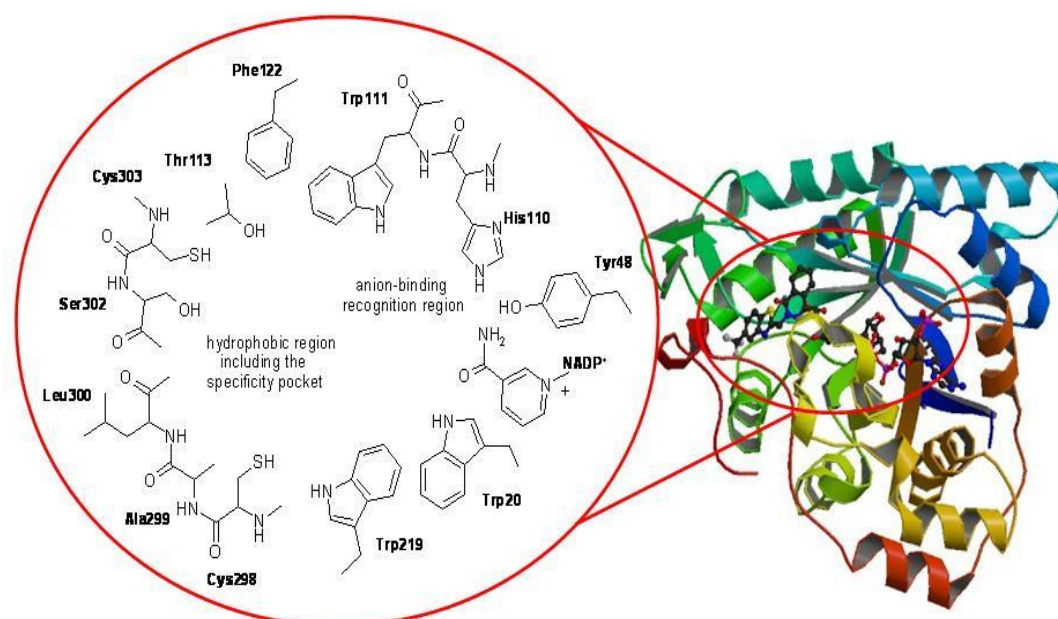


Figura 2.8- Struttura dell'ALR2 umana complessata con l'inibitore zopolrestat (PDB entry 1MAR), insieme con una rappresentazione schematica del sito attivo.

Questi cambiamenti conformazionali che accompagnano il legame e il rilascio di NADP(H) sono determinanti per permettere il meccanismo di riduzione catalizzato dall'ALR2. Infatti, il legame del NADPH all'enzima favorisce la ricognizione del substrato e, alla fine della reazione, il prodotto ridotto viene rilasciato dall'enzima prima del cofattore ossidato. Pertanto, il passaggio dalla conformazione "chiusa" a quella "aperta" del safety belt loop rappresenta il fattore limitante della riduzione di substrati carbonilici catalizzata dall'ALR2 [Del Corso 2008].

Il sito attivo dell'ALR2 è rivestito prevalentemente da residui amminoacidici idrofobi, con l'eccezione di pochi residui idrofilici; questo aspetto strutturale è responsabile della maggiore affinità di ligandi lipofili per l'enzima, rispetto ai monosaccaridi. Nel sito attivo, alcuni residui amminoacidici polari, cioè Asp43, Tyr48, Lys77, His110, Ser159, Asn160, Gln183 e Tyr209, formano una zona rigida in cui viene strettamente legato e posizionato l'anello nicotinamidico del cofattore, tramite una rete di legami

idrogeno; il corretto posizionamento del NADPH è essenziale per il successivo trasferimento dell'idruro dal cofattore all'atomo di carbonio del gruppo carbonilico del substrato durante la reazione catalitica. Il residuo Tyr48 serve come donatore di protoni all'atomo di ossigeno carbonilico del substrato durante la seconda fase della riduzione, mentre His110 mantiene il corretto orientamento del substrato nel sito attivo. Questo sito serve come regione di ricognizione polare, capace di ancorare anioni e/o gruppi accettori di legami a idrogeno di vari substrati ed inibitori (Figura 2.8).

Nel sito attivo dell'ALR2, è distinguibile una seconda regione, che si trova al di sopra del coenzima e consiste in una tasca delimitata da residui amminoacidici idrofobi, come Trp20, Trp79, Trp111 (quest'ultimo residuo delimita un confine tra questa tasca e il sito di ricognizione polare), Phe122, Pro218, Trp79, Cys298, e Leu300. Questa zona idrofobica comprende una tasca di "specificità", localizzata tra Trp111, Thr113, Phe122, Ala299, Leu300, Ser302, e Cys303, e mostra un alto grado di flessibilità rispetto al sito polare rigido. Questa tasca, infatti, può assumere diverse conformazioni in base alla natura e alla dimensione del ligando, il quale sposta l'equilibrio conformazionale della proteina verso la conformazione più adatta all'interazione, stabilizzandola [Sotriffer 2004].

E' stato osservato che il legame di alcuni noti inibitori dell'ALR2 (ARIs, come tolrestat, zopolrestat, e minalrestat, Figura 2.9) induce dei cambiamenti conformazionali in due loop dell'enzima contenenti rispettivamente Phe122 e Leu300. Di conseguenza, la tasca di specificità diventa accessibile agli inibitori e, in particolare, porzioni aromatiche presenti nella loro struttura, come i sistemi naftalenico, benzotiazolico o 4-bromo-2-fluorofenilico, possono adattarsi efficacemente a questa cavità. Il residuo di Leu300 sembra avere un'azione cruciale per controllare l'accesso alla tasca di specificità e può anche influenzare la posizione dei residui prossimali, come Phe122, Trp219, e Cys303. Al contrario, il sorbinil (Figura 2.9), un altro inibitore che possiede una struttura compatta priva di una adeguata porzione idrofoba, non è in grado di aprire la tasca di specificità e si lega a una conformazione dell'ALR2 con la tasca di specificità nello stato chiuso [Urzhumtsev 1997].

Pertanto, l'adattamento indotto non è necessario per il legame all'ALR2, ma può influenzare notevolmente gli effetti dell'interazione ligando-enzima. Infatti, considerando che i residui amminoacidici presenti nella tasca di specificità dell'ALR2 sono meno conservati rispetto ai residui idrofilici del sito attivo (come Tyr48 e His110) tra i membri della superfamiglia delle AKR, la presenza di porzioni molecolari dell'inibitore capaci di legarsi alla tasca di specificità fornisce una base strutturale per l'inibizione selettiva dell'ALR2.

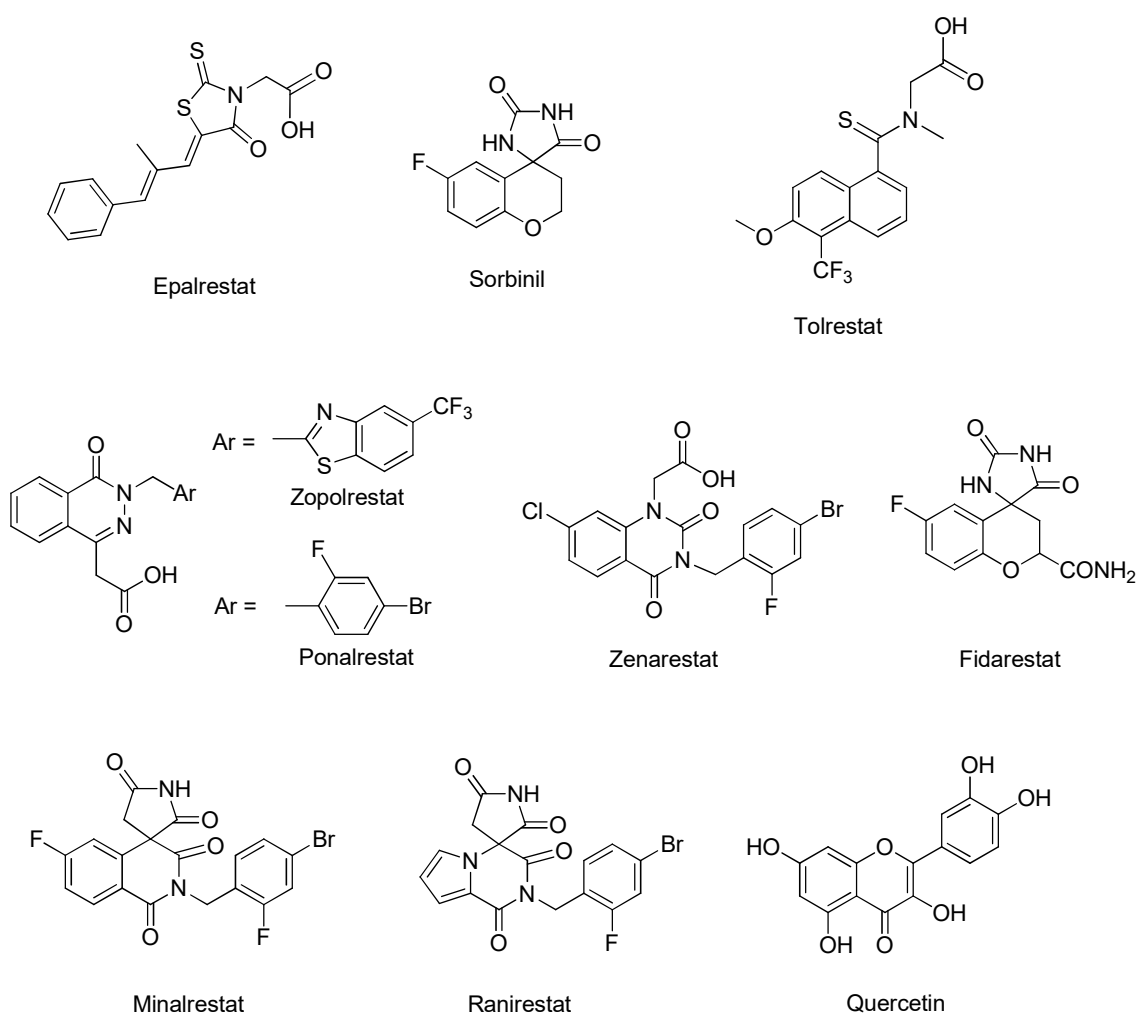


Figura 2.9 – Strutture di alcuni noti inibitori dell'ALR2 (ARIs).

L'elevata flessibilità della regione idrofobica del sito di legame dell'ALR2 permette all'enzima di legare una grande varietà di molecole (sia substrati che inibitori), sebbene sia evidente la capacità di discriminare tra vari ligandi simili. Infatti, l'ALR2 può riconoscere e legare diversi substrati, sia con strutture idrofiliche (come gliceraldeide e aldosi) che idrofobiche (come l'HNE), interagendo preferenzialmente con quest'ultime, e, inoltre, può ospitare inibitori con forme e dimensioni diverse.

Inoltre, si è osservato che l'ALR2 riduce con maggiore efficienza le aldeidi coniugate con glutatione, come GS-HNE, rispetto alle corrispondenti aldeidi libere. La maggiore efficienza catalitica dell'enzima verso substrati coniugati con glutatione è attribuibile principalmente al riconoscimento selettivo dello scheletro del glutatione all'interno del sito di legame. Il sito attivo dell'enzima presenta infatti un dominio di legame flessibile per il glutatione, che risulta distinto dalla regione di legame per le aldeidi e sostanzialmente coincidente con la tasca di specificità. In particolare, il glutammato N-terminale e la glicina C-terminale del glutatione possono fornire specifiche interazioni in particolare con Trp20, Leu301 e Ser302. Infatti, le sostituzioni in queste posizioni, sia nei substrati coniugati con il glutatione che nell'enzima, riducono l'efficienza catalitica dell'ALR2 [Singh 2006].

Un'altra caratteristica dell'ALR2, capace di influenzarne l'attività, è rappresentata dalla sua elevata sensibilità agli ossidanti, che possono inattivare l'enzima modificando il residuo Cys298 presente nel sito attivo. In condizioni di stress ossidativo, il glutatione cellulare è prevalentemente ossidato a glutatione disolfuro, che può facilmente reagire con il gruppo tiolico della Cys298 formando un legame disolfuro misto; ciò riduce l'affinità dell'enzima verso i substrati. È stato proposto che lo scambio reversibile tiolo/disolfuro possa costituire un processo di regolazione dell'attività dell'ALR2, capace di inattivare temporaneamente l'enzima e, nello stesso tempo, di proteggerlo da danni irreversibili causati dalle condizioni redox cellulari. Questo meccanismo potrebbe anche servire per limitare il consumo del cofattore NADPH, favorendo così la riduzione del glutatione, che rappresenta un sistema di contrasto dello stress ossidativo cellulare [Cappiello 2000].

Queste forme modificate dell'ALR2, meno sensibili agli inibitori, sono state identificate in pazienti con iperglicemia ed è logico imputare la loro formazione alla condizione di stress ossidativo associato al DM. Questo aspetto è da tenere particolarmente in considerazione nello sviluppo di ARIs come candidati farmaci e potrebbe spiegare, almeno in parte, la limitata efficacia dimostrata da alcuni di tali inibitori nei trials clinici, nel trattamento di pazienti diabetici per un lungo periodo. Su queste basi, il trattamento terapeutico con ARIs combinati con agenti antiossidanti o l'impiego di composti a duplice attività, antiossidante ed inibente l'ALR2, potrebbe rappresentare un'utile strategia per prevenire l'ossidazione dell'enzima, mantenendolo nella sua forma ridotta suscettibile all'azione degli inibitori; l'attività antiossidante, inoltre, sarebbe utile per contrastare lo stress ossidativo indotto dall'iperglicemia e dall'infiammazione. In letteratura sono presenti diversi esempi di molecole dotate di entrambe le attività, antiossidante ed inibente l'ALR2, sia di origine vegetale (flavonoidi come la quercetina, isoflavonoidi come la genisteina) che di sintesi (come derivati piridopirimidinonici, tetraidropiridoindolici, benzofurossanici, 4-tiazolidinonici) [Maccari 2015].

Fino ad oggi, sono state riportate numerosissime molecole attive come ARIs e molte di esse sono state valutate in studi preclinici e clinici. Tuttavia, il loro sviluppo è stato spesso ostacolato da inconvenienti relativi alla farmacocinetica, da scarsa efficacia in vivo o dall'insorgenza di effetti collaterali. Attualmente, solo l'epalrestat (Figura 2.9) è commercialmente disponibile come farmaco approvato per il trattamento della neuropatia diabetica. Diversi studi clinici hanno confermato che questo farmaco è in grado di rallentare la progressione della neuropatia diabetica e può determinare un miglioramento significativo dei sintomi ad essa associati, senza produrre effetti collaterali gravi, neanche dopo somministrazione prolungata [Hotta 2008]. Attualmente, l'epalrestat è utilizzato solo in alcuni paesi asiatici (come India e Giappone), nei quali è stato ampiamente testato; la sua immissione in altri paesi è condizionata dalla necessità di verificare la sua efficacia clinica con ulteriori studi comparativi a lungo termine in popolazioni diverse di pazienti.

Tra i diversi ARIs avviati agli studi clinici, il fidarestat (Figura 2.9) ha fornito ottimi risultati nel trattamento della neuropatia diabetica, senza gravi effetti avversi; attualmente è uno dei candidati farmaci più promettenti tra gli ARIs in fase di valutazione clinica. Anche gli analoghi spirosuccinimidici minalrestat e ranirestat e il derivato carbossilico ponalrestat (Figura 2.9) hanno mostrato attività e profili di sicurezza apprezzabili negli studi clinici. Il ranirestat ha fornito risultati incoraggianti per il trattamento della neuropatia diabetica, mentre il ponalrestat ha mostrato un'efficacia limitata nel contrastare la progressione di questa grave complicanza del DM [Hotta 2004; Bril 2009].

Nonostante le difficoltà incontrate nello sviluppo di nuovi inibitori dell'ALR2 con proprietà drug-like ed adeguati profili di attività, negli ultimi anni gli importanti progressi ottenuti nella comprensione dei ruoli fisiologici e patologici dell'ALR2 (di cui si è discusso in sintesi nel paragrafo 2.2) hanno ulteriormente stimolato l'interesse verso la progettazione di inibitori di questo enzima come potenziali farmaci utili non solo nel trattamento del DM e delle sue complicanze croniche, ma anche per la terapia di altre gravi malattie umane associate ad una condizione di infiammazione dei tessuti, come artrite reumatoide, sepsi, aterosclerosi, e cancro [Srivastava 2005; Del Corso 2008; Alexiou 2009; Ramana 2011; Maccari 2015]. Tra le diverse sfide da superare per individuare nuovi inibitori dell'ALR2, più sicuri ed efficaci, vanno considerate come requisiti principali la selettività rispetto ad altre AKR altamente omologhe e l'inibizione differenziale dell'enzima in base alla natura del substrato [Maccari 2015]. Un inibitore "ideale" dovrebbe infatti essere in grado di bloccare in modo differenziale l'azione dell'enzima, cioè dovrebbe riuscire ad impedire la produzione di sorbitolo dal glucosio e di GS-DHN dal GS-HNE, prevenendo così gli effetti citotossici e i danni tissutali che ne derivano, senza alterare la funzione detossificante dell'ALR2, cioè la possibilità di ridurre substrati potenzialmente tossici, come l'HNE [Maccari 2015, Del Corso 2008, Srivastava 2005].

2.4 – PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE DI “DESIGNED MULTIPLE LIGANDS” (DMLs) INIBITORI DUPLICI DELL’ALDOSE REDUTTASI E DELLA PROTEIN TIROSINA FOSFATASI 1B

Sulla base delle conoscenze relative al cruciale coinvolgimento dell’ALR2 e della PTP1B nello sviluppo del DM2 e delle sue complicazioni croniche, nonché nella segnalazione infiammatoria/ossidativa, entrambi questi enzimi sono stati assunti come interessanti targets molecolari per la progettazione di nuovi potenziali farmaci per il trattamento di tali patologie. Il design di DMLs attivi come inibitori duplici di entrambi gli enzimi può infatti costituire un nuovo promettente approccio per l’individuazione di farmaci capaci di contrastare simultaneamente sia la progressione del DM2 che delle patologie croniche ad esso associate.

La ricerca di inibitori duplici dell’ALR2 e della PTP1B è ancora all’inizio e finora in letteratura sono stati riportati solo pochissimi esempi. Recentemente, partendo dai due distinti modelli farmacoforici riferiti ai due enzimi target, Vyas e coll. hanno analizzato due gruppi di composti costituiti rispettivamente da flavonoidi attivi come inibitori dell’ALR2 e naftochinoni attivi come inibitori della PTP1B, con l’intento di arrivare ad identificare caratteristiche strutturali comuni necessarie per l’inibizione di entrambi gli enzimi. Questi modelli farmacoforici sono stati poi sfruttati per un virtual screening che ha portato alla selezione di un migliaio di hits, i quali sono stati sottoposti ad esperimenti di docking all’interno della struttura dell’ALR2; successivamente, le molecole che hanno mostrato buone capacità di legarsi all’enzima sono state selezionate anche per il docking all’interno del sito attivo della PTP1B. Sono stati così individuati 16 composti potenzialmente in grado di dare interazioni utili per l’inibizione di entrambi gli enzimi target (Figura 2.10) [Vyas 2015]; tuttavia, stando alle nostre conoscenze, i dati sperimentali derivanti dalla valutazione dell’attività di questi composti non sono ancora stati riportati.

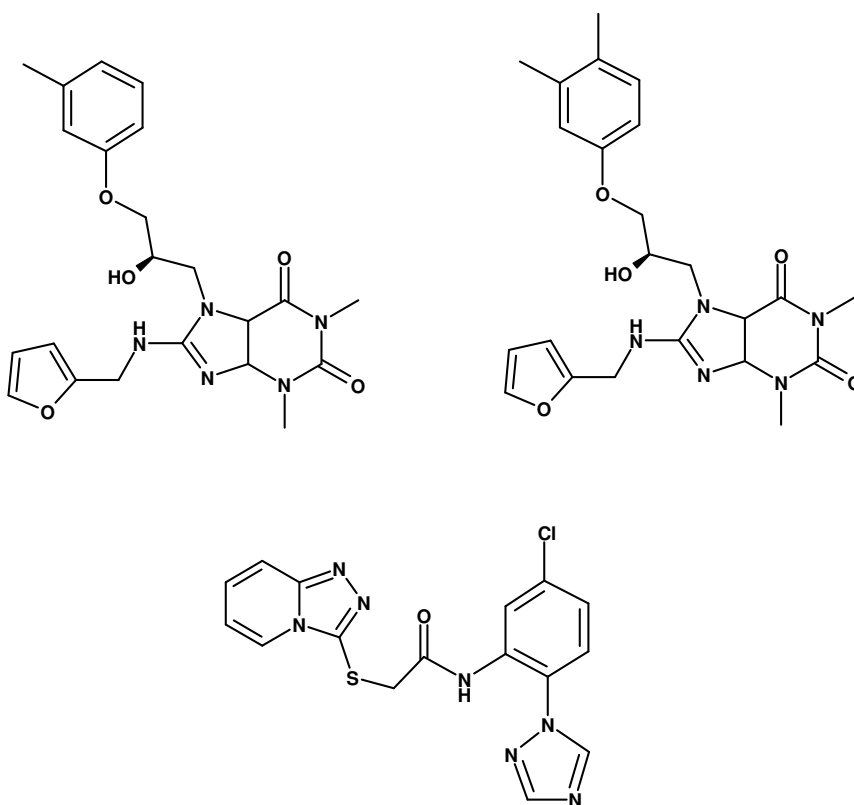
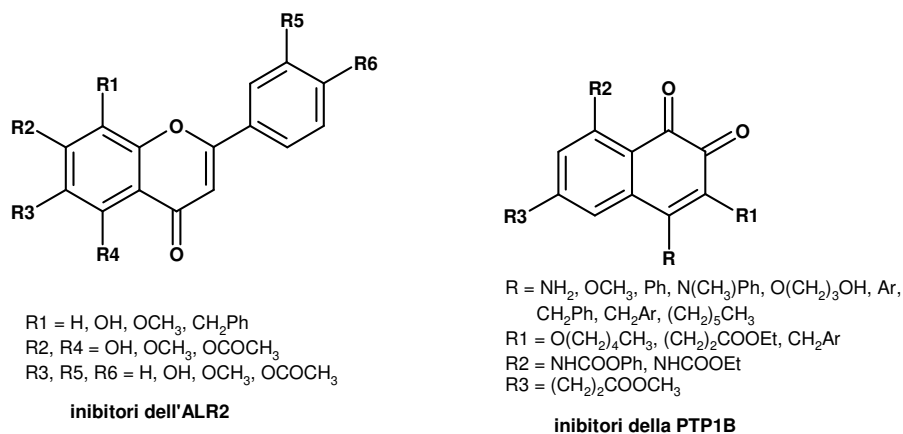


Figura 2.10 – Strutture generali di flavonoidi inibitori dell'ALR2 e di naftochinoni inibitori della PTP1B (in alto) impiegati per individuare alcuni potenziali inibitori duplici della PTP1B e dell'ALR2 (in basso alcuni esempi) [Vyas 2015].

Nei laboratori di chimica farmaceutica presso cui ho svolto la ricerca oggetto di questa tesi, da diversi anni viene condotto uno studio volto alla progettazione, sintesi e valutazione di inibitori dell'ALR2 come potenziali farmaci. In particolare, sono stati

sintetizzati numerosi composti a struttura 4-tiazolidinonica (serie **29-38**, Figura 2.11), la maggior parte dei quali ha mostrato potente attività inibente verso l'ALR2 estratta a cristallini bovini, con valori di IC₅₀ micro- o submicromolari [Bruno 2002; Maccari 2005, 2007b, 2008, 2010, 2011, 2014; Ottanà 2011; Rakowitz 2006].

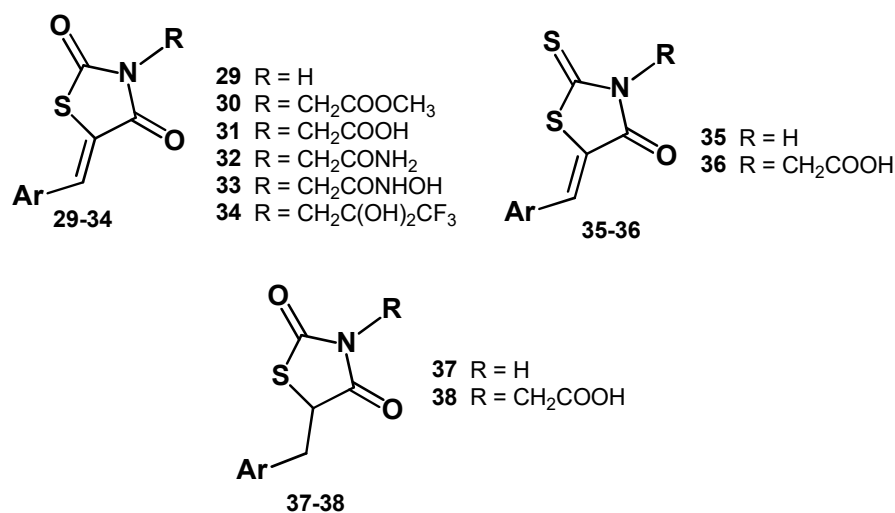


Figura 2.11 – Strutture generali degli inibitori dell'ALR2 **29-38**, precedentemente sintetizzati.

Nei derivati 4-tiazolidinonici delle serie **29-38** sono presenti elementi strutturali essenziali per l'inibizione dell'ALR2 che, in accordo con quanto riportato in letteratura [Costantino 1999; Miyamoto 2002; Maccari 2010, 2015], sono rappresentati da: a) un gruppo acido e/o uno o più gruppi accettori di legami idrogeno, che si legano al sito di ricognizione polare carico positivamente dell'enzima bersaglio; b) una porzione lipofila più o meno estesa, capace di interagire con la zona idrofobica adiacente al sito catalitico.

Infatti, il modello farmacoforico 3D che è stato definito per questa classe di inibitori, grazie a simulazioni di molecular docking all'interno del sito attivo dell'ALR2 e in accordo con i dati sperimentali di inibizione enzimatica, contiene una zona lipofila e due gruppi accettori di legami idrogeno (Figura 2.12) [Maccari 2005].

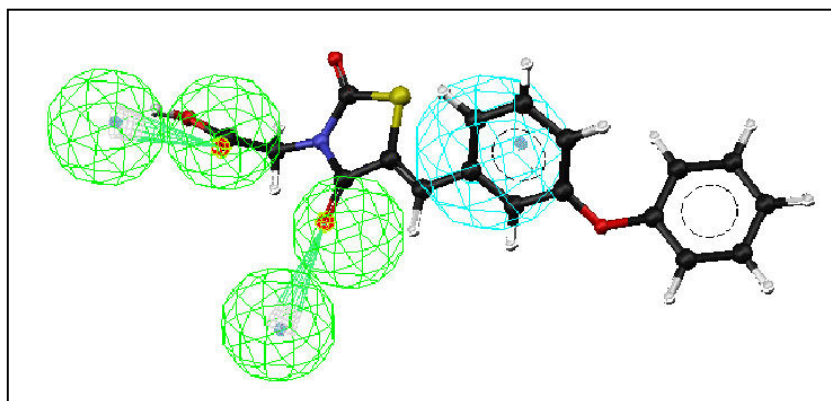


Figura 2.12 - Modello farmacoforico 3D definito per i 5-arilidene-2,4-tiazolidindioni **29-31** [Maccari 2005].

L'elevato numero di inibitori a struttura 4-tiazolidinonica **29-38** finora esplorati ha permesso di definire un ampio quadro di SAR. Gli inibitori più potenti appartengono alle classi degli acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)acetici **31** e **36**, che risultano generalmente attivi a concentrazioni submicromolari [Bruno 2002, Maccari 2005, 2007b, 2011, 2014; Ottanà 2011]. I loro elevati livelli di attività risultano correlati in particolare alla presenza dell'estremità carbossilica della catena acetica sull'N-3 che, attraverso interazioni ioniche e legami ad idrogeno, può interagire con il sito di ricognizione polare dell'ALR2. Infatti, in seguito alla rimozione della catena acetica (composti **29**, **35**) o alla sua sostituzione con gruppi bioisosteri meno ionizzati o non ionizzabili a pH fisiologici (composti **30**, **32-34**), si osserva una riduzione da 10 a 100 volte della potenza inibente. L'efficacia *in vitro* degli acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)acetici **31** e **36** è risultata più elevata rispetto a quella del sorbinil e simile a quella del tolrestat, del ponalrestat e dell'epalrestat, usati come farmaci di riferimento nella valutazione biologica.

Tuttavia, l'attività inibente, seppur più moderata, mostrata da analoghi delle serie **29**, **30**, **32-35** suggerisce che il sostituente sull'N-3 è in grado di raggiungere e legarsi (attraverso possibili legami idrogeno ed interazioni dipolo-dipolo) alla regione polare dell'ALR2, come viene suggerito anche da studi di docking molecolare all'interno del sito attivo dell'enzima [Maccari 2008]. Questi composti mantengono buone capacità di

inibire l'enzima target, con valori di IC_{50} nel range micromolare; tra essi, le idrossiamidi **33** e i derivati trifluorodiidrossipropilici **34** si sono mostrati generalmente più attivi delle corrispondenti amidi **32** [Maccari 2008, 2010].

L'introduzione di un ciclo aromatico addizionale o di un gruppo donatore di legami idrogeno sull'anello 5-benzilidenico è favorevole per l'attività inibente l'ALR2 di queste serie di composti [Maccari 2005, 2007b, 2011; Ottanà 2011]. I dati di inibizione enzimatica indicano che la porzione aromatica esercita un'influenza più rilevante sugli effetti inibenti degli analoghi 4-tiazolidinonici non sostituiti all'N-3 (composti **29**, **35**), nei quali il contributo di questa parte strutturale all'interazione enzima/inibitore appare cruciale. In particolare, le porzioni 3/4-fenossibenzilidenica e 3-benzilossibenzilidenica sono risultate correlate ai migliori livelli di inibizione, portando a derivati, in particolare quelli della serie dei 2-tiosso-4-tiazolidinoni **35**, più attivi del sorbinil, con valori di IC_{50} nel basso range micromolare [Maccari 2011]. Nelle serie dei derivati carbossilici **31** e **36**, si sono osservate minori differenze di attività al variare del pattern di sostituzione della porzione 5-arilidenica: i loro valori di IC_{50} risultano infatti inclusi in un range abbastanza ristretto (tra 0,11 μ M e 0,41 μ M), suggerendo che, in presenza della catena acetica sull'N-3, che è in grado di assicurare forti interazioni con il sito polare dell'enzima, l'influenza della porzione 5-arilidenica sull'azione inibente può risultare meno marcata. Gli acidi (5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)acetici **36**, in particolare quelli fenossi-, benzilossi- o metossibenziliden sostituiti in 5, mostrano effetti inibenti molto simili a quello dell'epalrestat, che possiede una porzione 3-fenil-2-metilpropenilidenica in posizione 5 [Maccari 2011, 2014].

Per quanto riguarda il sostituente in posizione 2 dell'anello tiazolidinonico, la sostituzione del gruppo carbonilico con l'isostero tiocarbonile (derivati 2-tiosso-4-tiazolidinonici **35**, **36**, Figura 2.12), ha determinato un generale aumento della potenza inibente rispetto ai corrispondenti 2,4-tiazolidindioni **29**, **31**, verosimilmente attribuibile alle maggiori dimensioni e polarizzabilità dell'atomo di zolfo rispetto all'ossigeno e quindi alla possibilità di instaurare ulteriori interazioni con l'enzima target utili per l'effetto inibente [Maccari 2011, 2014]. Al contrario, l'inserimento di

una porzione feniliminica in 2 ha determinato la riduzione dell'attività inibente verso l'ALR2 [Ottanà 2011].

Un'altra modifica strutturale apportata nell'ambito di questa classe di inibitori è stata la riduzione del doppio legame C=C in 5, che ha prodotto gli analoghi 5-arilmetilici **37**, **38** (Figura 2.11). Sebbene questa modifica strutturale abbia determinato generalmente una riduzione della potenza inibente rispetto ai corrispondenti derivati 5-arilidenici, gli acidi **38** hanno mostrato livelli significativi di attività, con valori di IC₅₀ compresi tra 1.01 µM e 2.96 µM [Rakowitz 2006].

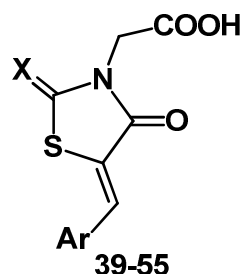
Sulla base dei dati disponibili sull'attività inibente l'ALR2 dei numerosi derivati 4-tiazolidinonici finora sintetizzati ed, inoltre, sulla base delle SAR osservate per gli inibitori della PTP1B descritti nel Capitolo 1, abbiamo avviato una ricerca volta all'individuazione di DMLs che potessero agire come inibitori duplici dell'ALR2 e della PTP1B. Questa ricerca ha preso avvio dalla selezione di alcuni acidi (5-ariliden-4-osso-2-tiosotiazolidin-3-il)acetici (composti **39-47**, Figura 2.13) che, precedentemente sintetizzati e saggiati sull'ALR2 estratta da cristallini bovini e purificata, avevano mostrato eccellente attività inibente, con valori di IC₅₀ molto prossimi a quello dell'epalrestat [Maccari 2011, 2014].

Questi composti mostrano elementi farmacoforici in parte sovrapponibili a quelli degli acidi 4-[(5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici attivi come inibitori della PTP1B (serie **1-6**, Capitolo 1), cioè: a) una porzione polare, che include un gruppo acido o gruppi accettori di legami a idrogeno, in grado di legarsi alla regione carica positivamente presente nei siti catalitici di entrambi gli enzimi; b) una porzione lipofila, generalmente contenente un sistema aromatico, che può interagire con residui aminoacidici idrofobici presenti nella tasca di specificità dell'ALR2 e nella tasca secondaria non catalitica della PTP1B. Inoltre, lo scaffold 4-tiazolidinonico sembra giocare un ruolo critico, in quanto permette di mantenere queste porzioni in una disposizione spaziale adatta per interagire efficacemente con ciascuno degli enzimi prescelti come bersagli molecolari.

Quindi, impiegando un approccio “knowledge-based”, abbiamo progettato e sintetizzato nuovi composti (**48-55**, Figura 2.13), strutturalmente analoghi dei derivati acetici **39-47**, inserendo gli elementi farmacoforici individuati per gli enzimi target ALR2 e PTP1B sullo scaffold 4-tiazolidinonico. In particolare, la catena acetica sull’N-3 è presente in tutti i composti **39-55**, in quanto si era rivelata ottimale per un’efficace inibizione dell’ALR2 e sembra adatta anche per interagire con il sito catalitico carico positivamente della PTP1B. Inoltre, sono stati inseriti sostituenti differenti nella porzione 5-arilidenica, la quale ha dimostrato di poter marcatamente influenzare l’attività inibente, in quanto in grado di instaurare interazioni efficaci con tasche lipofile adiacenti al sito attivo, particolarmente con la tasca secondaria non catalitica della PTP1B. Tuttavia, non bisogna trascurare l’eventualità che il pattern di sostituzione della porzione 5-arilidenica possa influenzare la capacità di questi inibitori di interagire con regioni allosteriche dei targets, determinando quindi meccanismi di inibizione differenti, come osservato per alcuni acidi 4-[(5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoici **6** attivi come inibitori della PTP1B, di cui si è discusso nel Capitolo 1.

In posizione 2, nei composti **39-51** è presente il gruppo tiocarbonilico, che negli studi SAR precedenti, si era rivelato generalmente favorevole per l’attività, mentre gli analoghi **52-54** sono 2,4-tiazolidindioni corrispondenti ad alcuni dei precedenti 2-tiosso-4-tiazolidinoni (composti **49-51**) (Figura 2.13).

Soltanto nel composto **55** è stato inserito, per confronto, il gruppo 2-feniliminico, in quanto questo sostituente, seppur generalmente favorevole per l’attività inibente verso la PTP1B, ha mostrato in precedenza di esercitare un effetto negativo sull’inibizione dell’ALR2 [Ottanà 2011].



	X	Ar
39	S	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
40	S	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
41	S	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
42	S	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
43	S	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄
44	S	4-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₄
45	S	3-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₄
46	S	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₃
47	S	4-OCH ₃ ,3-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₃
48	S	C ₆ H ₅ CH=CH
49	S	4-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
50	S	3-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
51	S	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃
52	O	4-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
53	O	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃
54	O	3-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄
55	=NPh	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃

Figura 2.13 – Strutture degli acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)acetici **39-55**.

Proseguendo questa ricerca, in una fase successiva sono state sintetizzate le serie di analoghi **56-58** (Figure 2.14 e 2.15). La sintesi di questi nuovi composti è stata condotta con il principale obiettivo di ottenere un miglior bilanciamento degli effetti inibenti verso i due enzimi bersaglio. Infatti, come verrà discusso nei paragrafi seguenti, i derivati acetici **39-55** sono risultati eccellenti inibitori dell'ALR2 e generalmente moderati inibitori della PTP1B. Le modifiche strutturali apportate nei composti **56-58** sono state quindi mirate a migliorare l'attività inibente nei confronti della PTP1B, senza modificare significativamente la potenza verso l'ALR2.

La scelta di inserire una catena propanoica come sostituyente sull'N-3 degli acidi (5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)propanoici **56** e (5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)propanoici **57** (Figura 2.14). è stata supportata da un virtual screening, eseguito su una libreria di composti strutturalmente diversi, che, come discusso nel capitolo precedente, aveva portato all'individuazione di alcuni hits come potenziali inibitori

della PTP1B. Uno dei composti selezionati (**23**, Figura 1.31, Capitolo 1) presenta il residuo dell'acido propanoico sull'N-3 del nucleo tiazolidinonico, suggerendo che tale sostituente possa interagire con il sito attivo della PTP1B, probabilmente in maniera più efficace rispetto alla catena acetica grazie alle maggiori dimensioni. Infatti, nella valutazione preliminare di cui si è discusso nel capitolo precedente, il composto **23** si è rivelato in grado di determinare il 40% di inibizione della PTP1B umana, alla concentrazione di 50 μM (Figura 1.32, Capitolo 1). Nello stesso tempo, l'allungamento della catena sull'N-3, rispetto agli analoghi derivati dell'acido acetico, è abbastanza contenuto, facendo prevedere che il residuo propanoico possa accomodarsi facilmente anche nel sito polare di ricognizione dell'ALR2.

Nella porzione 5-arilidenica dei composti **56 a-f** e **57 a-f** sono stati inseriti i sostituenti che, negli studi SAR precedenti, erano apparsi favorevoli per l'inibizione di ciascuno degli enzimi target; nella serie **56**, è compreso anche l'hit **23** che qui, per comodità è stato rinumerato come **56d** (Figura 2.14).

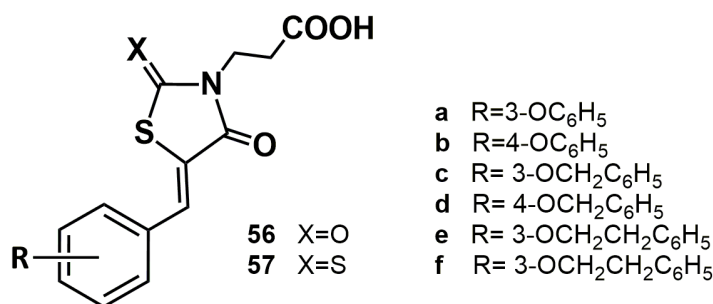


Figura 2.14 –Struttura degli acidi 3-[(5-arilidene-2,4-diossotiazolidin-3-il)propanoici **56**, e degli acidi 3-[(5-arilidene-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)]propanoici **57**.

La catena 2-butenica presente sull'N-3 dell'anello tiazolidinonico degli acidi 4-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)-2-butenici **58a-e** (Figura 2.15) può essere considerata come un "modello aperto" del residuo dell'acido *p*-metilbenzoico presente negli acidi 4-[(5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici (composti **1-6**, Capitolo 1) attivi come inibitori della PTP1B. Come discusso nel Capitolo 1, il residuo dell'acido *p*-

metilbenzoico può inserirsi perfettamente nel sito catalitico della PTP1B come gruppo fosfotirosin-mimetico, determinando elevata affinità e potenza inibente verso questo enzima; al contrario, in base a saggi preliminari, si è potuto constatare che diversi composti **1-6**, scelti come rappresentativi, sono incapaci di inibire l'ALR2, probabilmente a causa dell'ingombrante sostituito benzoico sull'N-3 che non riesce ad interagire con il sito attivo di questo enzima.

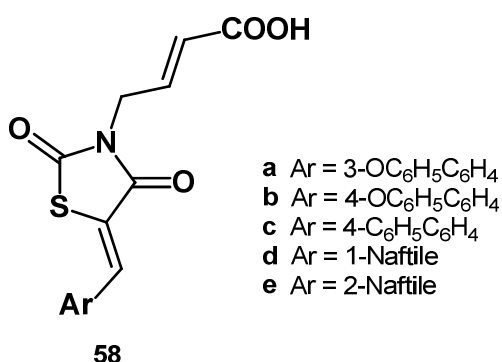


Figura 2.15 –Struttura degli acidi 4-[(5-arylidene-2,4-diossotiazolidin-3-il)-2-butenoici **58**.

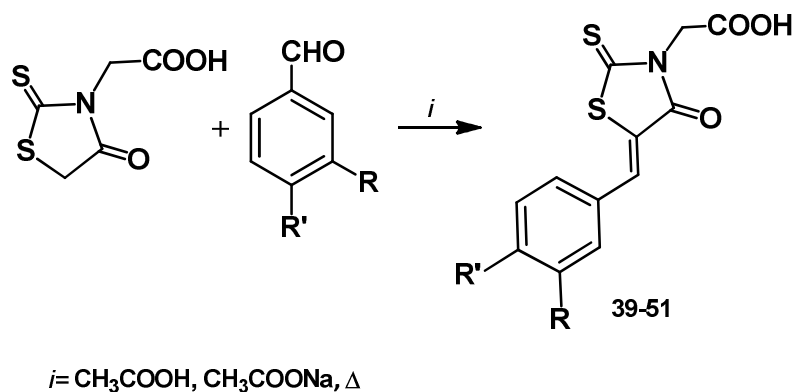
Chimica

Gli acidi (5-aryliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)acetici **39-51** (Tabella 2.1) sono stati sintetizzati con alte rese tramite condensazione di Knoevenagel dell'acido (4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)acetico commerciale con le appropriate aldeidi, in presenza di sodio acetato in acido acetico glaciale, a riflusso (Schema 2.1).

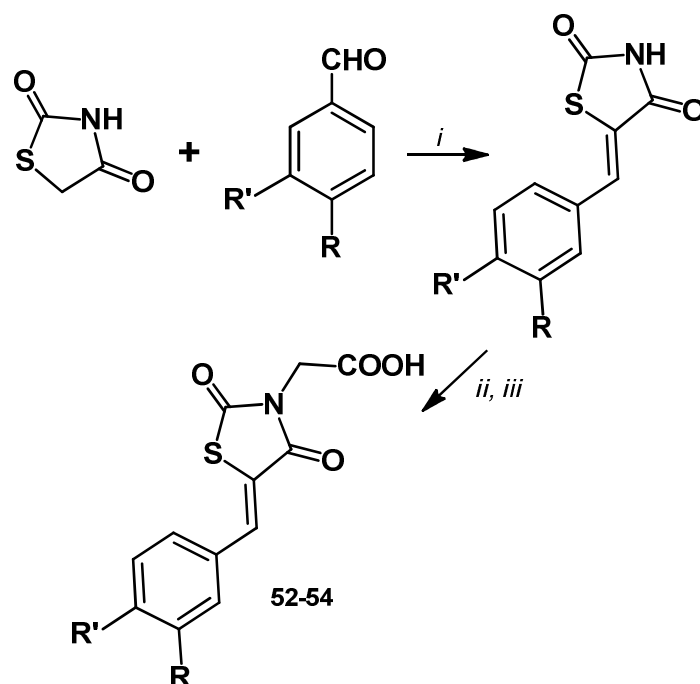
Gli analoghi **52-54** (Tabella 2.1) sono stati ottenuti per condensazione di Knoevenagel del 2,4-tiazolidindione commerciale con le corrispondenti aldeidi, in presenza di piperidina impiegata come base, in etanolo a riflusso, seguita da *N*-alchilazione con acido bromoacetico (Schema 2.2).

La sintesi del derivato 2-feniliminico **55** è stata condotta seguendo un procedimento multistep, iniziando con la reazione tra il fenilisotiocianato e la glicina, che produce l'acido (3-feniltioureido)acetico; quest'ultimo, reagendo con il cloruro di cloroacetile in

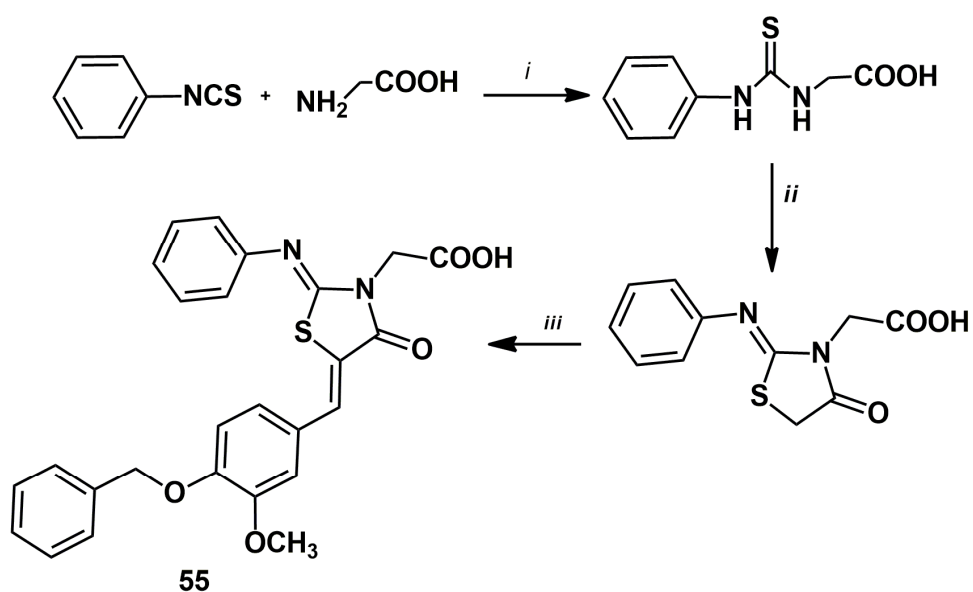
etanolo a refluxo, fornisce l'acido (4-osso-2-feniliminotiazolidin-3-il)acetico che, per condensazione con la 3-metossi-4-benzilossibenzaldeide, permette di ottenere il prodotto finale **55** (Schema 2.3). Tutti i composti **39-55** sono stati purificati per ricristallizzazione da metanolo.



Schema 2.1 - Sintesi degli acidi (5-aryliden-4-osso-2-tiosotiazolidin-3-il)acetici **39-51**.



Schema 2.2 - Sintesi degli acidi (5-aryliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)acetici **52-54**.



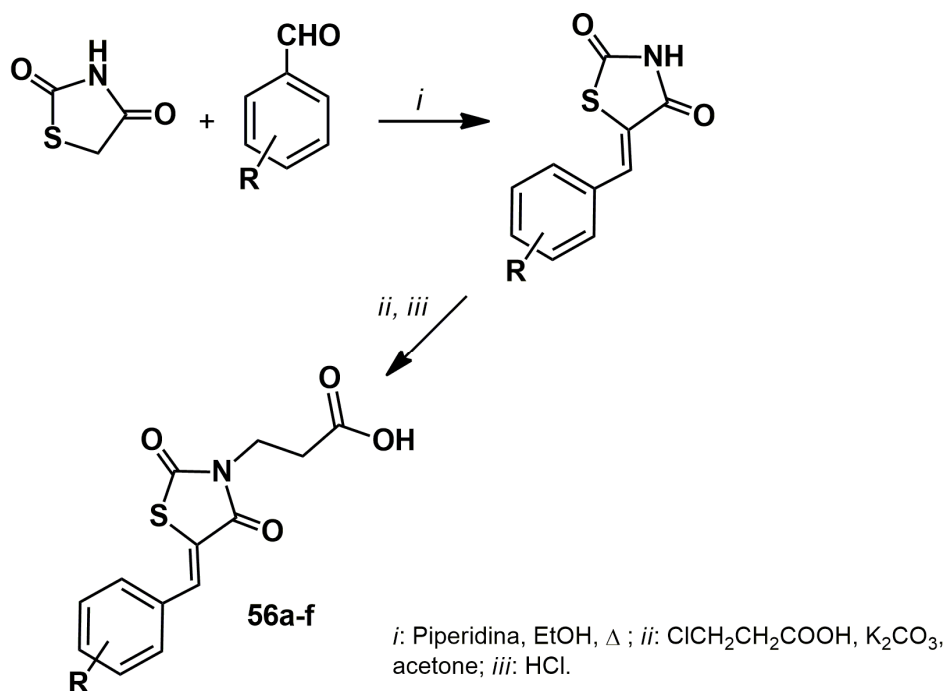
i = EtOH, Δ ; ii = ClCH_2COCl , Et_3N , EtOH, Δ ; iii = 4-benzilossi-3-metossibenzaldeide, piperidina, EtOH,

Schema 2.3 – Sintesi dell'acido [5-(4-benzilossi-3-metossi)benziliden-2-fenilimino-4-ossotiazolidin-3-il]acetico **55**.

Gli acidi 3-[(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)]propanoici **56** sono stati ottenuti con un procedimento analogo alla sintesi degli acidi acetici **52-54**, cioè per condensazione di Knoevenagel del 2,4-tiazolidindione commerciale con le corrispondenti aldeidi, in presenza di piperidina come base, in etanolo a refluxo; questo primo step è stato seguito da *N*-alchilazione con acido 3-cloropropanoico, in acetone a refluxo e in presenza di potassio carbonato (Schema 2.4). Dopo adatto work-up, i composti **56** sono stati purificati per cristallizzazione in metanolo.

Gli acidi 3-[(5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)]propanoici **57** sono stati sintetizzati con un procedimento multistep, che prevede prima la sintesi del nucleo (4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)propanoico e successivamente la condensazione con le opportune aldeidi (Schema 2.5). La reazione della β -alanina con disolfuro di carbonio, in soluzione acquosa alcalina a temperatura ambiente, seguita dall'aggiunta di sodio bromoacetato, successiva acidificazione della miscela di reazione e riscaldamento a

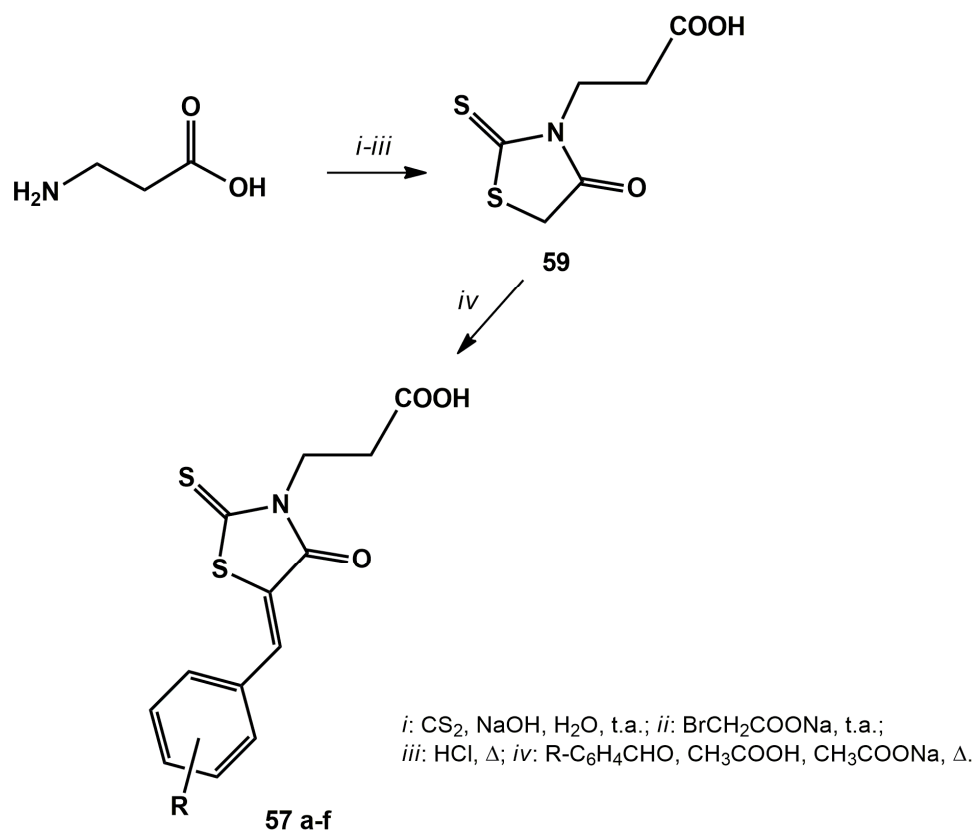
riflusso per 24 ore, permette di ottenere l'acido 3-[(4-osso-2-tiosotiazolidin-3-il)]propanoico **59**. Successivamente, la condensazione di Knoevenagel dell'acido **59** con le opportune aldeidi in acido acetico a riflusso e in presenza di sodio acetato, fornisce i derivati 5-arilidenici **57**, che sono stati purificati per cristallizzazione in metanolo (Schema 2.5).



Schema 2.4 –Sintesi degli acidi 3-[(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)]propanoici **56a-f**.

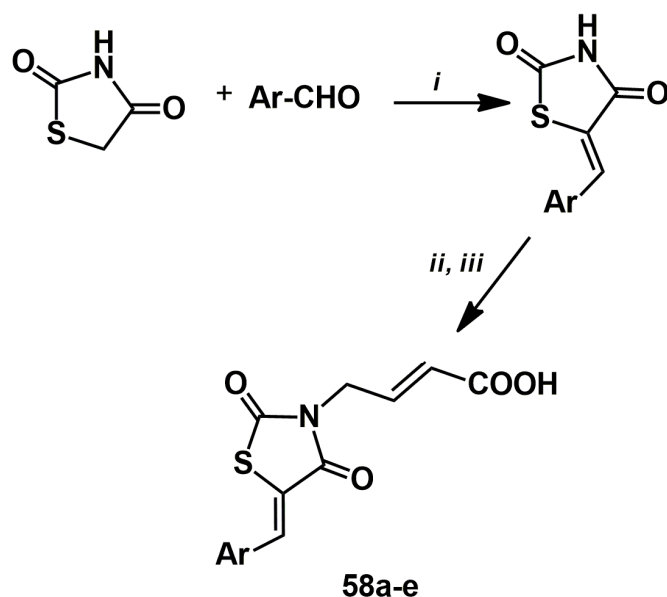
La sintesi dei composti **49**, **50**, **52**, **54**, **56e**, **56f**, **57e**, **57f** ha richiesto l'impiego della 4-(2-feniletossi)benzaldeide e della 3-(2-feniletossi)benzaldeide, che sono state sintetizzate per *O*-alchilazione della 4/3-idrossibenzaldeide con (2-bromoetil)benzene, secondo il procedimento già descritto nel Capitolo 1. Analogamente, la 3-metossi-4-benzilossibenzaldeide, necessaria per la sintesi dei composti **51**, **53**, **55**, è stata preparata per reazione della 3-metossi-4-idrossibenzaldeide con cloruro di benzile, a riflusso in dimetilformammide anidra, previo trattamento con idruro di sodio su un bagno di ghiaccio sotto agitazione. Infine, le 2-(formilarilossi)acetamidi necessarie per

la sintesi dei composti **44-47**, sono state preparate per reazione dell'appropriata idrossibenzaldeide con la 2-cloroacetamide, in acetonitrile a refluxo, in presenza di potassio carbonato, seguendo un procedimento precedentemente messo a punto [Maccari 2014].



Schema 2.5 – Sintesi degli acidi 3-[(5-aryliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)]propanoici **57 a-f**.

Gli acidi 4-(5-aryliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)2-butenoini **58 a-e** sono stati preparati partendo di nuovo dalla condensazione di Knoevenagel del 2,4-tiazolidindione commerciale con le opportune aldeidi; questo primo step è stato seguito dalla *N*-alchilazione con metile 4-bromocrotonato, in acetone a refluxo e in presenza di potassio carbonato come base, e successiva idrolisi in ambiente acido degli esteri metilici ottenuti. Gli acidi 2-butenoini **58** sono stati infine purificati per cristallizzazione da metanolo (Schema 2.6).



i: EtOH, piperidina, Δ ; *ii*: a) $\text{BrCH}_2\text{CH}=\text{CHCOOCH}_3$, K_2CO_3 , acetone, Δ ;
iii: HCl dil., CH_3COOH gl., Δ

Schema 2.6 – Sintesi degli acidi 4-(5-arilidene-2,4-diossotiazolidin-3-il)-2-butenoici **58**.

Le strutture di tutti i composti sintetizzati sono state assegnate sulla base dei dati analitici e spettroscopici (v. Parte sperimentale). In particolare, negli spettri ^1H NMR dei derivati acetici **39-55**, la presenza di un singoletto dovuto alla risonanza del protone metilidenico nel range tra 7.74 ppm e 7.93 ppm, e di un altro singoletto attribuibile ai protoni del gruppo metilenico sull’N-3, a 4.15-4.73 ppm, è risultata determinante per l’attribuzione della struttura. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR, inoltre, hanno evidenziato che i composti **39-55** sono stati ottenuti esclusivamente come isomeri Z, in analogia ai derivati 5-ariliden-4-tiazolidinonici precedentemente ottenuti e caratterizzati anche tramite la cristallografia a raggi X [Bruno 2002; Ottanà 2005].

Negli spettri ^1H NMR di tutti i composti delle serie **56** e **57** si osservano due tripletti diagnostici, di cui uno nel range tra 2.58 ppm e 2.63 ppm e l’altro tra 3.84 ppm e 4.22 ppm, che sono dovuti alla risonanza dei gruppi metilenici del residuo dell’acido

propanoico presente sull'N-3 dell'anello tiazolidinonico. Inoltre, nello spettro protonico dell'acido **59**, precursore dei 5-ariliden-2-tiosso-4-tiazolidinoni **57**, è presente un singoletto a 4.00 ppm, attribuibile alla risonanza dei protoni metilenici in posizione 5 dell'anello tiazolidinonico, che appaiono magneticamente equivalenti. Questo segnale non è presente negli spettri dei derivati 5-arilidenici **57**, nei quali si osserva invece un singoletto a 7.74-7.780 ppm dovuto alla risonanza del gruppo metilidenico in 5, che rivela chiaramente l'avvenuta condensazione con la corrispondente aldeide. Inoltre, anche negli spettri dei composti **56** e **57** è presente una sola serie di segnali attribuibili all'isomero Z, in analogia ai 5-arilidene-4-tiazolidinoni precedentemente sintetizzati.

Negli spettri ^1H NMR dei acidi 2-butenici **58**, infine, sono evidenti un doppio doppietto, dovuto alla risonanza del gruppo metilenico sull'N-3 tiazolidinonico, nel range 4.40-4.52 ppm, e due doppi tripletti nel range tra 5.80 ppm e 6.98 ppm, attribuibili ai due protoni del gruppo CH=CH; questi segnali risultano dunque diagnostici per l'attribuzione della struttura. Inoltre, è presente un solo singoletto attribuibile alla risonanza del protone 5-metilidenico, a 7.87-8.56 ppm, che anche in questo caso indica che si ottengono esclusivamente gli isomeri con configurazione Z.

Valutazione degli effetti inibenti in vitro nei confronti dell'ALR2 ricombinante umana

L'attività inibente dei composti **39-55** nei confronti dell'ALR2 ricombinante umana è stata valutata in vitro, impiegando L-idoso come substrato e l'Epalrestat come farmaco di riferimento.

Tutti i derivati 4-tiazolidinonici saggiati hanno mostrato eccellenti proprietà inibenti l'enzima, con valori di IC_{50} compresi nel range tra 0.025 μM e 1.41 μM (Tabella 2.1). In questo saggio, i composti **39-47** hanno prodotto livelli di inibizione simili o superiori a quelli mostrati nei confronti dell'ALR2 estratta dai cristallini bovini, determinati in precedenza [Maccari 2011, 2014].

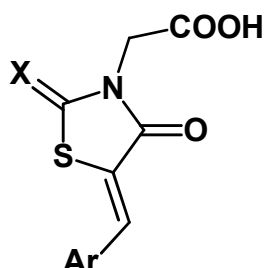
Gli acidi (5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)acetici **49-51** sono risultati da 3 a 8 volte più attivi dei corrispondenti 2,4-tiazolidindioni **52-54** (Tabella 2.1), mentre la sostituzione del gruppo tiocarbonilico o carbonilico in posizione 2 dell'anello tiazolidinonico dei composti **51** e **53** con un gruppo 2-feniliminico (composto **55**) ha prodotto una netta riduzione della potenza (di 35 volte e 4 volte, rispettivamente). Queste SAR sono in accordo con quanto osservato per gli analoghi precedentemente esplorati: viene infatti confermata la validità della presenza di un tiocarbonile in posizione 2 dello scaffold tiazolidinonico per ottenere un potente effetto inibente nei confronti dell'ALR2; invece, il gruppo 2-feniliminico determina una riduzione dell'affinità verso l'enzima, verosimilmente perchè troppo ingombrante per poter essere ospitato nella regione polare del sito catalitico dell'enzima.

L'influenza dei diversi sostituenti della porzione 5-arilidenica sull'effetto inibente verso l'ALR2 appare moderata, visto che i valori di IC₅₀ risultano per la maggior parte compresi in un range piuttosto ristretto di valori submicromolari. Tuttavia, è da evidenziare che la presenza di un sostituito in posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico si è rivelata spesso più vantaggiosa per l'inibizione rispetto alla sostituzione in posizione *para* (**40** vs. **39**, **45** vs. **44**, **50** vs. **49**, **54** vs. **52**, Tabella 2.1).

Per quanto riguarda gli acidi propanoici **56**, **57** e gli analoghi 2-butenici **58**, attualmente sono disponibili soltanto i risultati della valutazione dell'attività inibente verso l'ALR2 dei composti **56a-f** (Tabella 2.2), mentre sono in corso i saggi sugli altri analoghi.

I composti **56a-f** sono risultati capaci di inibire l'ALR2 con valori di IC₅₀ compresi tra 11.9 µM e 49.4 µM (Tabella 2.2).

Tabella 2.1 – Attività inibente dei composti **39-55** nei confronti della PTP1B ricombinante umana e dell'ALR2 ricombinante umana, espressa come IC₅₀ (μM).



Comp.	X	Ar	PTP1B IC ₅₀ (μM) ^a	AR IC ₅₀ (μM) ^a
39	S	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	63.9 ± 2.0	0.060 ± 0.004
40	S	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	86.8 ± 3.2	0.025 ± 0.002
41	S	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	56.0 ± 1.0	0.052 ± 0.003
42	S	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	43.1 ± 1.5	0.053 ± 0.004
43	S	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄	n.d.	0.078 ± 0.007
44	S	4-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₄	10 % ^b	0.194 ± 0.011
45	S	3-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₄	716.5 ± 136	0.064 ± 0.005
46	S	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₃	378 ± 23	0.228 ± 0.012
47	S	4-OCH ₃ ,3-OCH ₂ CONH ₂ -C ₆ H ₃	679 ± 184	0.139 ± 0.011
48	S	C ₆ H ₅ CH=CH	171 ± 27	0.125 ± 0.009
49	S	4-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	49.4 ± 1.0	0.104 ± 0.010
50	S	3-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	32.5 ± 1.1	0.056 ± 0.006
51	S	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃	54.1 ± 1.0	0.040 ± 0.004
52	O	4-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	63.8 ± 2.6	0.364 ± 0.049
53	O	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃	151 ± 51	0.323 ± 0.033
54	O	3-O(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	12.4 ± 0.8	0.276 ± 0.029
55	=NPh	3-OCH ₃ ,4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₃	10.6 ± 0.4	1.41 ± 0.126
Epalrestat				0.102 ± 0.005
Vanadato			0.4 ± 0.01	

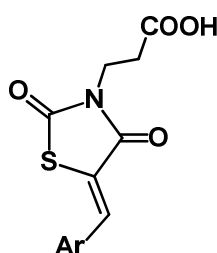
^a Valori medi ± S.E.M (vedi Parte sperimentale).

^b Percentuale di inibizione dell'enzima in presenza del composto **44** alla concentrazione di 300 μM.

n.d. = non determinato.

I composti **56a**, **56c** e **56e**, che portano i gruppi fenossile, benzilossile e 2-feniletossile in posizione *meta* sull'anello 5-benzilidenico, sono più attivi dei corrispondenti composti *para*-sostituiti **56b**, **56d** e **56f**, in analogia a quanto osservato per i derivati acetici **39-55** e per altri inibitori a struttura 5-arilidene-4-tiazolidinonica saggiati precedentemente. L'allungamento dello spacer tra i due anelli aromatici della porzione 5-arilidenica è responsabile di una moderata riduzione dell'efficacia inibente; infatti, il composto più attivo è l'acido [5-(3-fenossibenzilidene)-2,4-diossotiazolidin-3-il]propanoico **56a**, mentre il meno potente è l'analogo 4-(2-feniletossi)benzilidenico **56f** (Tabella 2.2).

Tabella 2.2 - Attività inibente degli acidi (5-arilidene-2,4-diossotiazolidin-3-il)propanoici **56 a-f** nei confronti dell'ALR2 ricombinante umana, espressa come IC_{50} (μM).



<i>Comp.</i>	<i>Ar</i>	IC_{50} (μM) ^a
56a	3-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	11.9 (10.0-14.1)
56b	4-OC ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	43.8 (33.2-61.4)
56c	3-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	14.7 (12.3-17.5)
56d	4-OCH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	36.8 (30.4-44.7)
56e	3-OCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	26.6 (21.3-33.2)
56f	4-OCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄	49.4 (40.3-60.7)
Epalrestat		0.17 (0.09-0.34)
Sorbinil		2.0 (1.7-3.5)

^aIn parentesi 95% LC.

Confrontando questi dati di inibizione dell'ALR2 con quelli degli analoghi **39-55** (Tabella 2.1), è possibile rilevare che la sostituzione della catena acetica sull'N-3 dell'anello tiazolidinonico con quella propanoica porta ad una generale riduzione della potenza inibente nei confronti dell'ALR2, portando da inibitori attivi a concentrazioni dell'ordine di 10^{-6} - 10^{-7} M ad analoghi attivi a concentrazioni maggiori di circa due ordini di grandezza. Ad esempio, il composto 3-(2-feniletossi)benziliden sostituito **56e** è risultato 96 volte meno potente del corrispondente acido acetico **54**, mentre il composto 4-(2-feniletossi)benziliden sostituito **56f** è 136 volte meno potente del corrispondente tiazolidindione **52** (Tabelle 2.1 e 2.2). Sembra evidente quindi che l'allungamento del sostituente sull'N-3 determina un'interazione meno efficace con l'enzima. Comunque, è prevedibile che la sostituzione del gruppo carbonilico in posizione 2 dell'anello tiazolidinonico dei composti **56** con il suo isostero 2-tioarbonilico nei composti **57**, che sono ancora in fase di valutazione, possa determinare un incremento dell'attività inibente l'ALR2, come si è osservato nella serie degli acidi (5-arilidene-4-ossotiazolidin-3-il)acetici. Inoltre, se in seguito all'allungamento della catena sull'N-3 si otterrà un miglioramento dell'azione inibente verso la PTP1B rispetto agli analoghi acetici **39-55** (riportata nel paragrafo successivo), si sarà raggiunto un migliore bilanciamento degli effetti inibenti sui due enzimi bersaglio. Ciò potrebbe rivelarsi vantaggioso, nonostante la riduzione della potenza inibente dei derivati propanoici nei confronti dell'ALR2: infatti, come discusso nel paragrafo 2.1, è stato suggerito che l'inibizione anche parziale di più targets coinvolti in una determinata patologia può risultare più efficace di una potente azione inibente diretta specificamente verso un unico bersaglio.

Valutazione degli effetti inibenti in vitro nei confronti della PTP1B ricombinante umana

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività inibente nei confronti della PTP1B, il saggio di inibizione ha utilizzato l'enzima ricombinante umano ed è stato condotto seguendo lo stesso metodo impiegato per i composti riportati nel Capitolo 1; il *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) è stato impiegato come substrato, mentre il sodio metavanadato è stato utilizzato come riferimento.

L'effetto inibente dei composti **39-55** nei confronti della PTP1B si è rivelato significativamente meno marcato rispetto all'attività mostrata da questi inibitori verso l'ALR2 (Tabella 2.1). Tuttavia, i composti **54** e **55**, che sono i più attivi inibitori della PTP1B in questa serie, hanno prodotto livelli di inibizione interessanti, con valori di IC₅₀ di 12.4 μM e 10.6 μM, rispettivamente. I composti **39-42** e **49-52** hanno mostrato minore attività, con IC₅₀ comprese tra 32.5 μM (composto **50**) e 86.8 μM (composto **40**), mentre i composti **44-48** e **53** sono scarsamente attivi, con valori di IC₅₀ maggiori di 100 μM (Tabella 2.1).

In analogia con le SAR osservate per gli acidi 4-[(5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici riportati nel Capitolo 1, anche in questa serie di analoghi acetici il pattern di sostituzione della porzione 5-arilidenica esercita una marcata influenza sull'attività inibente verso la PTP1B. La presenza di un sostituente aromatico, come un gruppo fenossile, benzilossile o 2-feniletossile, sull'anello 5-benzilidenico risulta correlata con una più efficace azione inibente la PTP1B, mentre sostituenti più piccoli o più idrofili (come nei composti **44-48**) esercitano un effetto sfavorevole sull'inibizione della PTP1B (Tabella 2.1).

Un risultato interessante è che nella serie di composti **39-55**, come osservato per l'inibizione dell'ALR2, la sostituzione in posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico è generalmente più favorevole per l'attività inibente verso la PTP1B rispetto alla sostituzione in posizione *para* (**42** vs. **41**, **50** vs. **49**, **54** vs. **52**). Questa SAR appare in analogia con quanto osservato per alcuni acidi 4-[(5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-

3-il)metil]benzoici **6** (vedi Capitolo 1) che sono risultati attivi come inibitori non-competitivi della PTP1B [Ottanà 2017]; diversamente, per altri acidi 4-[(5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)metil]benzoici, attivi come inibitori competitivi dell'enzima, si era osservato che la sostituzione sull'anello 5-benzilidenico era più vantaggiosa in posizione *para* che in *meta* (vedi Capitolo 1) [Maccari 2007a, 2009, 2014; Ottanà 2009, 2012, 2017].

Infine, bisogna notare che l'effetto esercitato sull'attività inibente da parte del sostituente in posizione 2 dell'anello 4-tiazolidinonico non può essere definita in maniera univoca, contrariamente a quanto osservato per l'inibizione dell'ALR2. Per esempio, il 2,4-tiazolidindione **54** è risultato circa 3 volte più potente dell'analogo 2-tiosso-4-tiazolidinone **50**, mentre viceversa il 2-tiosso-4-tiazolidinone **51** è circa 3 volte più attivo del corrispondente 2,4-tiazolidindione **53** (Tabella 2.1). La sostituzione del gruppo tiocarbonilico del composto **51** o del carbonile del composto **53** con un gruppo 2-feniliminico (composto **55**) produce un apprezzabile incremento dell'attività inibente, con una riduzione dell'IC₅₀ di 14 e 5 volte, rispettivamente (Tabella 2.1).

La valutazione dell'attività inibente la PTP1B umana dei derivati propanoici **56**, **57** e 2-butenici **58** è attualmente in corso e non sono ancora disponibili dati utili per la discussione.

Caratterizzazione cinetica degli inibitori duplici ALR2/PTP1B

Tra i derivati acetici **39-55**, i composti **50** e **54** presentano un interessante profilo di attività su entrambi i targets, in quanto inibiscono l'ALR2 a dosi submicromolari e, contemporaneamente, presentano un'apprezzabile effetto inibente anche verso la PTP1B. Questi composti sono stati quindi selezionati per ulteriori valutazioni, in particolare per definire il meccanismo della loro azione inibente.

La caratterizzazione cinetica di questi inibitori ha dovuto prendere in considerazione la differenza significativa riscontrata nelle loro potenze inibenti verso l'ALR2 e la PTP1B, che richiede differenti approcci analitici.

Innanzitutto sono stati condotti dei test per verificare se l'azione inibente dei composti **50** e **54** sia di tipo reversibile o irreversibile. Per la PTP1B, aliquote appropriate dell'enzima sono state incubate in presenza di concentrazioni saturanti di ciascun inibitore per 60 minuti a 37°C. Le miscele sono state diluite con un tampone adatto ed è stata determinata l'attività residua dell'enzima. Nel caso dell'ALR2, dato che i composti sono attivi a concentrazioni comparabili a quelle dell'enzima e possono quindi essere considerati "tight binding inhibitors", è stato necessario effettuare una dialisi delle miscele enzima/inibitore. In entrambi i casi, il recupero di percentuali di attività enzimatica del 70-100% hanno indicato che l'inibizione dei composti **50** e **54** è di tipo reversibile, sia nei confronti dell'ALR2 che della PTP1B.

Successive analisi cinetiche hanno permesso di stabilire che i composti **50** e **54** si comportano da inibitori di tipo "uncompetitive" nei confronti dell'ALR2. Sono stati determinati i valori delle costanti di inibizione K_i (riferita al complesso enzima/inibitore) e K_i' (riferita al complesso enzima/substrato/inibitore): è emerso che, mentre il valore di K_i è $> 0.3 \mu\text{M}$ per il composto **50** e $> 0.5 \mu\text{M}$ per il composto **54**, i valori di K_i' sono molto più bassi ($0.0062 \mu\text{M}$ e $0.016 \mu\text{M}$, rispettivamente). Ciò suggerisce che entrambi gli inibitori si legano preferenzialmente all'enzima in presenza del substrato.

Nel caso della PTP1B, analizzando la velocità di reazione a differenti concentrazioni dell'inibitore per mezzo del metodo dei doppi reciproci, è emerso che entrambi i composti **50** e **54** si comportano da inibitori non-competitivi (Figure 2.15 e 2.16). I valori delle costanti di inibizione K_i e K_i' risultano uguali per ciascun inibitore ($12.0 \pm 1.2 \mu\text{M}$ e $13.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$, per il composto **50** e per il composto **54**, rispettivamente).

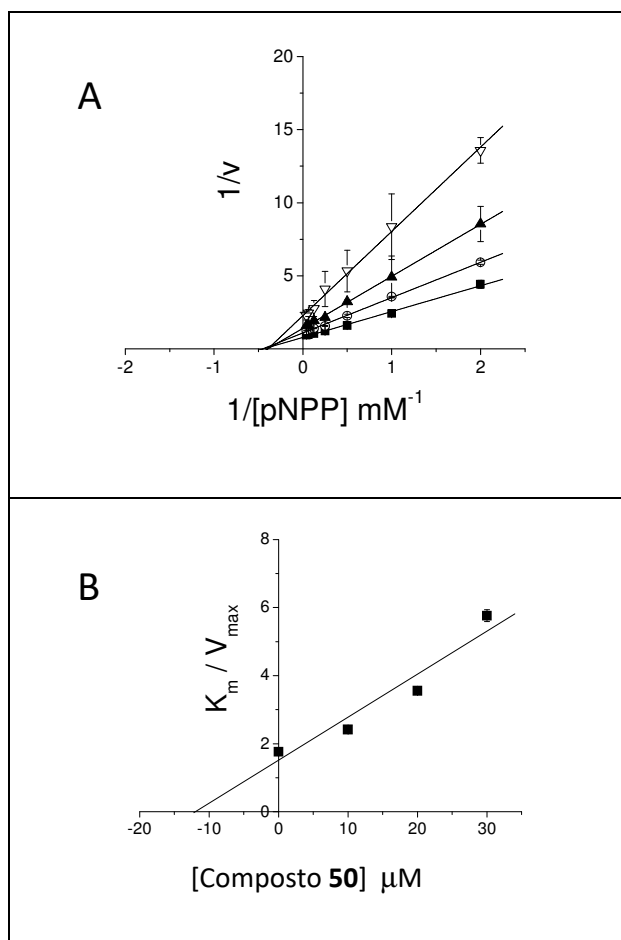


Figura 2.15 – Analisi cinetica del composto **50** come inibitore della PTP1B . **A)** grafico dei doppi reciproci; le concentrazioni del composto **50** sono: \blacksquare , 0 μM , \circ , 10 μM , \blacktriangle , 20 μM , ∇ , 30 μM . I dati riportati rappresentano valori medi \pm S.E.M. ($n = 3$). **B)** K_m/V_{max} vs. concentrazione dell'inibitore.

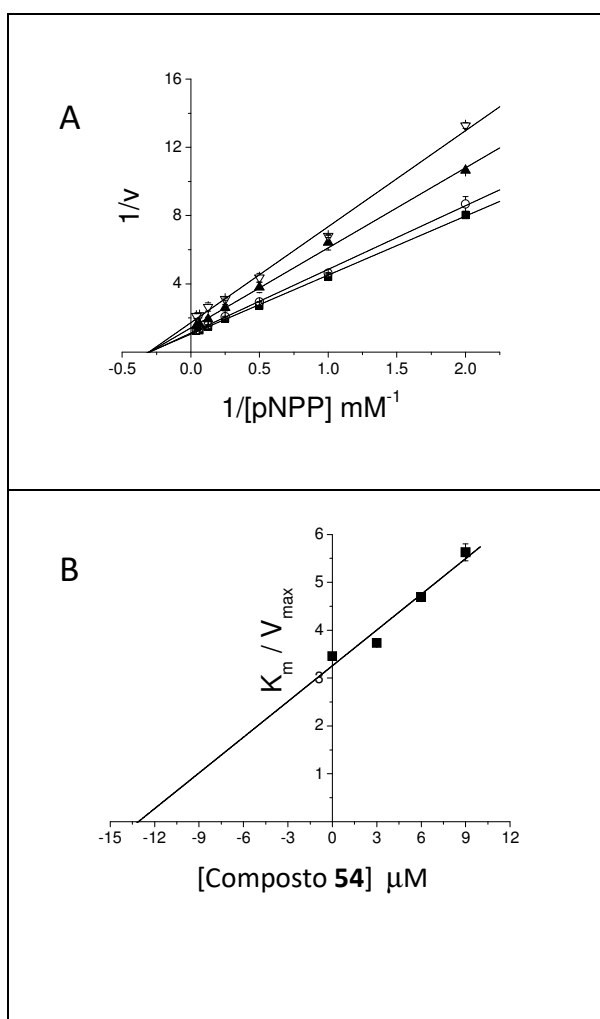


Figura 2.16 - Analisi cinetica del composto **54** come inibitore della PTP1B . **A)** grafico dei doppi reciproci; le concentrazioni del composto **54** sono: \blacksquare , 0 μM , \circ , 3 μM , \blacktriangle , 6 μM , ∇ , 9 μM . I dati riportati rappresentano valori medi \pm S.E.M. ($n = 3$). **B)** K_m/V_{max} vs. concentrazione dell'inibitore.

Studi di docking molecolare

Considerando il loro interessante profilo di attività su entrambi i targets, i composti **50** e **54** sono stati selezionati per condurre esperimenti di docking molecolare, allo scopo di studiare il loro possibile binding mode e di individuare porzioni strutturali utili per la simultanea inibizione dei due enzimi bersaglio.

Tenendo presente che il meccanismo d'inibizione della PTP1B mostrato dai composti **50** e **54** è di tipo non competitivo, gli esperimenti di docking sono stati condotti su tutta la superficie dell'enzima. Le simulazioni di docking hanno indicato che tali inibitori sono in grado di legarsi all'interno del sito allosterico presente sulla superficie della PTP1B e connesso al loop catalitico attraverso un filamento β , descritto nel Capitolo 1. In Figura 2.17 è riportata la posa di docking del composto **54** all'interno di questo sito allosterico. Il composto **54** è in grado di legarsi efficacemente alla regione allosterica, posizionando la sua porzione aromatica terminale nella tasca lipofila di questo sito circondata dai residui di Pro206, Arg79 e Ser80. Il fatto che il sostituente feniletossilico si trovi in posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico fa sì che il gruppo carbossilico del ligando possa spingersi verso i residui di Arg105, Arg169 e Lys103, formando con essi diversi legami ionici e a idrogeno che stabilizzano il complesso enzima-inibitore (Figura 2.17).

Per quanto riguarda l'ALR2, considerando che gli studi cinetici hanno rivelato che entrambi i composti **50** e **54** si comportano da inibitori "uncompetitive", cioè in grado di legarsi al complesso enzima-substrato, gli esperimenti di docking sono stati eseguiti sul complesso ALR2-idosio.

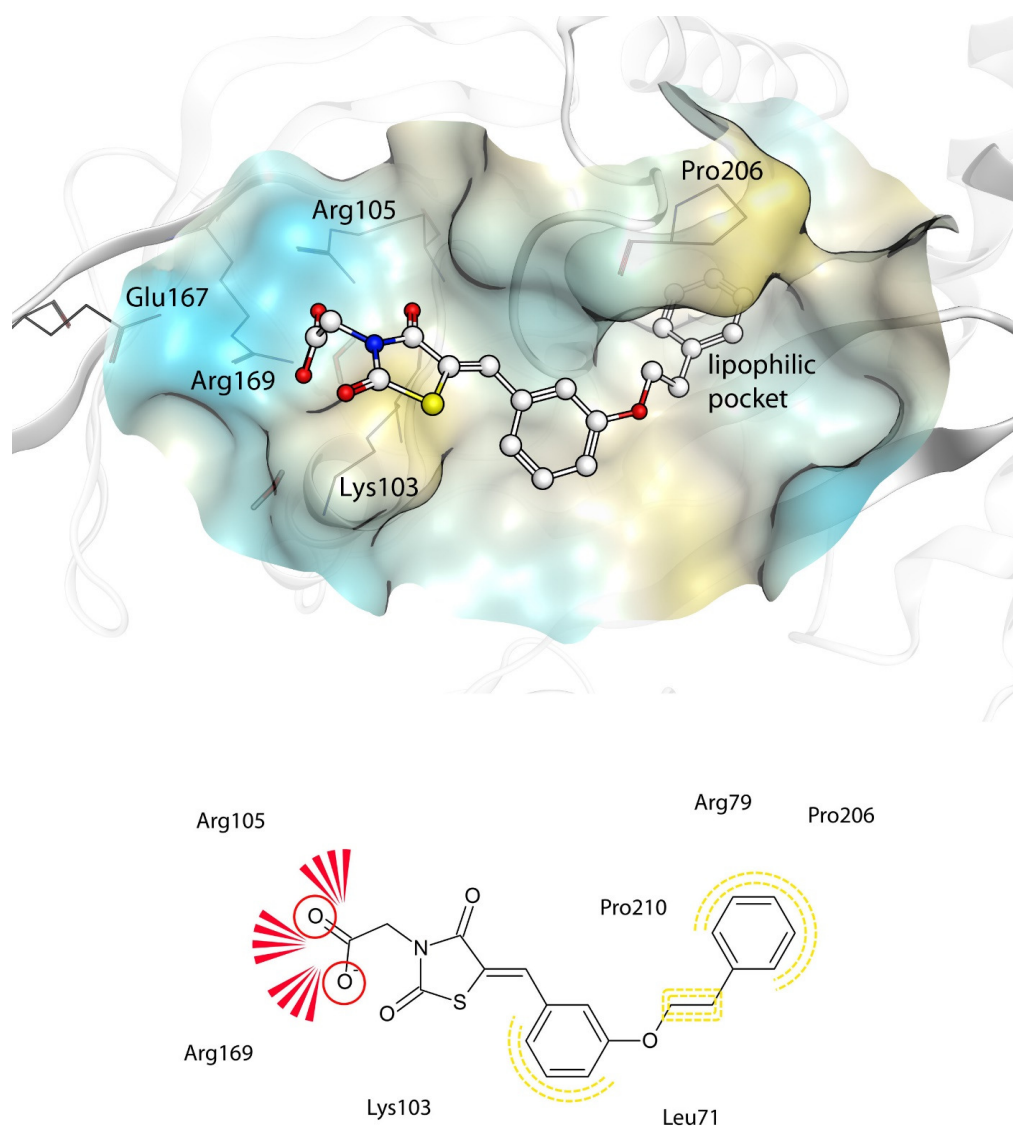


Figura 2.17 - Composto **54** legato al sito allosterico della PTP1B. In alto: rappresentazione 3D con la superficie della proteina colorata in ciano (porzioni idrofile) e giallo (porzioni lipofile). In basso: rappresentazione 2D, con evidenziate le interazioni proteina-ligando: cerchi rossi, accettori di legami a idrogeno; stelle rosse, interazioni di tipo ionico; giallo, interazioni idrofobiche.

Attualmente non sono disponibili strutture dell'ALR2 co-cristallizzata con l'idosio o con l'alcol corrispondente; di conseguenza, è stata modificata una struttura dell'enzima complessato con la gliceraldeide (3V36) [Zheng 2012], rimuovendo il substrato originario e inserendo al suo posto l'idosio.

Sono note alcune strutture dell'enzima co-cristallizzato con diversi ligandi che si trovano impilati dentro una tasca connessa al sito catalitico (2FZB) [Steuber 2006]. In maniera analoga, entrambi i composti **50** e **54** sono in grado di posizionarsi nella parte più esterna del sito catalitico, al di sopra del substrato idosio, che è legato al fondo del sito stesso. La porzione 2-feniletossilica è orientata verso l'idosio e i residui catalitici del sito, occupando una tasca lipofila al di sopra di essi e potendo instaurare interazioni idrofobiche con Trp20, Val47, Trp79 e Phe122. La porzione molecolare idrofila del ligando è rivolta verso il solvente; in questa posizione, il gruppo carbossilico può instaurare legami ionici e a idrogeno con i residui Lys221 e Arg217 (Figure 2.18 e 2.19). Il gruppo carbonilico in posizione 4 dello scaffold tiazolidinonico forma legami a idrogeno con il backbone del residuo Ala299, mentre quello in posizione 2 (o il suo isostero tiocarbonilico) si trova rivolto verso il solvente e circondato dalle catene laterali di alcuni aminoacidi lipofili, tra cui Leu301. La Leu301 può interagire anche con l'adiacente anello 5-benzilidenico del ligando, il quale a sua volta si trova in una posizione compatibile con la formazione di interazioni π -stacking con il vicino residuo di Trp219 (Figure 2.18 e 2.19).

Questo intorno conduce ad un adattamento migliore per il più ingombrante 2-tiosso-4-tiazolidinone **50** rispetto al 2,4-tiazolidindione **54**. Inoltre, da esperimenti di docking condotti con altri analoghi della serie, è risultato che queste interazioni sono possibili solo per i derivati con un sostituito in posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico e non con gli isomeri *para*-sostituiti: infatti, per poter interagire con la tasca idrofobica al di sopra del substrato e simultaneamente formare legami ionici e a idrogeno con Lys221 e Arg217, è necessaria una configurazione "ripiegata" del ligando.

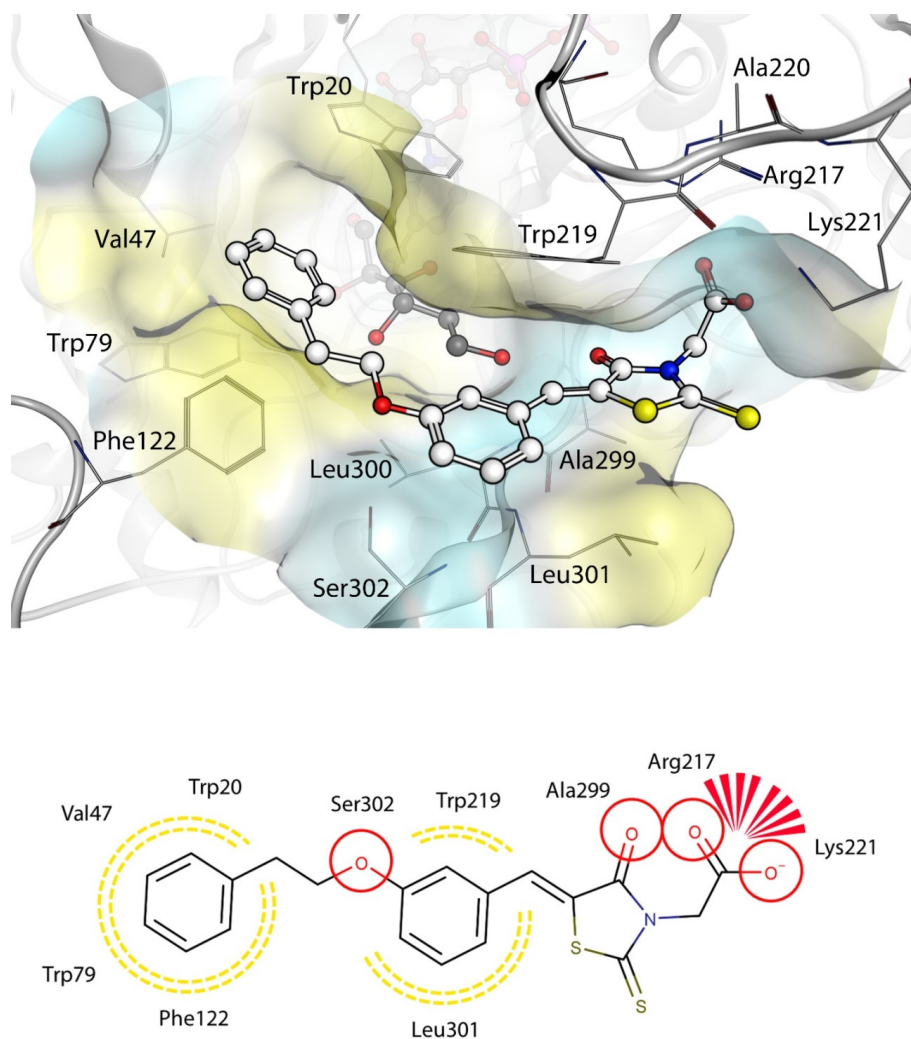


Figura 2.18 - Posa del composto **50** legato al complesso ALR2-idosio. In alto: rappresentazione 3D con la superficie della proteina colorata in ciano (porzioni idrofile) e giallo (porzioni lipofile); l'inibitore è in bianco, il substrato in grigio. In basso: rappresentazione 2D, con evidenziate le interazioni proteina-ligando: cerchi rossi, accettori di legami a idrogeno; stelle rosse, interazioni di tipo ionico; giallo, interazioni idrofobiche.

Infine, si è osservato che per un buon adattamento all'interno della cavità idrofobica posta al di sopra del substrato, la lunghezza dello spacer posto tra i due anelli aromatici della porzione 5-arilidenica è determinante: in particolare, una catena costituita da tre atomi, come si verifica nei composti **50** e **54**, appare ottimale.

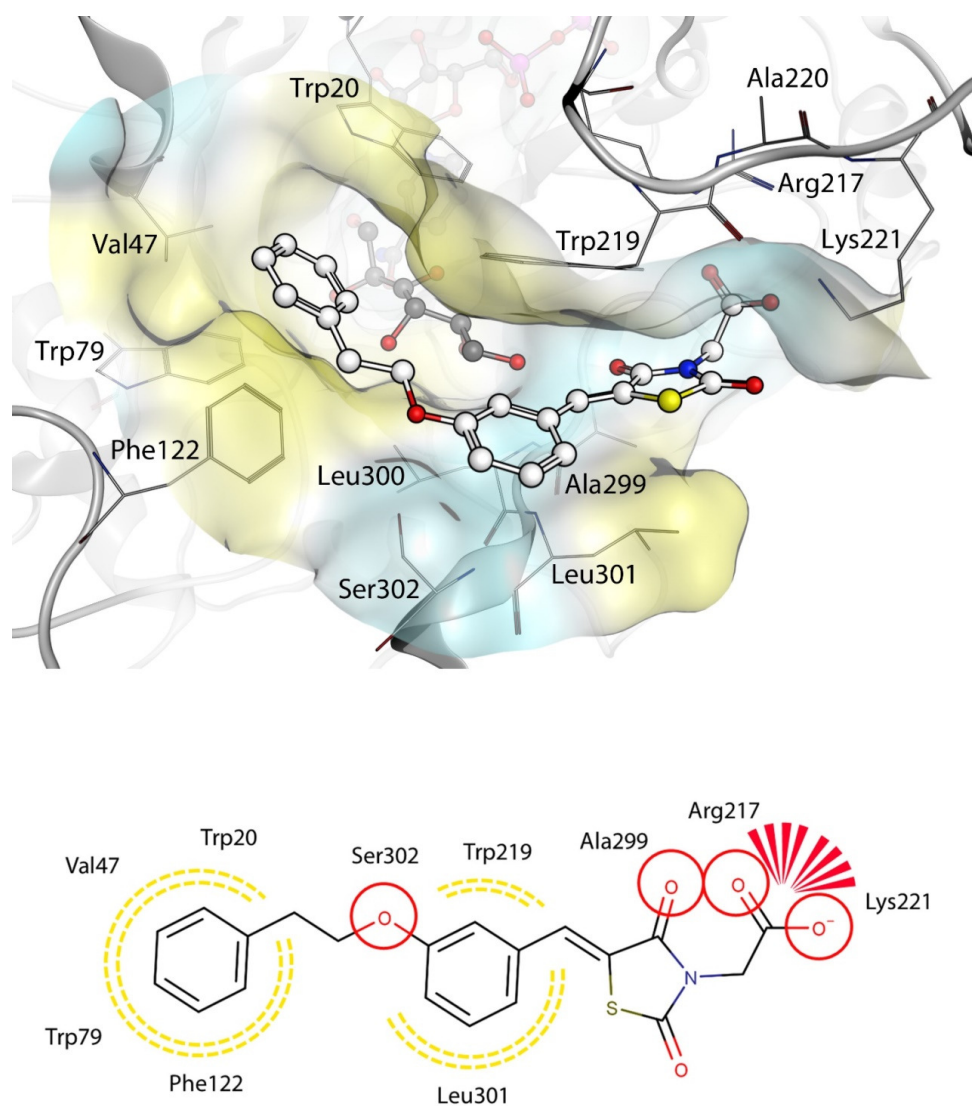


Figura 2.19 - Posa del composto **54** legato al complesso ALR2-idosio. In alto: rappresentazione 3D con la superficie della proteina colorata in ciano (porzioni idrofile) e giallo (porzioni lipofile); l'inibitore è in bianco, il substrato in grigio. In basso: rappresentazione 2D, con evidenziate le interazioni proteina-ligando: cerchi rossi, accettori di legami a idrogeno; stelle rosse, interazioni di tipo ionico; giallo, interazioni idrofobiche.

Gli studi di docking effettuati indicano che alcuni aspetti strutturali di questi ligandi sono importanti per l'inibizione simultanea dell'ALR2 e della PTP1B.

Innanzitutto, entrambi i siti di legame evidenziati sulla superficie dei due enzimi target richiedono una configurazione "ripiegata" del ligando che, nel caso dei composti **50** e **54**, è resa possibile dal sostituito 2-feniletossilico presente in posizione *meta* dell'anello 5-benzilidenico. In secondo luogo, è emerso che la parte centrale del ligando, che nei derivati esplorati è caratterizzata dalla presenza dell'anello 5-benzilidenico, deve essere prevalentemente idrofobica; ancora più lipofila deve essere l'estremità della porzione 5-arilidenica, che nella PTP1B si inserisce nella tasca idrofobica del sito allosterico e nell'ALR2 è posizionata in una fessura lipofila al di sopra del substrato. Inoltre, i nostri studi hanno rivelato che questa porzione terminale mostra un adattamento ottimale ad entrambi i siti dei due enzimi bersaglio quando si trova ad una distanza di circa 8 Å dal "gomito" del ligando. Infine, emerge che il gruppo carbossilico può essere vantaggioso per assicurare un binding efficace, purchè sia in grado di spingersi verso l'esterno del sito, raggiungendo residui aminoacidici presenti nella parte più esterna di entrambi i siti allosterici individuati nei due enzimi.

In conclusione, il nostro approccio "knowledge-based", avviato sulla base dei farmacofori precedentemente individuati per derivati 4-tiazolidinonici attivi come inibitori dell'ALR2 o della PTP1B, ha permesso di avviare uno studio SAR e di ottenere alcuni acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)acetici attivi come inibitori duplici dell'ALR2 umana e della PTP1B umana.

I risultati di inibizione enzimatica in vitro hanno evidenziato che i composti **39-55** possiedono nel complesso un'eccellente attività inibente nei confronti dell'ALR2, mentre i loro effetti inibenti verso la PTP1B risultano più moderati. Tuttavia, i derivati **50**, **54** e **55** hanno mostrato, accanto ad un'elevata potenza inibente verso l'ALR2, anche un'interessante attività come inibitori non-competitivi della PTP1B. Un dato interessante è stato, inoltre, che i composti **50** e **54** agiscono con un meccanismo "uncompetitive" nei confronti dell'ALR2 umana, in presenza del substrato L-idoso. Quindi i composti **50** e **54** agiscono con meccanismi d'inibizione diversi da quello

competitivo, che presuppongono la possibilità di questi inibitori di interagire efficacemente con regioni non catalitiche di entrambi gli enzimi target.

Gli studi di docking molecolare, in accordo con le SAR, hanno evidenziato che è possibile identificare delle features che appaiono utili per la simultanea inibizione di ALR2 e PTP1B, che possono essere così riassunte: i) una porzione centrale lipofila, che nei derivati 5-arilidene-4-tiazolidinonici saggiati è rappresentata dall'anello 5-benzilidenico, a cui deve essere connessa con opportuni linker un'estremità anch'essa idrofobica e relativamente estesa, in modo da assicurare un adattamento efficace all'interno delle cavità idrofobiche allosteriche individuate nei due enzimi bersaglio; ii) un gruppo ionizzabile, posto all'estremità opposta della molecola, capace di stabilire interazioni stabilizzanti con residui aminoacidici distanti dal sito catalitico di ciascun target; iii) le due porzioni opposte idrofobica e idrofilica dovrebbero assumere una posizione reciproca "ripiegata" o "angolata", suggerita come ottimale per un efficace binding ai siti allosterici dei due enzimi.

Gli studi condotti sugli acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidn-3-il)acetici, in particolare sui lead compounds **50** e **54**, hanno quindi messo in luce che la possibilità di binding a siti allosterici offre una promettente opportunità per il design di inibitori duplici di ALR2 e PTP1B umane.

Su queste basi, si è proseguita la ricerca con la sintesi dei derivati delle serie **56**, **57** e **58**, sopra descritti, la cui valutazione e relativo studio SAR sono attualmente in corso.

CONCLUSIONI

La ricerca riportata in questa tesi, riguardante la progettazione, la sintesi, la valutazione biologica e lo studio SAR di nuovi inibitori di enzimi coinvolti nell'insorgenza del DM2 e delle sue complicanze croniche, è stata condotta applicando diverse strategie correlate tra loro che hanno prodotto alcuni apprezzabili risultati.

Il progetto ha preso avvio da una ricerca in corso da alcuni anni nei laboratori di Chimica Farmaceutica dell'Università di Messina presso cui ho svolto il mio lavoro sperimentale. La valutazione di nuovi composti, sintetizzati nel primo periodo del triennio di dottorato come inibitori della PTP1B diretti al sito attivo dell'enzima, ha permesso di individuare nuovi derivati 4-tiazolidinonici attivi; in particolare, tra questi, l'acido 4-{[2-(4-fluorofenilimino)-4-ossido-5-(3-fenossibenziliden)tiazolidin-3-il]metil} benzoico (**5b**) ha mostrato un interessante profilo di attività, in quanto dotato di eccellente azione insulinomimetica e di apprezzabili proprietà anti-infiammatorie in colture cellulari. Dallo studio SAR di questi inibitori della PTP1B, è emerso che il pattern di sostituzione nelle posizioni 2 e 5 dello scaffold 4-tiazolidinonico può esercitare un marcato effetto non solo sulla potenza inibente, ma anche sul meccanismo di inibizione. Infatti, alcuni degli inibitori oggetto di questo studio, attivi a concentrazioni nel basso range micromolare, sono in grado di interagire efficacemente con una regione allosterica dell'enzima, distinta dal sito catalitico ma collegata ad esso tramite un loop, che è stata individuata nel corso dei nostri studi di molecular docking.

La possibilità di modulare l'attività della PTP1B attraverso l'interazione con questo nuovo sito non catalitico rappresenta un risultato interessante, in quanto apre nuove prospettive nel design di inibitori allosterici della PTP1B i quali, rispetto agli inibitori fosfotirosin-mimetici diretti al sito attivo, potrebbero essere dotati di migliore biodisponibilità e selettività. Su queste basi, proseguendo la ricerca, sono stati progettati e sintetizzati 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni (composti **12**), molti dei quali sono attivi come inibitori allosterici della PTP1B, capaci di interagire con il sito non catalitico precedentemente individuato. L'inibizione allosterica della PTP1B è una

promettente strategia che potrebbe portare a nuovi candidati farmaci ma, al momento, questo tipo di inibitori sono ancora poco numerosi in letteratura. I composti della serie **12** che hanno mostrato i migliori livelli di attività saranno quindi assunti come degli interessanti lead compounds da ottimizzare nel proseguimento della ricerca.

Nell'ambito della progettazione di nuovi inibitori della PTP1B, si è inserito anche uno studio di virtual screening, dal quale ha preso avvio la sintesi di una nuova classe di potenziali inibitori dell'enzima a struttura 2-arilcarbamoilbenzoica (composti **28**), la cui valutazione biologica è attualmente in corso.

In una fase successiva, è stata avviata la sintesi di derivati 4-tiazolidinonici attivi come inibitori duplici dell'ALR2 e della PTP1B (composti **39-58**), applicando un approccio basato sulla conoscenza degli elementi farmacoforici precedentemente individuati per derivati tiazolidinonici attivi come inibitori dell'ALR2 o della PTP1B, nonché su alcuni risultati ottenuti dal suddetto virtual screening. Anche se la valutazione di alcuni dei composti sintetizzati è attualmente in corso e quindi i dati d'inibizione non sono ancora tutti disponibili, è stato dimostrato che alcuni acidi (5-ariliden-4-ossotiazolidin-3-il)acetici sono dotati di eccellenti proprietà inibenti verso l'ALR2, insieme con un'interessante attività inibente verso la PTP1B. Ulteriori analisi condotte sui composti migliori (**50** e **54**) hanno messo in luce che questi inibitori agiscono con un meccanismo di tipo non competitivo su entrambi gli enzimi bersaglio. Dagli studi SAR sono emerse delle features utili per la simultanea inibizione di ALR2 e PTP1B, attraverso un meccanismo di tipo allosterico. Il risultato più interessante di questa parte della ricerca è quindi aver messo in luce una promettente opportunità per il design di nuovi inibitori duplici di ALR2 e PTP1B umane, attraverso il binding a siti non catalitici che condividono alcune caratteristiche strutturali. I lead compounds individuati finora, oltre a quelli che potranno emergere tra i composti attualmente in fase di valutazione, potranno quindi rappresentare un punto di partenza per la successiva ottimizzazione dell'attività, attraverso il bilanciamento degli effetti inibenti sui due enzimi bersaglio, nonché per il design di nuovi analoghi.

Parte sperimentale

PARTE SPERIMENTALE CHIMICA

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Kofler-Reichert. Le analisi elementari per combustione (C, H, N), eseguite con un analizzatore Carlo Erba mod. 1106, sono nel range $\pm 0.4\%$ dei valori teorici. Gli spettri ^1H and ^{13}C NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Avance 300 MHz e con uno spettrometro Varian 500 MHz, controllati da software TOPSPIN e vNMRj rispettivamente, su workstation Linux. I chemical shifts sono espressi in ppm (δ) dal riferimento interno (Me_4Si) e si riferiscono a soluzioni in CDCl_3 o $\text{DMSO-}d_6$. I valori delle costanti di accoppiamento J sono riportati in Hz. Tutti i dati sono stati analizzati su PC per mezzo del pacchetto software Mestrenova (version 6.0.2, Mestrelab research S.L.). La cromatografia su strato sottile è stata realizzata utilizzando lastre di gel di silice GF254 (Merck). A meno che non sia diversamente specificato, tutti i materiali sono stati ottenuti da fonti commerciali ed impiegati senza ulteriore purificazione. La purezza dei composti sintetizzati è stata determinata $\geq 95\%$ per mezzo delle analisi elementari.

Sintesi dell'acido 4-**{[3-(4-fluorofenil)tioureido]metil}benzoico (7)**

Una miscela di 4-fluorofenilisotiocianato (2.2 g, 19 mmol) e acido 4-(amminometil)benzoico (3.3 g, 21 mmol) in etanolo (100 ml) è stata mantenuta a riflusso per 24 h. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo solido è stato cristallizzato da etanolo ottenendo il composto **7**.

Resa 95%; pf 263-266 °C; ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ 4.79 (d $J=3$ Hz, 2H, NCH_2); 6.96 (m, 2H, arom); 7.34 (m, 4H, arom), 7.80 (m, 1H, NH); 7.88 (m, 2H, arom); 9.35 (brs, 1H, NH).

Anal $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ (C, H, F, N).

Sintesi dell'acido 4-[[2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (8).

Una miscela di acido 4-[[3-(4-fluorofenil)tioureido]metil]benzoico (7) (0.49 g, 1.7 mmol) e trietilammina (0.52 g, 5.1 mmol) in etanolo (50 ml) è stata posta a refluxo per 30 min. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, è stata aggiunta una soluzione di cloruro di cloroacetile (2.82 g, 2.5 mmol) in etanolo (10 ml) e la miscela è stata posta a refluxo per 24 h. Dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta, il solido grezzo è stato solubilizzato in CHCl₃ e lavato con acqua. Dopo separazione, la fase organica è stata trattata con Na₂SO₄ anidro e, dopo filtrazione, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato mediante colonna cromatografica in gel di silice (dietil etere/*n*-esano, 3/2). La cristallizzazione da metanolo ha fornito il composto **8** puro. Resa 92%; pf 228-230 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.09 (s, 2H, 5-CH₂); 4.97 (s, 2H, NCH₂); 6.90 (m, 2H, arom); 7.11 (m, 2H, arom); 7.46 (m, 2H, arom); 7.90 (m, 2H, arom). Anal C₁₇H₁₃FN₂O₃S (C, H, F, N).

Metodo generale di sintesi degli acidi 4-[[5-ariliden-2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil]benzoici (5a-f).

Una miscela di acido 4-[[2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (8) (0.52 g, 1.5 mmol) con l'appropriata aldeide (1.5 mmol) e piperidina (0.25 g, 3 mmol) in etanolo (100 ml) è stata posta a refluxo per 72-96 h. La miscela di reazione è stata versata in acqua acidificata con AcOH glaciale (pH 3-4) per ottenere i composti **5** come solidi gialli che sono stati ricristallizzati da metanolo.

Acido 4-[[5-(4-fenossibenziliden)-2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (**5a**)

Resa 43 %; pf 237-240 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.16 (s, 2H, CH₂); 7.00-7.09 (m, 6H, aro)m); 7.19-7.25 (m, 3H, arom); 7.43 (m, 2H, arom); 7.51 (m, 2H, arom), 7.57 (m, 2H, arom); 7.79 (s, 1H, metilidene); 7.94 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 45.6 (CH₂); 116.1, 116.3, 118.4, 119.6, 122.7, 124.5, 127.7, 129.6, 130.2, 132.1 (CH arom e metilidene); 119.2, 128.0, 130.0, 140.8, 143.9, 150.3, 155.2, 158.6, 160.5 (Cq arom, C=N e C-5); 165.8, 167.0 (C=O).

Acido 4-{{5-(3-fenossibenziliden)-2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**5b**)

Resa 41 %; pf 175-178 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5.14 (s, 2H, NCH₂); 6.98 (m, 2H, arom); 7.03-7.06 (m, 3H, arom); 7.08-7.14 (m, 2H, arom); 7.25 (m, 2H, arom), 7.30-7.35 (m, 3H, arom), 7.48-7.51 (m, 3H, arom), 7.77 (s, 1H, metilidene); 7.93 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 45.7 (CH₂); 116.1, 116.3, 117.9, 119.4, 122.6, 122.7, 124.1, 124.8, 127.4, 129.5, 130.2, 131.0 (CH arom e metilidene); 121.8, 130.2, 135.0, 140.7, 143.9, 150.2, 155.6, 157.8, 158.6 (Cq arom, C=N e C-5); 165.6, 167.0 (C=O).

Acido 4-{{5-(4-benzilossibenziliden)-2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**5c**)

Resa 32 %; pf 225-228 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.15 (s, 4H, NCH₂ e OCH₂); 7.03 (m, 2H, arom); 7.14 (m, 2H, arom); 7.24 (m, 2H, arom); 7.33-7.46 (m, 5H, arom); 7.49-7.54 (m, 4H, arom); 7.77 (s, 1H, metilidene); 7.94 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 45.8 (NCH₂); 69.8 (OCH₂); 116.0, 116.1, 116.6, 124.7, 128.0, 128.3, 129.8, 129.9, 131.2, 132.3 (CH arom e metilidene); 119.4, 136.7, 143.5, 150.6, 159.4, 160.2 (Cq arom, C=N e C-5); 164.5, 167.9 (C=O).

Acido 4-{{5-(3-benzilossibenziliden)-2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**5d**)

Resa 48 %; pf 268-270°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5.15 (s, 4H, NCH₂ e OCH₂); 7.03 (m, 2H, arom); 7.10 (m, 2H, arom); 7.19 (s, 1H, arom); 7.27 (m, 2H, arom); 7.30-7.36 (m, 3H, arom), 7.40-7.45 (m, 5H, arom); 7.77 (s, 1H, metilidene); 7.91 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 45.6 (NCH₂); 66.3 (OCH₂); 116.1, 116.3, 116.9, 121.7, 122.7, 127.3, 127.6, 127.9, 128.5, 129.5, 130.4, 130.8 (CH arom e metilidene); 121.4, 134.5, 136.8, 143.9, 150.1, 158.5 (Cq arom, C=N e C-5); 165.7, 167.5 (C=O).

Acido 4-{{5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-2-(4-fluorofenilimmino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil}benzoico (**5e**)

Resa 31 %; pf 238-240 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.03 (t J=7.0 Hz, 2H, CH₂); 4.24 (t J=7.0 Hz, 2H, OCH₂); 5.15 (s, 2H, NCH₂); 7.01-7.03 (m, 2H, arom); 7.06 (m, 2H, arom); 7.22-7.25 (m, 3H, arom); 7.30-7.32 (m, 4H, arom); 7.50 (m, 4H, arom); 7.76 (s, 1H,

metilidene); 7.93 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 34.7, 68.4 (CH_2); 45.6 (NCH_2); 115.4, 116.1, 116.3, 122.7, 126.3, 127.6, 128.2, 128.8, 129.6, 131.9 (CH arom e metilidene); 117.5, 125.6, 130.0, 138.1, 140.9, 144.0, 150.4, 158.5, 160.0 (Cq arom, C=N e C-5); 165.9, 167.0 (C=O).

Acido 4-({5-[3-(2-feniletossi)benziliden]-2-(4-fluorofenilimino)-4-ossotiazolidin-3-il}metil)benzoico (5f).

Resa 35%; pf 317-320 °C; ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.02 (t J=7.0 Hz, 2H, CH_2); 4.20 (t J=7.0 Hz, 2H, OCH_2); 5.12 (s, 2H, NCH_2); 7.02-7.04 (m, 3H, arom); 7.08 (m, 1H, arom); 7.14 (s, 1H, arom); 7.21-7.24 (m, 3H, arom); 7.28-7.30 (m, 4H, arom); 7.38-7.41 (m, 3H, arom); 7.78 (s, 1H, metilidene); 7.88 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 34.6, 68.4 (CH_2); 45.7 (NCH_2); 116.1, 116.3, 121.5, 122.7, 122.8, 126.2, 127.0, 128.2, 128.9, 129.4, 130.4, 130.9 (CH arom e metilidene); 121.2, 134.6, 137.0, 137.8, 138.1, 142.7, 143.6, 143.8, 158.6 (Cq arom, C=N e C-5); 164.2, 165.7 (C=O).

Sintesi dell'acido 4-[(4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoico (9)

L'acido 4-(aminometil)benzoico (0.8 g, 5.29 mmol) è stato solubilizzato con sodio idrossido (0.212 g, 5.29 mmol) in acqua (15 ml). Successivamente, il disolfuro di carbonio (0.403 g, 5.29 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia alla soluzione, la miscela è stata lasciata sotto agitazione per 24 h. L'acido bromoacetico (0.735 g, 5.29 mmol) è stato solubilizzato con idrossido di sodio (0.212 g, 5.29 mmol) in acqua (20 mL) e la soluzione è stata aggiunta alla miscela di reazione, la quale è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 h. La miscela di reazione è stata acidificata con HCl 6M fino a pH 1.0 e mantenuta a refluxo per 24 ore. Successivamente, la miscela di reazione è stata neutralizzata con una soluzione satura di NaHCO_3 . La soluzione risultante è stata nuovamente acidificata con HCl 6M e il solido ottenuto è stato filtrato, lavato con acqua e lasciato asciugare. Il grezzo è stato cristallizzato da metanolo per dare l'acido 4-[(4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoico **9** puro.

Resa 71%; pf 252-254 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4.38 (s, 2H, 5- CH_2); 5.14 (s, 2H, N- CH_2); 7.38 (m, 2H, arom); 7.91 (m, 2H, arom).

Metodo generale di sintesi degli acidi 4-[(5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoici (6a-f).

Una miscela di acido 4-[(4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)metil]benzoico (**9**) (0.34 g, 1.27 mmol) con acetato di sodio (1.3 g, 9.5 mmol) e l'appropriata aldeide (1.27 mmol) è stata posta a riflusso in acido acetico glaciale (10-15 ml) per 4-5 ore. La miscela di reazione è stata versata in acqua per dare i composti **6** come solidi giallo-arancio, i quali sono stati ricristallizzati da metanolo.

Acido 4-[[5-(4-fenossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (6a)

Resa 71%; pf 277-280 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.31 (s, 2H, NCH₂); 7.1]3 (m, 4H, arom); 7.26 m, 1H, arom); 7.42 (m, 2H, arom); 7.47 (m, 2H, arom); 7.70 (m, 2H, arom); 7.86 (s, 1H, metilidene); 7.91 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 46.9 (NCH₂); 118.3, 120.0, 124.8, 127.6, 129.6, 130.4, 133.2 (CH arom e metilidene); 120.4 (C-5); 127.5, 130.1, 139.7, 154.9, 159.6 (Cq arom); 166.9, 167.0 (C=O); 193.2 (C=S).

Acido 4-[[5-(3-fenossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (6b)

Resa 59%; pf 233-235 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.29 (s, 2H, NCH₂); 7.10 (m, 2H, arom); 7.17-7.25 (m, 3H, arom); 7.40-7.46 (m, 5H, arom); 7.57 (m, 1H, arom); 7.86 (s, 1H, metilidene); 7.90 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 47.0 (NCH₂); 119.4, 119.8, 120.9, 124.2, 125.3, 127.5, 129.6, 130.3, 131.2, 132.8 (CH arom e metilidene); 123.3 (C-5); 130.1, 134.8, 139.6, 155.8, 157.6 (Cq arom); 166.8, 166.9 (C=O); 193.4 (C=S).

Acido 4-[[5-(4-benzilossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (6c)

Resa 70%; pf 269-272 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.22 (s, 2H, OCH₂); 5.30 (s, 2H, NCH₂); 7.21 (m, 2H, arom); 7.35 (m, 1H, arom); 7.39-7.42 (m, 4H, arom); 7.47 (m, 2H, arom); 7.65 (m, 2H, arom); 7.84 (s, 1H, metilidene); 7.90 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 46.9 (NCH₂); 69.6 (OCH₂); 116.0, 127.5, 127.8, 128.1, 128.5, 129.6, 133.0, 133.8 (CH arom e metilidene); 125.7 (C-5); 130.1, 136.4, 139.8, 160.7 (Cq arom); 166.9, 167.0 (C=O); 193.3 (C=S).

Acido 4-[[5-(3-benzilossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]metil]benzoico (6d)

Resa 60%; pf 253-256 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.19 (s, 2H, OCH₂); 5.30 (s, 2H, NCH₂); 7.19 (dd J=7.5 e 2.5 Hz, 1H, arom); 7.23 (d J=7.5 Hz, 1H, arom); 7.28 (s, 1H, arom); 7.34

(t J=7.5 Hz, 1H, arom); 7.39-7.42 (m, 4H, arom); 7.47-7.51 (m, 3H, arom); 7.84 (s, 1H, metilidene); 7.90 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 47.0 (NCH₂); 69.4 (OCH₂); 116.6, 118.0, 122.9, 127.5, 127.7, 128.0, 128.5, 129.6, 130.7, 133.4 (CH arom e metilidene); 122.7 (C-5); 130.1, 134.3, 136.6, 139.7, 158.8 (Cq arom); 166.9 (C=O); 193.5 (C=S).

Acido 4-({5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}metil) benzoico (6e)

Resa 33%; pf 227-230 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.06 (t J=6.7 Hz, 2H, CH₂); 4.30 (t J=6.7 Hz, 2H, OCH₂); 5.30 (s, 2H, NCH₂); 7.14 (m, 2H, arom); 7.31-7.33 (m, 5H, arom); 7.41 (m, 2H, arom); 7.63 (m, 2H, arom); 7.84 (s, 1H, metilidene); 7.90 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 34.7 (CH₂); 46.6 (NCH₂); 68.3 (OCH₂); 115.7, 122.6, 126.4, 127.5, 128.3, 129.0, 129.6, 133.1 (CH arom e metilidene); 118.9 (C-5); 125.6, 130.2, 138.1, 142.2, 156.1 (Cq arom); 166.8, 167.7 (C=O); 193.6 (C=S).

Acido 4-({3-[3-(2-feniletossi)benziliden]-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}metil) benzoico (6f)

Resa 47%; pf 211-214 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.06 (t J=7.0 Hz, 2H, CH₂); 4.26 (t J=7.0 Hz, 2H, OCH₂); 5.30 (s, 2H, NCH₂); 7.11 (dd J=8.0 e 2.0 Hz, 1H, arom); 7.20-7.24 (m, 3H, arom); 7.30-7.35 (m, 4H, arom); 7.41 (m, 2H, arom); 7.47 (dd J=8.0 e 8.0 Hz, 1H, arom); 7.85 (s, 1H, metilidene); 7.90 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 34.8 (CH₂); 47.0 (NCH₂); 68.4 (OCH₂); 116.4, 117.7, 122.5, 126.3, 127.5, 128.3, 129.0, 129.6, 130.7, 133.6 (CH arom e metilidene); 122.6 (C-5); 130.2, 134.3, 138.2, 139.6, 158.9 (Cq arom); 166.8, 166.9 (C=O); 193.4 (C=S).

Metodo generale di sintesi delle 3- e 4-(2-feniletossi)benzaldeidi

Ad una miscela della 3- o 4-idrossibenzaldeide (2 g, 16.37 mmol) e potassio carbonato (8.84 g, 64 mmol) in DMF anidra (80 ml) viene aggiunto il 2-fenilettilbromuro (5.92 g, 32 mmol) in piccole quantità ad intervalli regolari di circa 15 min. La miscela viene mantenuta sotto agitazione a 40-50 °C per circa 24 ore. La soluzione viene diluita con acqua (20 ml) e acidificata con HCl fino pH 6. In seguito viene trattata con acetato d'etile fino a completa estrazione del prodotto di reazione. La soluzione organica viene

quindi lavata ripetutamente e abbondantemente con H₂O, poi disidratata con Na₂SO₄ anidro ed infine il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato tramite cromatografia su colonna (etere di petrolio: etere etilico = 9.5 : 0.5 oppure cicloesano : etere etilico = 8 : 2).

3-(2-Feniletossi)benzaldeide

Resa 34%; olio incolore; ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.08 (t J=6.9 Hz, 2H, CH₂); 4.18 (t J=6.9 Hz, 2H, OCH₂); 7.11-7.40 (m, 9H, arom); 9.90 (s, 1H, CHO).

4-(2-Feniletossi)benzaldeide

Resa 27%; olio incolore; ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.12 (t J=6.9 Hz, 2H, CH₂), 4.23 (t J=6.9 Hz, 2H, OCH₂), 6.97 (m, 2H, arom), 7.28-7.32 (m, 5H, arom), 7.80 (m, 2H, arom), 9.86 (s, 1H, CHO).

Metodo generale di sintesi degli acidi 2-{4-[(2,4-diossotiazolidin-3-il)metil]fenil}acetici (10a-f)

Una miscela di 2,4-tiazolidinone (8.53 mmol) con l'aldeide opportunamente sostituita (8.53 mmol) e piperidina (6.82 mmol) in etanolo (50 ml) è stata posta a riflusso per 24 h. Il grezzo di reazione è stato versato in H₂O acidificata con AcOH per ottenere i composti **11a-f** come solidi che sono stati ricristallizzati da metanolo. Una miscela del corrispondente 5-arilidene-2,4-tiazolidindione **11** (2,01 mmol), acido 4-(bromometil)fenilacetico (4.02 mmol) e potassio carbonato (4.02 mmol) in acetone (40 ml) è stata posta a riflusso per 48 h. Il solvente di reazione è stato allontanato a pressione ridotta e il grezzo è stato ripreso con acqua acidificata con HCl concentrato. Il solido è stato filtrato e lavato con acqua distillata fino a pH neutro. I prodotti **10a-10f** puri sono stati ottenuti per ricristallizzazione da metanolo.

Acido 2-(4-{[5-(3-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil}fenil)acetico (10a)

Resa 34 %; p.f. 165-175 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.35 (s, 2H, CH₂COOH); 4.77 (s, 2H, NCH₂); 7.07-7.25 (m, 9H, arom); 7.36-7.47 (m, 3H, arom); 7.54-7.57 (m, 1H, arom); 7.94 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 2-(4-[[5-(4-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenil)acetico (10b)

Resa 37 %; p.f. 208-212 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.47 (s, 2H, CH_2COOH); 4.80 (s, 2H, NCH_2); 7.09-7.14 (m, 4H, arom); 7.22-7.27 (m, 5H, arom); 7.43-7.49 (m, 2H, arom); 7.66 (m, 2H, arom); 7.95 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 2-(4-[[5-(3-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenil)acetico (10c)

Resa 46 %; p.f. 150-156 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.45 (s, 2H, CH_2COOH); 4.79 (s, 2H, OCH_2); 5.15 (s, 2H, NCH_2); 7.13-7.25 (m, 7H, arom); 7.32-7.48 (m, 6H, arom); 7.91 (s, 1H, metilidene).

Acido 2-(4-[[5-(4-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenil)acetico (10d)

Resa 29 %; p.f. 252-255 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.41 (s, 2H, CH_2COOH); 4,78 (s, 2H, OCH_2); 5,18 (s, 2H, NCH_2); 7.17-7.25 (m, 6H, arom); 7.33-7.47 (m, 5H, arom); 7.59 (m, 2H, arom); 7.91 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 2-(4-[[5-(naftalen-1-ilmetilen)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenil)acetico (10e)

Resa 41 %; olio giallo; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.65 (s, 2H, CH_2COOH); 5.44 (s, 2H, NCH_2); 7.17-7.20 (m, 6H, arom); 7.11-7.55 (m, 7H, arom); 7.75-8.08 (m, 4H, arom); 7.95 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 2-(4-[[5-(naftalen-2-ilmetilen)-2,4-diossotiazolidin-3-il]metil]fenil)acetico (10f)

Resa 39 %; p.f. 280 °C dec.; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.61 (s, 2H, CH_2COOH); 5.39 (s, 2H, NCH_2); 7.11 (m, 4H, arom); 7.48-7.75 (m, 4H, arom); 7.83-8.0 (m, 3H, arom); 7.93 (s, 1H, CH metilidene).

Metodo generale di sintesi dei 3-aril-2-tiosso-4-imidazolidinoni (13a-e)

Una miscela di arilisotiocianato (5.32 mmol) e glicina (6.66 mmol) in soluzione idroalcolica (35% acqua vol/vol) è stata riscaldata a riflusso per 24 ore. Il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta. Il residuo solido è stato lavato, asciugato e ricristallizzato da metanolo per ottenere i 3-aril-2-tiosso-4-imidazolidinoni **13**.

3-(4-Fluorofenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (13a)

Resa 54 %; p.f. 227-230 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4.28 (s, 2H, CH₂); 7.32 (m, 2H, arom); 7.34 (m, 2H, arom); 10.46 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 49.7, 116.2 (J = 23.25), 130.3, 131.6, 162.3 (J = 243.75), 172.8, 183.8.

3-(4-Metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (13b)

Resa 82 %; p.f. 222 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): 3.87 (s, 3H, OCH₃); 4.33 (s, 2H, CH₂); 7.09 (m, 2H, arom); 7.26 (m, 2H, arom); 10.40 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 55.1, 55.6, 113.9, 129.8, 130.0, 159.1, 172.3, 183.7.

3-(4-Tiometilfenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (13c)

Resa 75 %; p.f. 232-235 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.32 (s, 3H, SCH₃); 4.28 (s, 2H, CH₂); 6.53 (m, 2H, arom); 7.04 (m, 2H, arom); 9.93 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 15.9, 55.0, 122.0, 130.5, 135.9, 139.1, 173.5, 182.5.

3-(Naft-1-il)-2-tiosso-4-imidazolidinone (13d)

Resa 92 %; p.f. 214-216 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4.31 (s, 2H, CH₂), 7.50-7.64 (m, 4H, arom), 7.86 (m, 1H, arom), 7.97 (m, 1H, arom), 8.04 (m, 1H, arom), 9.84 (brs, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 49.6, 123.7, 126.2, 126.6, 127.3, 128.56, 130.7, 134.4, 135.8, 172.0, 183.3.

3-Fenil-2-tiosso-4-imidazolidinone (13e)

Resa 63 %; p.f. 250 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4.29 (s, 2H, CH₂), 7.25-7.30 (m, 2H, arom), 7.40-7.51 (m, 3H, arom), 10.39 (brs, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl₃): δ 49.7, 114.2, 120.6, 130.3, 156.5, 171.8, 183.6.

Metodo generale di sintesi dei 3-aril-5-ariliden-2-tiosso-4-imidazolidinoni (12a-ab)

Una miscela di 3-aril-2-tiosso-4-imidazolidinone **13** (2.26 mmol) con l'appropriata benzaldeide sostituita (2.26 mmol) e piperidina (2.1 mmol) in etanolo (20 ml) sono stati messi a riflusso per 4-5 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata e versata in acqua acidificata con AcOH (pH 3-4). Il precipitato è stato separato mediante

filtrazione, lavato con acqua e asciugato. La cristallizzazione da metanolo del prodotto grezzo ha fornito i composti **12** puri.

5-(4-Fenossibenziliden)-3-(4-fluorofenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12a)

Resa 54%; p.f. 219-222 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.69 (s, 1H, CH metilidene); 7.04 (m, 2H, arom); 7.11 (m, 2H, arom); 7.22 (m, 1H, arom); 7.35 (m, 2H, arom); 7.43-7.47 (m, 4H, arom); 7.85 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 113.5, 114.9 (J=23.3 Hz), 118.5, 122.2, 123.4, 124.2, 128.1, 128.6, 131.0, 133.9, 138.2, 156.9, 157.2, 162.5 (J=245.1 Hz), 164.9, 175.2.

5-(4-Fenossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12b)

Resa 30 %; p.f. 227-230 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.80 (s, 3H, OCH₃); 6.67 (s, 1H, CH metilidene); 7.04 (m, 4H, arom); 7.10 (m, 2H, arom); 7.22 (m, 1H, arom); 7.26 (m, 2H, arom); 7.45 (m, 2H, arom); 7.85 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.4, 112.4, 114.0, 118.1, 119.4, 124.3, 125.5, 125.8, 127.4, 129.9, 130.3, 132.4, 155.6, 158.0, 159.3, 164.1, 178.8.

5-(4-Fenossibenziliden)-3-(4-metiltiofenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12c)

Resa 63 %; p.f. 239-242°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.53 (s, 3H, SCH₃); 6.68 (s, ¹H, CH metilidene); 7.03 (m, 2H, arom); 7.10 (m, 2H, arom); 7.22 (m, 1H, arom); 7.29-7.39 (m, 4H, arom); 7.45 (m, 2H, arom); 7.85 (m, 2H, arom); 9.92 (brs, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 15.1, 112.6, 118.2, 119.4, 119.5, 125.5, 126.1, 127.3, 129.4, 129.9, 130.6, 132.2, 139.3, 155.6, 158.0, 163.9, 178.4.

5-(4-Fenossibenziliden)-3-(naft-1-il)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12d)

Resa: 24 %; p.f. 169-172°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.74 (s, 1H, CH metilidene), 7.05-7.29 (m, 5H, arom), 7.44-7.68 (m, 7H, arom), 7.91 (m, 2H, arom), 8.08 (m, 2H, arom), 9.92 (brs, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 113.1, 117.6, 118.1, 118.2, 119.4, 119.6, 120.3, 120.1, 125.3, 125.8, 127.4, 129.9, 130.6, 132.4, 132.5, 133.6, 133.8, 150.8, 155.6, 158.1, 164.3, 178.7.

3-Fenil-5-(4-fenilbenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12e)

Resa 60 %; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.69 (s, ^1H , CH metilidene); 7.35-7.40 (m, 2H, arom); 7.46-7.53 (m, 3H, arom); 7.74-7.78 (m, 5H, arom); 7.93 (m, 2H, arom); 8.16 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 112.6, 126.3, 126.8, 127.0, 128.1, 128.9, 129.1, 131.1, 131.5, 133.3, 139.2, 140.9, 164.0, 178.6.

3-Fenil-5-(3-fenossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12f)

Resa 45 %; p.f. 138-140 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.67 (s, 1H, CH metilidene); 7.02-7.05 (m, 3H, arom); 7.14 (m, 1H, arom); 7.36-7.57 (m, 10H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 69.8, 113.3, 113.7, 116.5, 116.7, 123.6, 126.9, 128.3, 128.4, 128.9, 129.2, 129.3, 130.4, 133.7, 134.2, 137.3, 158.9, 164.5, 179.4.

3-Fenil-5-(4-fenossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12g)

Resa: 64 %; p.f. 200 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.68 (s, 1H, CH metilidene), 7.03 (m, 2H, arom), 7.10 (m, 2H, arom), 7.21 (m, 1H, arom), 7.36-7.51 (m, 7H, arom), 7.85 (m, 2H, arom); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 113.1, 118.6, 120.0, 124.8, 125.9, 127.8, 129.3, 130.7, 133.0, 133.8, 156.1, 158.5, 164.4, 178.8.

5-(3-Benzilossibenziliden)-3-fenil-2-tiosso-4-imidazolidinone (12h)

Resa 57 %; p.f. 197-200 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 5.19 (s, 2H, OCH₂), 6.65 (s, 1H, CH metilidene); 7.09 (m, 1H, arom); 7.38-7.53 (m, 13H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 69.5, 113.0, 116.3, 116.4, 123.30, 126.7, 128.0, 128.1, 128.7, 128.9, 129.1, 130.2, 133.4, 133.7, 137.0, 158.8, 164.1, 178.9.

5-(4-Benzilossibenziliden)-3-fenil-2-tiosso-4-imidazolidinone (12i)

Resa 56 %; p.f. 233-235 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 5.19 (s, 2H, OCH₂), 6.67 (s, 1H, CH metilidene); 7.10 (m, 2H, arom); 7.39-7.49 (m, 10H, arom); 7.82 (m, 2H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 69.4, 113.5, 115.3, 124.5, 125.1, 127.9, 128.0, 128.5, 128.9, 132.4, 133.4, 136.7, 159.5, 164.0, 178.0.

3-Fenil-5-(3-metossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12j)

Resa: 43 %; p.f. 153-155 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.82 (s, 3H, OCH₃), 6.61 (s, 1H, CH metilidene), 6.98 (d, J = 3 Hz, 1H, arom), 7.35-7.51 (m, 8H, arom); ^{13}C NMR (DMSO- d_6):

δ 55.2, 113.1, 114.9, 115.8, 123.0, 126.6, 129.2, 130.1, 133.3, 133.8, 159.5, 164.1, 178.8.

3-Fenil-5-(4-metossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12k)

Resa: 72 %; p.f. 234-237 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.67 (s, 1H, CH metilidene), 7.03 (m, 2H, arom), 7.36-7.38 (m, 2H, arom), 7.48-7.56 (m, 3H, arom), 7.83 (m, 2H, arom); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 55.7, 113.9, 114.8, 124.7, 125.1, 129.0, 129.1, 132.6, 133.6, 160.7, 164.2, 178.2.

3-Fenil-5-(4-metiltiobenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12l)

Resa: 67 %; p.f. 230-233 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.53 (s, 3H, SCH₃), 6.67 (s, 1H, CH metilidene), 7.32 (m, 2H, arom), 7.36-7.39 (m, 2H, arom), 7.48-7.53 (m, 3H, arom), 7.78 (m, 2H, arom); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 14.2, 112.8, 125.5, 125.7, 128.7, 128.9, 130.9, 133.4, 140.9, 164.0, 178.3.

3-Fenil-5-(3-trifluorometossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12m)

Resa 38 %; p.f.140-143 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.71 (s, 1H, CH metilidene); 7.36-7.39 (m, 3H, arom); 7.44-7.47 (m, 1H, arom), 7.49-7.52 (m, 2H, arom), 7.54-7.58 (m, 1H, arom), 7.79-7.81 (m, 1H, arom), 7.84 (s, 1H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 110.6, 118.5, 121.5, 121.9, 122.4, 127.6, 128.8, 128.9, 129.5, 130.7, 133.2, 134.7, 148.8, 148.9, 163.9, 179.1.

3-Fenil-5-(4-trifluorometiltiobenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12n)

Resa 25 %; p.f. 186-189 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.69 (s, 1H, CH metilidene); 7.37 (m, 2H, arom); 7.48-7.51 (m, 3H, arom); 7.75 (m, 2H, arom), 7.91 (m, 2H, arom), 12.70 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 113.9, 126.2, 127.9, 128.5, 129.1, 130.9, 133.2, 135.1, 137.1, 138.0, 164.9, 176.0.

3-Fenil-5-(3,4-dimetossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12o)

Resa: 80.3 %; p.f. 211-215 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.82 e 3.86 (2s, 6H, 2 OCH₃), 6.66 (s, 1H, CH metilidene), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom), 7.33-7.41 (m, 3H, arom), 7.43-7.55 (m, 4H, arom); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 55.7, 55.9, 111.9, 113.6, 114.2, 124.6, 124.7, 125.1, 128.8, 128.9, 133.5, 148.9, 150.5, 164.1, 178.1.

3-Fenil-5-(3,4-diidrossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12p)

Resa 21 %; p.f. 186-189 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.53 (s, 1H, CH metilidene), 6.80 (s, 1H, arom), 7.17-7.21 (m, 2H, arom); 7.33-7.36 (m, 2H, arom), 7.43-7.52 (m, 3H, arom); 9.20 e 9.79 (2 brs, 2H, OH); 12.40 (s br, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 113.3, 115.5, 123.9, 128.2, 128.5, 129.2, 129.6, 133.9, 139.1, 146.1, 146.9, 164.5, 175.3.

3-Fenil-5-(4-idrossi-3-metossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12q)

Resa: 53 %; p.f. 240-242 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.87 (s, 3H, OCH₃), 6.64 (s, 1H, CH metilidene), 6.85 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom), 7.32 (s, 1H, arom), 7.36 (d, J = 8.4 Hz, 1H, arom), 7.45-7.54 (m, 4H, arom), 7.50 (m, 3H, arom), 9.78 (brs, 1H, OH), 12.52 (s br, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 56.1, 114.3, 114.9, 116.0, 123.8, 123.9, 125.2, 128.8, 128.9, 133.5, 147.9, 149.0, 164.0, 177.8.

3-Fenil-5-(3-idrossi-4-metossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12r)

Resa: 78 %; p.f. 281-284 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.84 (s, 3H, OCH₃), 6.56 (s, 1H, CH metilidene), 7.00 (d, J = 8.7 Hz, 1H, arom); 7.24 (s, 1H, arom); 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 1H, arom), 7.36 (m, 2H, arom), 7.43-7.54 (m, 3H, arom), 9.21 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 55.8, 112.1, 114.2, 117.3, 123.1, 124.8, 125.3, 128.8, 128.9, 133.5, 146.6, 149.5, 164.0, 178.0.

3-Fenil-5-(3,4,5-trimetossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12s)

Resa 59 %; p.f. 186-189 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 6H, OCH₃), 6.63 (s, 1H, CH metilidene), 7.03 (s, 2H, arom), 7.35-7.37 (m, 2H, arom); 7.44-7.47 (m, 1H, arom), 7.49-7.52 (m, 2H, arom); 12.66 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 56.3, 60.2, 108.1, 113.8, 125.6, 127.9, 128.9, 133.4, 139.0, 153.1, 164.0, 178.5.

3-Fenil-5-(4-fluoro-3-metossibenziliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12t)

Resa 55 %; p.f. 217-220 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.94 (s, 3H, OCH₃); 6.68 (s, 1H, CH metilidene); 7.27-7.55 (3m, 8H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 56.4, 112.4, 115.7, 116.4, 116.5, 123.7, 126.5, 128.9, 129.0, 129.6, 133.4, 147.5, 151.2, 153.2, 164.1, 178.8.

5-(4-Acetilaminobenziliden)-3-fenil-2-tiosso-4-imidazolidinone (12u)

Resa 51 %; p.f. 277-280 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.06 (s, 3H, CH₃), 6.62 (s, 1H, CH metilidene); 7.37 (m, 2H, arom), 7.49 (m, 2H, arom), 7.65 (m, 2H, arom), 7.77 (m, 2H, arom), 10.17 (brs, 1H, NH), 12.49 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 24.5, 119.3, 124.9, 126.9, 128.5, 129.1, 130.7, 131.0, 131.6, 133.2, 133.4, 154.6, 168.7, 179.8.

3-Fenil-5-(naftalen-1-ilmetiliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12v)

Resa 72 %; p.f. 108-110 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 7.23 (s, 1H, CH metilidene); 7.37-7.61 (m, 8H, arom); 7.86 (m, 1H, arom); 7.97 (m, 2H, arom); 8.10 (m, 1H, arom). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 109.5, 123.8, 125.9, 126.5, 127.2, 128.6, 128.8, 128.9, 129.0, 129.7, 131.2, 133.4, 163.6, 178.8.

3-Fenil-5-(naftalen-2-ilmetiliden)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12w)

Resa 52 %; p.f. 210-213 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.80 (s, 1H, CH metilidene); 7.36-7.57 (m, 10H, arom); 7.83-7.98 (m, 2H, arom); 12.74 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 113.0, 126.7, 126.8, 127.4, 127.5, 127.7, 128.4, 128.6, 128.9, 129.0, 130.0, 130.1, 133.0, 133.1, 133.4, 164.0, 178.9.

5-(3,4-Dimetossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12x)

Resa 51 %; p.f. 209-211 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.81 (s, 3H, OCH₃); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 6.64 (s, 1H, CH metilidene); 7.03-7.06 (m, 3H, arom); 7.27 (m, 2H, arom); 7.32 (m, 1H, arom); 7.43 (m, 1H, arom).

5-(3,4,5-Trimetossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12y)

Resa 43 %; p.f. 190-192 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.71 (s, 3H, OCH₃); 3.81 (s, 3H, OCH₃); 3.87 (s, 6H, 2 OCH₃)₂; 6.63 (s, 1H, CH metilidene); 7.04-7.07 (m, 4H, arom); 7.28 (m, 2H, arom).

5-(3-Idrossi-4-metossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12z)

Resa 49 %; p.f. 277-280 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.80-3.84 (s, 6H, 2 OCH₃); 6.55 (s, 1H, CH metilidene); 6.98-7.06 (m, 3H, arom); 7.32-7.22 (m, 4H, arom).

5-(4-Ildrossi-3-metossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12aa)

Resa 34 %; p.f. 227-230 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 6.61 (s, 1H, CH metilidene); 6.83-6.84 (m, 1H, arom); 7.04 (m, 2H, arom); 7.23-7.83 (m, 4H, arom).

5-(3,4-Diidrossibenziliden)-3-(4-metossifenil)-2-tiosso-4-imidazolidinone (12ab)

Resa 28 %; p.f. 280-283 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.80 (s, 3H, OCH₃); 6.53 (s, 1H, CH metilidene); 6.81 (m, 1H, arom); 7.02 (m, 2H, arom); 7.17-7.27 (m, 4H, arom).

Metodo generale di sintesi degli acidi 2-arilcarbamoilbenzoici (28a-q)

Una miscela di anidride ftalica (g 0.5; 3.37 mmol) e dell'opportuna ammina (3.37 mmol) in acetato di etile (30 ml) è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3-5 ore, seguendo l'andamento della reazione per cromatografia su strato sottile. La miscela è stata filtrata e il solido lasciato asciugare. Dopo ricristallizzazione da etere etilico o metanolo si ottiene il corrispondente composto **28** puro.

Acido 2-[(2-feniletil)carbamoil]benzoico (28a)

Resa 85 %; p.f. 155-159 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.81 (t J= 6.0 Hz, 2H, PhCH₂); 3.39 (m, 2H, NHCH₂); 7.18-7.34 (m, 6H, arom); 7.46-7.59 (m, 2H, arom); 7.75 (m, 1H, arom); 8,41 (m, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 35.2 (PhCH₂); 41.2 (NHCH₂); 126.5, 127.4, 128.8, 129.1, 129.6, 131.1, 131.5 (CH arom); 129.5, 139.0, 140.0 (Cq arom); 168.5, 168.9 (2 C=O).

Acido 2-[(3-fenilpropil)carbamoil]benzoico (28b)

Resa 90 %; p.f. 132-136 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.78 (m, 2H NHCH₂CH₂CH₂Ph); 2.64 (t J=7.80 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂Ph); 3.20 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂Ph); 7.15-7.31 (m, 4H, arom); 7.39 (m, 1H arom); 7.47-7.59 (m, 2H, arom); 7.76 (m, 1H, arom); 8.34 (m, 1H, NH).

Acido 2-(benzilcarbamoil)benzoico (28c)

Resa 88 %; p.f. 149-154 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4.43 (d J= 6.3 Hz, 2H, CH_2Ph); 7.22-7.40 (m, 5H, arom); 7.45-7.61 (m, 3H, arom); 7.77 (m, 1H, arom); 8.86 (t J=6.0 Hz, 1H, NH).

Acido 2-[(2-morfolinetil)carbamoil]benzoico (28d)

Resa 93 %; p.f. 134-138 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.38 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pip}}\text{CH}_2$); 2.49 (m, 2H, NHCH_2CH_2); 2.61-2.67 (m, 2H, NHCH_2); 3.33 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{O}_{\text{pip}}\text{CH}_2$); 3.65-3.70 (m,); 7.30-7.32 (m, 1H, arom); 7.47-7.50 (m, 2H, arom); 7.69-7.72 (m, 1H, arom); 7.79-7.7.85 (m, 2H, arom); 8.25 (m, 1H, NH).

Acido 2-[(3-morfolinopropil)carbamoil]benzoico (28e)

Resa 97 %; p.f. 155-159 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.73 (m, 2H, CH_2); 2.45-2.55 (m, 6H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{CH}_2\text{NCH}_2$); 3.26 (m, 2H, NHCH_2); 3.64 (m, 4H, CH_2OCH_2); 7.42-7.45 (m, 1H, arom); 7.50-7.61 (m, 2H, arom); 7.76-7.79 (m, 1H, arom); 8.42 (m, 1H, NH).

Acido 2-(morfolinocarbamoil)benzoico (28f)

Resa 81%; p.f. 226-229 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.81 (m, 4H, CH_2N); 3.65 (m, 4H, CH_2O); 7.29-7.38 (m, 1H, arom); 7.42-7.61 (m, 2H, arom); 7.81 (m, 1H, arom); 8.95 (s, 1H, NH); 9.24 (s, 1H, COOH).

Acido 2-[(3-fenossifenil)carbamoil]benzoico (28g)

Resa 33%; p.f. 137-140 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.70 (m, 1H, arom); 7.02 (m, 1H, arom); 7.13 (m, 1H, arom); 7.28-7.43 (m, 6H, arom); 7.49-7.65 (m, 3H, arom); 7.85 (m, 1H, arom); 10.42 (s, 1H, NH/COOH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 107.5, 114.2, 114.9, 119.2, 121.0, 123.6, 128.5, 128.6, 129.8, 131.5, 132.8, 134.2, 156.8, 167.5, 172.8.

Acido 2-[(3-benzilossifenil)carbamoil]benzoico (28h)

Resa 65,4%; p.f. 159-162 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 5.06 (s, 2H, OCH_2); 6.71 (m, 1H, arom); 7.17-7.26 (m, 2H, arom); 7.29-7.66 (m, 9H, arom); 7.86 (m, 1H, arom); 10.33 (s, 1H, NH/COOH).

Acido 2-[(3-benzoilfenil)carbamoil]benzoico (28i)

Resa 64,2%; p.f. 170-174 °C; H NMR (DMSO- d_6): δ 7.52-7.76 (m, 10H, arom); 7.84-7.91 (m, 3H, arom); 10.76 (s, 1H, NH/COOH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 120.1, 123.4, 125.6, 125.9, 128.3, 128.5, 130.5, 130.6, 131.6, 131.9, 131.5, 131.6, 132.5, 132.8, 134.3, 135.2, 138.7, 144.6, 167.6, 173.4, 194.5.

Acido 2-[(4-fenossifenil)carbamoil]benzoico (28j)

Resa 48 %; p.f. 159-164°C; H NMR (DMSO- d_6): δ 6.95-7.13 (m, 5H, arom); 7.34-7.41 (m, 2H, arom); 7.53-7.74 (m, 5H, arom); 7.89 (m, 1H, arom); 10.39 (s, 1H, NH/COOH).

Acido 2-[(1,1'-bifenil)-3-il]carbamoil}benzoico (28k)

Resa 75 %; p.f. 168-173°C; H NMR (DMSO- d_6): δ 7.32-7.70 (m, 11H, arom); 7.85 (m, 1H, arom); 8.05 (s, 1H, arom); 10.45 (s, 1H, NH/COOH).

Acido 2-[(1,1'-bifenil)-4-il]carbamoil}benzoico (28l)

Resa 78 %; p.f. 191-196°C; H NMR (DMSO- d_6): δ 7.30 (m, 1H, arom); 7.45 (m, 2H, arom); 7.52-7.67 (m, 6H, arom); 7.76 (m, 2H, arom); 7.86 (m, 1H, arom); 10.43 (s, 1H, NH/COOH).

Acido 2-[(3-trifluorometilfenil)carbamoil]benzoico (28m)

Resa 69,2 %; p.f. 197-200°C; H NMR (DMSO- d_6): δ 7.43 (m, 1H, arom); 7.55-7.71 (m, 5H, arom); 7.84 (m, 1H, arom); 7.91 (m, 1H, arom); 8.21 (s, 1H, NH); 10.70 (s, 1H, COOH).

Acido 2-[(4-n-butilfenil)carbamoil]benzoico (28n)

Resa 40 %; p.f. 165-167°C; H NMR (DMSO- d_6): δ 0.88 (t J= 6.0 Hz, 3H, CH_3); 1.30 (m, 2H, CH_2CH_3); 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$); 2.51 (m, 2H, CH_2Ph); 7.13 (m, 2H, arom); 7.48-7.65 (m, 6H, arom); 7.84 (m, 1H, arom); 10.25 (s, 1H, NH/COOH).

Acido 2-[(5-etil-1,3,4-tiazol-2-il)carbamoil]benzoico (28o)

Resa 72 %; p.f. 170-174 °C; H NMR (DMSO- d_6): δ 1.31 (t, J= 9 Hz, 3H, CH_3); 3,01 (q, J= 9 Hz, 2H, CH_2); 7.56-7.71 (m, 3H, arom); 7.92 (m, 1H, arom).

Acido 2-[(5-trifluorometil-1,3,4-tiazol-2-il)carbamoil]benzoico (28p)

Resa 12 % p.f. 177-181°C; H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.56-7.75 (m, 2H, arom); 7.95-8.03 (m, 1H, arom); 8.05-8.08 (m, 1H, arom).

Acido 2-[(benzotiazol-2-il)carbamoil]benzoico (28q)

Resa 78 %; p.f. 203-205°C; H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.33 (m, 1H, arom); 7.45 (m, 1H, arom); 7.56-7.70 (m, 3H, arom); 7.76 (m, 1H, arom); 7.94 (m, 1H, arom); 8.01 (m, 1H, arom).

Metodo generale di sintesi degli acidi (5-ariliden-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il) acetici (39-51)

Una miscela di acido (4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)acetico (1.12g, 6 mmol) con l'appropriata aldeide (6 mmol), sodio acetato (3.69, 45 mmol) e acido acetico glaciale (30 ml) è stata posta a riflusso per 4-5 ore. La miscela di reazione è stata versata in H₂O e filtrata. Il solido grezzo è stato ricristallizzato da metanolo per ottenere i composti **39-51** puri.

I dati analitici e spettroscopici dei composti **39-47** sono stati precedentemente riportati [Maccari 2011, 2014].

Acido [5-(3-fenil-2-propen-1-ilidene)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]acetico (48)

Resa 23%; p.f. 262-265 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.50 (s, 2H, NCH₂); 7.10 (dd J=15.0 Hz and J=12.0 Hz, 1H, =CH); 7.38-7.43 (m, 4H, arom and =CH); 7.55 (d J=12.0 Hz, 1H, =CH); 7.70-7.73 (m, 2H, arom). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 47.6, 119.0, 124.9, 127.5, 128.5, 128.6, 135.4, 136.2, 138.2, 167.6, 169.0, 194.7.

Acido {5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}acetico (49)

Resa 42%; p.f. 237-240 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.06 (t J=6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.30 (t J=6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.52 (s, 2H, NCH₂), 7.13 (m, 2H, arom), 7.28-7.33 (m, 5H, arom), 7.62 (m, 2H, arom), 7.78 (s, 1H, CH metilidene). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 35.5, 47.4, 69.3, 114.3, 116.5, 125.9, 126.4, 127.2, 129.2, 129.8, 138.9, 143.3, 161.5, 167.5, 167.9, 193.9.

Acido {5-[3-(2-feniletossi)benziliden]-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}acetico (50)

Resa 24%; p.f. 172-175 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.06 (t J=6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.26 (t J=6.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.73 (s, 2H, NCH₂), 7.11 (m, 1H, arom), 7.23-7.29 (m, 3H, arom), 7.32-7.35 (m, 4H, arom), 7.50 (m, 1H, arom), 7.86 (s, 1H, CH metilidene). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 35.1, 45.4, 68.8, 116.7, 118.5, 122.5, 122.9, 126.8, 128.6, 129.7, 131.0, 134.4, 134.9, 138.6, 159.2, 166.8, 167.7, 193.7.

Acido {5-[(4-benzilossi-3-metossi)benziliden]-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il}acetico (51)

Resa 73%; pf 277-280 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.49 (s, 2H, NCH₂), 5.19 (s, 2H, OCH₂), 7.24-7.26 (m, 3H, arom), 7.34-7.46 (m, 5H, arom), 7.78 (s, 1H, CH metilidene). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 48.6, 56.1, 71.6, 110.5, 114.8, 116.0, 123.0, 126.4, 128.4, 128.5, 128.8, 136.7, 143.3, 144.9, 149.7, 166.4, 169.7, 194.0. Anal. (C₂₀H₁₇NO₅S₂) C, H, N.

Metodo generale di sintesi degli acidi (5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)acetici (52-54)

Una miscela di 2,4-tiazolidindione (1.76 g, 15 mmol) con l'aldeide appropriata (10 mmol) e piperidina (1.02 g, 12 mmol) in etanolo è stata posta a riflusso per 24 ore. La miscela di reazione è stata versata in acqua acidificata con AcOH (pH 3-4) per ottenere un solido, il quale è stato ricristallizzato da metanolo per ottenere i corrispondenti 5-ariliden-2,4-tiazolidindioni puri.

Una miscela di 5-ariliden-2,4-tiazolidindione (10 mmol), acido bromometilacetico (2.78 g, 20 mmol) e carbonato di potassio (5.53 g, 40 mmol) in acetone anidro (120 ml) è stata posta a riflusso per 24 ore. Il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta. Il residuo solido è stato sospeso in acqua, acidificato con HCl 6N (pH 3) e mescolato fino a scomparsa dell'effervescenza. Dopo filtrazione, il residuo solido è stato lavato con acqua e ricristallizzato da metanolo per ottenere i composti **52-54** puri.

Acido {5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}acetico (52)

Resa 47%; p.f. 176-178 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.05 (t J=6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.28 (t J=6.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.36 (s, 2H, NCH₂), 7.13 (m, 2H, arom), 7.15-7.32 (m, 5H, arom), 7.61 (m,

2H, arom), 7.93 (s, 1H, CH metilidene). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 35.0, 42.6, 68.7, 115.9, 117.8, 125.8, 126.9, 128.8, 129.4, 132.8, 134.3, 138.7, 160.9, 165.5, 167.6, 168.6.

Acido {5-[(4-benzilossi-3-metossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}acetico (53)

Resa 74%; p.f. 243-246 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (s, 2H, NCH₂), 5.16 (s, 2H, OCH₂), 7.21-7.46 (m, 6H, arom), 7.92 (s, 1H, CH metilidene). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 42.8, 55.9, 70.5, 113.8, 114.0, 118.5, 124.4, 126.0, 128.1, 128.5, 128.9, 134.7, 136.9, 149.6, 150.7, 165.6, 167.5, 168.5.

Acido {5-[3-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}acetico (54)

Resa 34%; p.f. 160 °C (dec.); ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.04 (t J=6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.15 (s, 2H, NCH₂), 4.23 (t J=6.0 Hz, 2H, OCH₂), 7.06 (m, 1H, arom), 7.19-7.34 (m, 7H, arom), 7.43 (m, 1H, arom), 7.90 (s, 1H, CH metilidene). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 35.3, 44.2, 68.9, 116.4, 117.6, 122.0, 122.3, 126.8, 129.0, 129.6, 130.9, 133.7, 134.8, 138.8, 159.3, 165.7, 167.3, 168.1.

Sintesi dell'acido {5-[(4-benzilossi-3-metossi)benziliden]-2-fenilimino-4-ossotiazolidin-3-il}acetico (55)

Una miscela di acido (4-osso-2-feniliminotiazolidin-3-il) acetico (0.38 g, 1.5 mmol), il quale è stato sintetizzato in accordo ad una procedura precedentemente riportata [Ottanà 2011], con 4-benzilossi-3-metossibenzaldeide (0.24 g, 1.0 mmol) e piperidina (0.21 g, 2.4 mmol) in etanolo (20 ml) è stata posta a riflusso per 26 ore. La miscela di reazione è stata versata in acqua acidificata con AcOH graciale (pH 3-4) e filtrata. Il grezzo solido è stato ricristallizzato da metanolo per dare il prodotto **55** puro.

Resa 19%; olio giallo; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.56 (s, 2H, NCH₂), 5.09 (s, 2H, OCH₂), 6.95-7.02 (m, 3H, arom), 7.12-7.22 (m, 3H, arom), 7.30-7.41 (m, 7H, arom), 7.74 (s, 1H, CH metilidene). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 44.5, 56.0, 69.9, 111.3, 114.5, 116.0, 122.1, 122.6, 127.5, 127.6, 128.3, 129.1, 130.3, 136.9, 145.7, 149.3, 150.0, 160.7, 166.8, 169.3. Anal. (C₂₆H₂₂N₂O₅S) C, H, N.

Metodo generale di sintesi degli acidi 3-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)propanoici (56a-f)

Una miscela di 2,4-tiazolidindione (8.53 mmol) con l'opportuna aldeide (8.53 mmol) e piperidina (6.82 mmol) in etanolo (60 ml), è stata lasciata a riflusso per 24 ore. La miscela di reazione è stata versata in acqua acidulata con AcOH glaciale (pH=3), ottenendo un pp giallino che, dopo riposo per circa un'ora, è stato filtrato e lasciato ad asciugare.

Una miscela del 5-ariliden-2,4-tiazolidinione ottenuto (1.68 mmol) con acido 3-cloropropanoico (3.36 mmol) e potassio carbonato (6.72 mmol) in acetone (40 ml) è stata posta a riflusso per 24 ore. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo è stato solubilizzato in acqua; la soluzione acquosa è stata acidificata con HCl diluito fino a pH 3, ottenendo un pp bianco-avorio che è stato filtrato e lavato con acqua fino a pH neutro. Il solido è stato cristallizzato in metanolo per dare i composti **56** puri.

Acido 3-[5-(3-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]propanoico (56a)

Resa 66 %; p.f. 177-180 °C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 2.58 (t J= 7.2 Hz 2H, CH_2COOH); 3.84 (t J= 7.2 Hz 2H, NCH_2); 7.07-7.15 (m, 3H, arom); 7.19-7.24 (m, 2H, arom); 7.36-7.48 (m, 3H, arom); 7.54 (m, 1H, arom); 7.90 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-[5-(4-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]propanoico (56b)

Resa 60 %; p.f. 198-204 °C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 2.60 (t, J= 4.5, 2H, CH_2COOH); 3.86 (t J=4.5, 2H, NCH_2); 7.11 (m, 4H, arom); 7.23 (m, 1H, arom); 7.45 (m, 2H, arom); 7.64 (m, 2H, arom); 7.89 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-[5-(3-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]propanoico (56c)

Resa 25 %; p.f. 142-145 °C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 2.60 (t J= 4.2 Hz, 2H, CH_2COOH); 3.85 (t J= 4.2 Hz, 2H, NCH_2); 5.17 (s, 2H, OCH_2); 7.14-7.22 (m, 2H, arom); 7.23 (s, 1H, arom); 7.34 (m, 1H, arom); 7.40 (m, 2H, arom); 7.45-7.47 (m, 3H, arom); 7.88 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-[5-(4-benzilossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]propanoico (56d)

Resa 61 %; p.f. 195-200 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.59 (t J=7.2 Hz, 2H, CH_2COOH); 3.85 (t J= 7.2 Hz, 2H, NCH_2); 5.19 (s, 2H, OCH_2); 7.19 (m, 2H, arom); 7.34-7.48 (m, 5H, arom); 7.60 (m, 2H, arom); 7.88 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-{5-[3-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}propanoico (56e)

Resa 97 %; p.f. 130-133 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.59 (t J= 7.2 Hz, 2H, CH_2COOH); 3.05 (t J= 6.6 Hz, 2H, CH_2Ph); 3.85 (t J= 7.2 Hz, 2H, OCH_2); 4.24 (t J= 6.9 Hz, 2H, NCH_2); 7.10 (m, 2H, arom); 7.18-7.25 (m, 1H, arom); 7.28-7.32 (m, 4H, arom); 7.57 (m, 2H, arom); 7.86 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-{5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}propanoico (56f)

Resa 98 %; p.f. 160-164 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 2.58 (t J= 7.2 Hz, 2H, CH_2COOH); 3.05 (t J= 6.9, 2H, CH_2Ph); 3.84 (t J=7.2 Hz, 2H, NCH_2); 4.24-4.28 (t J= 6.9 2H, OCH_2); 7.08-7.11 (d, 2H, arom); 7.20-7.31 (m, 5H, arom); 7.54-7.57 (d, 2H, arom); 7.85 (s, 1H, CH metilidene); ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$) C, H, N.

Metodo generale di sintesi degli acidi 3-(5-arilidene-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)propanoici (57a-f)

A una soluzione di β -alanina (1 g, 12.48 mmol) e NaOH (0.5 g, 12.48 mmol) in H_2O (40 ml) è stato aggiunto CS_2 (2.16 ml, 37.44 mmol) goccia a goccia e la miscela è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte. Una soluzione di bromoacetato, ottenuta solubilizzando acido bromoacetico (1.73 g, 12.48 mmol) e NaOH (0.5 g, 12.48 mmol) in H_2O (47.2 ml), è stata aggiunta alla miscela che è stata mantenuta sotto agitazione per 24 ore. La miscela è stata acidificata con HCl fino a pH 1 ed è stata posta a riflusso per ulteriori 24 ore.

La miscela è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita con acqua, portando alla formazione di un precipitato giallino. La miscela è stata successivamente acidificata con HCl fino a pH 1 e il precipitato è stato separato per filtrazione. La soluzione filtrata è stata estratta con acetato di etile; la fase organica è stata lavata prima con acqua acidulata e poi con acqua distillata fino a raggiungere la neutralità. La fase organica è

stata infine disidratata con Na₂SO₄ anidro e il solvente è stato evaporato a pressione ridotta, fornendo l'acido 3-[(4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)]propanoico (**59**).

Resa 35%; p.f. 159-162 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.58 (t J=6 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.00 (s, 2H, 5-CH₂) 4.31 (t J=6 Hz, 2H, NCH₂).

Una miscela di acido 3-[(4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il)] propanoico (**59**) (0.25 g, 1.21 mmol) CH₃COOH (10 ml), CH₃COONa (1.23 g, 9.07mmol) e l'opportuna aldeide (1.21 mmol) è stata mantenuta a riflusso per circa 3 ore. Successivamente la miscela è stata versata in acqua, portando all'immediata formazione di un precipitato che è stato filtrato e lavato con acqua fino a pH neutro. Il solido è stato purificato per cristallizzazione da metanolo, per dare i composti **57** puri.

*Acido 3-[5-(3-fenossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]propanoico (**57a**)*

Resa 46%; p.f. 174-175 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.58 (t J=7.8 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.17 (t J= 7.8 Hz, 2H, NCH₂), 7.03-7.8 (m, 2H, arom), 7.10-7.14 (m, 1H, arom), 7.15-7.22 (m, 2H, arom); 7.35 (m, 1H, arom); 7.42 (m, 2H,arom); 7.52 (m, 1H, arom); 7.75 (s, 1H, CH metilidene).

*Acido 3-[5-(4-fenossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]propanoico (**57b**)*

Resa 46%; p.f. 218-219 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.62 (t J=7.5 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.22 (t J= 7.5Hz, 2H, NCH₂), 7.10-7.15 (m, 3H, arom), 7.22-7.28 (m, 2H, arom), 7.44-7.49 (m, 2H, arom), 7.67 (m, 2H, arom), 7.80 (s, 1H, CH metilidene).

*Acido 3-[5-(3-benzilossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]propanoico (**57c**)*

Resa 49%; p.f. 207-209 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.62 (t J=7,5 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.21 (t J= 7,5 Hz, 2H, NCH₂), 5.17 (s, 2H, OCH₂), 7.15-7.24 (m, 3H, arom), 7.31-7.50 (m, 6H, arom), 7.76 (s, 1H, CH metilidene).

*Acido 3-[5-(4-benzilossibenziliden)-4-osso-2-tiossotiazolidin-3-il]propanoico (**57d**)*

Resa 49%; p.f. 170-173 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.60 (t J=7,5 Hz, 2H, CH₂COOH), 4.21 (t J= 7,5Hz, 2H, NCH₂), 5.20 (s, 2H, OCH₂), 7.20 (m, 2H, arom), 7.32-7.48 (m, 5H, arom), 7.62 (m, 2H, arom), 7.78 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-{5-[3-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}propanoico (57e)

Resa 26%; p.f. 136-138 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.63 (t J=7,5 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.06 (t J= 6.9Hz, 2H, CH₂Ph), 4.19-4.27 (m, 4H, NCH₂ e OCH₂); 7.09 (m, 1H, arom), 7.16-7.36 (m, 7H, arom), 7.45 (m, 1H, arom); 7.78 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 3-{5-[4-(2-feniletossi)benziliden]-2,4-diossotiazolidin-3-il}propanoico (57f)

Resa 24%; p.f. 171-174 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.62 (t J=7,8 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.05 (t J= 6,9 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.21 (t J= 7,8 Hz, 2H, NCH₂); 4.29 (t J= 6,9 2H, OCH₂), 7.12 (m, 2H, arom), 7.31-7.33 (m, 5H, arom); 7.60 (m, 2H, arom), 7.77 (s, 1H, CH metilidene).

Metodo generale di sintesi degli acidi 4-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)but-2-enoici (58a-e)

Una miscela del 2,4-tiazolidindione (2.4 g, 20 mmol) con l'aldeide opportunamente sostituita (20 mmol) e piperidina (1,4 g, 16 mmol) in etanolo (150 ml) è stata posta a riflusso per 24 h. Il grezzo di reazione è stato versato in H₂O acidificata con AcOH per ottenere i 5-ariliden-2,4-tiazolidindioni, sotto forma di solidi, che sono stati ricristallizzati da metanolo.

Una miscela del corrispondente 5-ariliden-2,4-tiazolidindione (10 mmol) con metil 4-bromocrotonato (3.58 g, 20 mmol) e potassio carbonato (2.76 g, 20 mmol) in acetone (130 ml) è stata posta a riflusso per 24 h. Dopo raffreddamento della soluzione, il grezzo di reazione è stato filtrato ed il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta. Il residuo solido è stato ricristallizzato da etanolo fornendo i metil esteri degli acidi 4-(5-ariliden-2,4-diossotiazolidin-3-il)-2-butenici.

Una miscela del corrispondente metil estere (10 mmol), acido acetico glaciale (40 ml) e HCl 12 N (10 ml) è stata posta a riflusso per 2 h. Dopo evaporazione sotto vuoto del solvente, il grezzo di reazione è stato lavato con H₂O e ricristallizzato da metanolo, per dare gli acidi **58** puri.

Acido 4-[5-(3-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]but-2-enonico (58a)

Resa 92 %; p.f. 155-157 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 4.40 (dd J = 5.1 e 2.0 Hz, 2H, CH₂); 5.81 (dt J = 15.6 e 2.0 Hz, 1H, CH); 6.75 (dt J = 15.6 e 5.1 Hz, 1H, CH); 7.05-7.21 (m, 3H, arom); 7.35-7.44 (m, 4H, arom); 7.50-7.55 (m, 2H, arom); 7.90 (s, 1H, CH metilidene);

¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 41.8 (CH₂); 118.9, 119.2, 120.3, 124.1, 124.8, 130.2, 140.4 (CH arom); 122.3 (5-C); 123.0, 132.4 (CH=CH); 131.0 (CH metilidene); 134.8, 155.7, 157.6 (Cq arom); 165.0, 166.3, 166.7 (C=O).

Acido 4-[5-(4-fenossibenziliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]but-2-enonico (58b)

Resa 50%; p.f. 190–192 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.52 (dd J = 5.1 e 2.0 Hz, 2H, CH₂); 5.94 (dt J = 15.9 e 2.0 Hz, 1H, CH); 6.98 (dt J = 15.9 e 5.1 Hz, 1H, CH); 7.00–7.05 (m, 3H, arom); 7.15 (m, 2H, arom); 7.29–7.33 (m, 4H, arom); 7.90 (s, 1H, CH metilidene); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 41.3 (CH₂); 117.8, 119.6, 124.2, 129.6, 133.4 (CH arom); 118.5 (5-C); 124.0, 131.8 (CH=CH); 138.5 (CH metilidene); 126.9, 154.8, 159.5 (Cq arom); 165.0, 165.1, 166.6 (C=O).

Acido 4-[5-(bifenil-4-ilmetiliden)-2,4-diossotiazolidin-3-il]but-2-enonico (58c)

Resa 45%; p.f. 248–250 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 4.45 (dd J = 6.0 e 2.0 Hz, 2H, CH₂); 5.85 (dt J = 15.0 e 2.0 Hz, 1H, CH); 6.80 (dt J = 15.0 e 6.0 Hz, 1H, CH); 7.46–7.56 (m, 5H, arom); 7.76 (m, 2H, arom); 7.88 (m, 2H, arom); 8.01 (s, 1H, CH metilidene); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 41.9 (CH₂); 121.0 (5-C); 126.8, 127.5, 128.3, 129.1, 132.7 (CH arom); 123.0, 130.9 (CH=CH); 140.7 (CH metilidene); 132.0, 138.7, 142.0 (Cq arom); 165.2, 166.4, 167.0 (C=O).

Acido 4-[5-(naftalen-1-ilmetilen)-2,4-diossotiazolidin-3-il]but-2-enoico (58d)

Resa 50%; p.f. 162–168 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 4.46 (dd J = 3.0 Hz e 0.9 Hz, 2H, CH₂); 5.89 (dd J=9.6 Hz e 0.9 Hz, 1H, CH); 6.82 (dt J = 9.6 e 3.0 Hz, 1H, CH); 7.59–7.72 (m, 4H, arom); 8.03–8.14 (m, 3H, arom); 8.56 (s, 1H, CH metilidene).

Acido 4-[5-(naftalen-2-ilmetilen)-2,4-diossotiazolidin-3-il]but-2-enoico (58e)

Resa 70%; p.f. 180–184 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 4.46 (dd J = 9.3 e 1.2 Hz, 2H, CH₂); 5.97 (dt J = 9.3 e 1.2 Hz, 1H, CH); 6.89 (dt J = 9.3 e 3.0 Hz, 1H, CH); 7.59–7.65 (m, 2H, arom); 7.71 (m, 1H, arom); 7.98 (m, 1H, arom); 8.05–8.08 (m, 3H, arom); 8.22 (s, 1H, CH metilidene).

Studi di docking

a) *PTP1B*

Come modello per la PTP1B umana sono state selezionate le voci 1T4J, 1Q6T e 2VEV dal Protein Data Bank (PDB). Le strutture proteiche sono state preparate per il docking usando il pacchetto software MOE [Molecular Operating Environment (MOE). 2015, Chemical Computing Group ULC: 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada]. Per il docking CCDs il software GOLD versione 5.2 è stato usato con dei parametri predefiniti (GOLDScore, efficienza di ricerca al 100%) [Jones 1997]. Il docking è stato eseguito senza nessun tipo di costrizione. Per il docking dei composti **5** nel sito attivo è stata usata la struttura 2VEV. Il sito attivo è stato determinato selezionando tutti i residui nei range di 12 Å dal ligando co-cristallizzato. Per il docking all'interno del sito allosterico noto [Wiesmann 2004], è stata usata la struttura 1T4J. Per il docking dei composti **5** e **6** sull'intera superficie è stata selezionata la struttura PDB dal codice 1Q6T. Le pose di docking sono state ottenute in base alle soluzioni di un clustering RMDS dello scaffold comune del ligando. Le immagini 3D sono state generate con MOE. Le interazioni proteina-ligando sono state analizzate con LigandScout [Wolber 2005, 2006].

Il docking dei composti **12** è stato condotto all'interno della struttura cristallina della PTP1B 2VEV. Il docking è stato eseguito con il software GOLD versione 5.2 conducendo il legame sull'intera superficie proteica. Le strutture della proteina e del ligando sono state prima preparate per il docking usando MOE 2015.10. Per ogni ligando sono state generate 25 pose che sono state analizzate con MOE dopo aver minimizzato l'energia del ligando nella rispettiva posa insieme con i circostanti residui proteici usando il campo di forza Amber 12:EHT. Le rappresentazioni 3D sono state generate con MOE. Per le indagini di docking relative ai composti **39-55**, è stata scelta e preparata la struttura cristallina della PTP1B 1Q6T ed è stato effettuato il docking proteina-ligando sull'intera superficie dell'enzima come descritto sopra per i composti **5, 6**.

b) ALR2

La struttura cristallina 3V36, che contiene nella cavità catalitica la gliceraldeide co-cristallizzata, è stata scelta per costruire il complesso enzima-substrato. Il ligando è stato modificato manualmente a idosio usando MOE. L'energia dell'idosio è stata poi minimizzata dentro la cavità catalitica con il campo di forza MMFF94x. Il docking è stato effettuato all'interno della struttura proteica contenente NADPH e idosio. Come intorno di legame è stato scelto il volume dal raggio di 12 Å attorno al C terminale dell'idosio per forzare le pose vicino al substrato.

PARTE SPERIMENTALE FARMACOLOGICA**a) PTP1B***Valutazione dell'attività inibente la PTP1B*

La PTP1B umana è stata ottenuta per espressione in *E. coli* come proteina di fusione con la glutatione S-transferasi (GST). La proteina di fusione, dopo purificazione su colonna cromatografica, è stata trattata con trombina bovina e l'enzima libero rilasciato è stato purificato e separato dal GST e dalla trombina tramite cromatografia per esclusione su Superdex G75. La purezza delle preparazioni enzimatiche è stata controllata per mezzo delle bande di rivelazione SDS-PAGE con Comasse Brilliant Blue. L'attività della PTP1B è stata misurata a 37°C usando il *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP), solubilizzato in sodio β,β -dimetilglutarato 0.075M, come substrato, a pH = 7.0. Ciascun saggio (1 ml di volume finale) è stato avviato per mezzo dell'aggiunta di aliquote della preparazione di enzima e, dopo un periodo di tempo adeguato, è stato bloccato per mezzo dell'aggiunta di 4 ml di una soluzione di KOH 0.1M. Lo ione *p*-nitrofenato, proveniente dall'idrolisi del *p*NPP, è stato determinato misurando l'assorbanza a 405 nm. I principali parametri cinetici (K_m e V_{max}) sono stati determinati misurando le velocità di idrolisi iniziali a differenti concentrazioni del substrato. I dati sperimentali sono stati analizzati usando l'equazione di Michaelis e il programma di non-linear

fitting Fig. P, Biosoft. Le costanti di inibizione K_i sono state determinate misurando le velocità di idrolisi iniziali a differenti concentrazioni del substrato e dell'inibitore. I valori di K_m apparenti misurati alle varie concentrazioni di inibitore sono state graficamente messe in relazione alle concentrazioni di inibitore per calcolare i valori di K_i . Tutte le misure cinetiche sono state eseguite almeno in triplicato. I valori di IC_{50} (concentrazione del composto necessaria per determinare un'inibizione del 50% dell'attività enzimatica) sono stati determinati come segue: la velocità iniziale di idrolisi, impiegando concentrazioni fisse di *p*NPP (uguali ai corrispondenti valori di K_m) e varie concentrazioni del composto in esame, è stata misurata seguendo di continuo la produzione di *p*-nitrofenato come descritto sopra. I valori di IC_{50} sono stati calcolati mettendo in relazione graficamente l'attività della PTP nei confronti del substrato *p*NPP e la concentrazione dell'inibitore e applicando la seguente equazione tramite il programma Fig.P: $V_i/V_o = IC_{50} / (IC_{50} + [I])$, dove V_i è la velocità di idrolisi quando la concentrazione dell'inibitore è $[I]$, V_o è la velocità di idrolisi senza inibitore e $IC_{50} = K_i + K_m$.

Valutazione dell'attività insulinomimetica

Le proprietà insulinomimetiche dei composti sono state valutate usando cellule murine C2C12. I mioblasti sono stati seminati su dischi p35 e cresciuti in terreno contenente il 10% di siero bovino fetale fino a raggiungere una confluenza di circa il 70%. Una volta raggiunta questa densità, le cellule sono state incubate per sei giorni in presenza di un mezzo contenente siero di cavallo al 2% per indurre la differenziazione dei mioblasti in miotubi. Ogni due giorni, il mezzo è stato sostituito con un mezzo fresco. Il controllo negativo è stato ottenuto incubando il campione con DMSO, il solvente usato per diluire ciascun inibitore; il controllo positivo è stato ottenuto stimolando le cellule con insulina 10 nM. Quando i composti sono stati incubati insieme alle cellule, la concentrazione finale di ciascun inibitore nel test è stata di 50 μ M. Tutti i campioni sono stati incubati a 37 ° C per 30 minuti prima della lisi. Gli estratti di proteine sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e quindi le proteine sono state trasferite su membrana PVDF per western blot. La rilevazione delle forme attivate del recettore

dell'insulina e della chinasi Akt è stata effettuata utilizzando anticorpi specifici (anticorpo anti-p-insulina R β (Tyr 1162/1163) e anticorpo Phospho-Akt (Ser473)).

Uptake del glucosio

I miotubi differenziati di C2C12 sono rimasti in starvation per 24 ore e successivamente sono stati analizzati per la loro capacità di assumere il [3 H] 2-desossiglucosio. Le cellule sono state stimulate con insulina 10 nM o con il composto in esame (concentrazione finale 50 μ M) per 30 minuti e quindi incubate per 15 minuti in presenza di 0,5 mCi / ml di [3 H] 2-desossiglucosio (PerkinElmer, Boston, MA). Dopo 15 minuti, i dischi sono stati lavati due volte con PBS freddo e le cellule sono state lisate usando una soluzione di NaOH 0.2 M. Aliquote di estratti cellulari sono stati prelevati e analizzati usando un contatore di scintillazione Tri-Carb 5110TR (Perkin-Elmer) per determinare il glucosio radiomarcato incorporato nelle cellule. La captazione non specifica è stata misurata incubando le cellule con un ugual volume di DMSO, il solvente utilizzato per diluire il composto. I dati ottenuti sono stati normalizzati contro la concentrazione di proteina. Tutte le determinazioni sono state effettuate in triplice copia. I dati sono stati normalizzati rispetto all'esperimento di controllo. * p < 0,05

b) ALR2

Valutazione dell'attività inibente l'ALR2

L'espressione e la purificazione dell'ALR2 umana ricombinante sono state eseguite come descritto in precedenza. L'enzima purificato (attività specifica 5.0 U / mg) è stato conservato a -80 ° C in tampone fosfato di sodio 10 mM pH 7.0 contenente 2 mM di ditiotreitolo e 30% (p / v) di glicerolo. L'enzima è stato dializzato contro il tampone fosfato di sodio 10 mM pH 7.0 prima dell'uso. L'attività enzimatica è stata misurata spettrofotometricamente a 37 ° C come descritto in precedenza [Balestri 2015]. Una unità di attività enzimatica si riferisce alla quantità di enzima che catalizza l'ossidazione di 1 μ mol / min di NADPH utilizzando D,L-gliceraldeide 4.7 mM come substrato.

Per la determinazione del valore di IC₅₀, la miscela in esame (volume finale 0,7 mL) conteneva, in 0,25 M tampone fosfato di sodio pH 6,8, 2 mM L-idoso, 0,11 mM NADPH, solfato di ammonio 0,38 M e EDTA 0,5 mM. I composti in esame sono stati

solubilizzati in DMSO e aggiunti alla miscela sopra descritta contenente 8 mU di AR purificata. La reazione è stata avviata con l'aggiunta del substrato. La concentrazione di DMSO in tutti i test è stata mantenuta costante allo 0,5% (v / v). I valori IC₅₀ sono stati determinati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando Prism GraphPad 6.0 adattando i dati sperimentali alla seguente equazione:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{[I]}{IC50}\right)^{slope}} + Min$$

Nell'equazione v_i / v_0 , rappresenta il rapporto tra l'attività misurata in presenza dell'inibitore e l'attività misurata in assenza di inibitore; Max e Min rappresentano il valore massimo e minimo previsto dell'attività e sono stati fissati rispettivamente a 1 e a zero. La pendenza (slope), che descrive la pendenza della curva nella regione di transizione, è stata fissata a -1. Per ogni composto, sono state analizzate almeno cinque diverse concentrazioni.

c) Attività anti-infiammatoria

Valutazione della vitalità cellulare

L'effetto dei composti **5** e **6** sulla vitalità cellulare è stato valutato con un test basato sulla scissione del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) da parte di deidrogenasi mitocondriali in cellule metabolicamente attive [Graziano 2012]. La densità ottica a $\lambda = 550$ nm è stata misurata utilizzando un lettore di micropiastre e i risultati sono stati riportati come percentuale rispetto ai controlli non trattati o ai cheratinociti umani stimolati con istamina e IFN- γ .

Valutazione dell'attività anti-infiammatoria

L'analisi Western blot è stata eseguita come già descritto [Graziano 2016]. In breve, un'uguale quantità di proteine è stata fatta bollire nel tampone LDS (Invitrogen, Milano, Italia) in presenza di agente riducente 1X (Invitrogen). Ogni campione è stato quindi sottoposto ad elettroforesi su gel Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen). Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite alla membrana di nitrocellulosa, in un

sistema umido, e il trasferimento delle proteine è stato verificato mediante colorazione delle membrane con Ponceau S. Le membrane sono state fissate con soluzione salina tamponata Tris contenente lo 0,01% di Tween-20 (TBST) e il 5% di latte in polvere non grasso per 1 ora e poi analizzate per una notte a 4 ° C con i seguenti anticorpi primari: anti-ICAM-1 monoclonale di topo (1H4: sc-51632), anti-iNOS monoclonale di coniglio (N-20: sc-651), anti-COX2 policlonale di capra (C-20: sc-1745) e α -tubulina monoclonale di topo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), diluiti in TBST a 1: 200, 1: 300, 1: 200 e 1: 5000, rispettivamente. Le membrane sono state risciacquate tre volte in TBST e l'appropriato anticorpo secondario coniugato con HRP è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente (sc-2030, capra anti-coniglio, 1: 20000; sc-2005, capra anti-topo, 1: 5000; sc -2020, asino anti-capra, 1: 5000, Santa Cruz Biotechnology). Le macchie sono state sviluppate usando una soluzione chemiluminescente potenziata (Millipore) e visualizzate con un sistema di imaging a blotting western chemiluminescente (Alliance, UVITEC). Le bande sono state misurate densitometricamente e la loro densità relativa è stata calcolata in base alla densità dei segnali di α -tubulina in ciascun campione. I valori sono stati espressi come unità densitometriche arbitrarie (A.D.U.).

Riferimenti bibliografici

- Alexiou P., Pegklidou K.; Chatzopoulou M., Nicolaou I., Demopoulos V.J.; Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 734-752.
- Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T.; Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **2004**, 117, 699-711.
- Andersen H.S., Iversen L.F., Jeppesen C.B., Branner S., Norris K., Rasmussen H.B., Møller K.B., Møller N.P.; 2-(Oxalylamino)-benzoic acid is a general, competitive inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 7101-7108.
- Apostolatos A., Song S., Acosta S., Peart M., Watson J.E., Bickford P., Cooper D.R., Patel N.A.; Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase C δ 11 isoform. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 9299-9310.
- Balestri F., Cappiello M., Moschini R., Rotondo R., Buggiani I., Pelosi P., Mura U., Del Corso A.; L-Idose: an attractive substrate alternative to D-glucose for measuring aldose reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 456, 891-895.
- Bansal Y., Silakari O.; Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 31-42.
- Barford D., Flint A. J., Tonks N. K.; Crystal structure of human protein tyrosine. *Sciences* **1994**, 5152, 1397-1404.
- Bence K.K., Delibegovic M., Xue B., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S., Neel B.G., Kahn B.B.; Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* **2006**, 12, 917-924.
- Bentires-Alj M., Neel B.G.; Protein tyrosine phosphatase 1B is required for her2/neu-induced breast cancer. *Cancer Res.* **2007**, 67, 2420-2424.
- Biadene M., Hazemann I., Cousido A., Ginell S., Joachimiak A., Sheldrick G. M., Podjarny A., Schneider T. R.; The atomic resolution structure of human aldose reductase reveals that rearrangement of a bound ligand allows the opening of the safety-belt loop. *Acta Cryst.* **2007**, D63, 665-672.

-
- Bialy L., Waldmann H.; Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs?. *Angew. Chem. Int.* **2005**, *44*, 3814-3839.
 - Blaskovich M.A.T.; Drug discovery and protein tyrosine phosphatases. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2095-2176.
 - Bosco D., Fava A., Plastino M., Montalcini T., Pujia A.; Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1807-1821.
 - Bril V., Hirose T., Tamioka S., Buchanan R.; Ranirestat for the management of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1256-1260.
 - Brownlee M.; Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, *414*, 813-820.
 - Brownlee M.; The pathobiology of diabetic complications. a unifying mechanism. *Diabetes* **2005**, *54*, 1615-1625.
 - Bruno G., Costantino L., Curinga C., Maccari R., Monforte F., Nicolo F., Ottana R., Vigorita M.G.; Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1077-1084.
 - Cappiello M., Vilaro P.G., Micheli V., Jacomelli G., Banditelli S., Leverenz V., Giblin F.J., Del Corso A., Mura U.; Thiol disulfide exchange modulates the activity of aldose reductase in intact bovine lens as a response to oxidative stress. *Exp. Eye Res.* **2000**, *70*, 795-803.
 - Castro J.P., Jung T., Grune T., Siems W.; 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 309-315.
 - Chang K.C., Laffin B., Ponder J., Énzöly A., Németh J., LaBarbera D.V., Petrash J. M.; Beta-glucogallin reduces the expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory markers by inhibition of aldose reductase in murine macrophages and ocular tissues. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *202*, 283-287.
 - Cheng A., Uetani N., Simoncic P.D., Chaubey V.P., Lee-Loy A., McGlade C.J., Kennedy B.P., Tremblay M.L.; Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell* **2002**, *2*, 497-503.

-
- Cirri P., Chiarugi P., Camici G., Manao G., Raugei G., Cappugi G., Ramponi G.; The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-Mr cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 647-657.
 - Combs A.P.; Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity and cancer. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2333-2344.
 - Correia M.L.G., Haynes W.G.; Lessons from leptin's molecular biology: potential therapeutic actions of recombinant leptin and leptin-related compounds. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7 31-38.
 - Costantino L., Rastelli G., Vianello P., Cignarella G., Barlocco D.; Diabetes complications and their potential prevention: aldose reductase inhibition and other approaches. *Med. Res. Rev.* **1999**, 19, 3-23.
 - Costantino L., Barlocco D.; Designing approaches to multitarget drugs, in: H. Handler, H. Buschmann (Eds.), Drug selectivity: an evolving concept in medicinal chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, **2017**, pp. 161-205.
 - Csermely P., Agoston V., Pongor S.; The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 178-182.
 - De la Monte S.M.; Insulin resistance and Alzheimer's disease, *BMB Rep.* **2009**, 42, 475-481.
 - Del Corso A., Cappiello M., Mura U.; From A dull enzyme to something else: facts and perspectives regarding aldose reductase. *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 1452-1461.
 - Delibegovic M., Bence K., Mody N., Hong E.-G., Ko H. J., Kim J. K., Kahn B. B., Neel B. G.; Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. *Mol. and Cell. Bio.* **2007**, 27, 7727-7734.
 - Delibegovic M., Zimmer D., Kauffman C., Rak K., Hong E., Cho Y., Kim J. K., Kahn B. B., Neel B. G., Bence K. K.; Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **2009**, 58, 590-599.
 - Digenio A., Pham N.C., Watts L.M., Morgan E.S., Jung S.W., Baker B.F., Geary R.S., Bhanot S.; Antisense inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B with IONIS-PTP-

1BRx improves insulin sensitivity and reduces weight in overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2018**, 41, 807-814.

- Di Paola R., Frittitta L., Miscio G., Bozzali M., Baratta R., Centra M., Spampinato D., Santagati M.G., T. Ercolino, Cisternino C., Soccio T., Mastroianno S., Tassi V., Almgren P., Pizzuti A., Vigneri R., Trischitta V.; A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am. J. Hum. Genet.*, **2002**, 70, 806-812.
- Dodd G.T., Williams S.R., Luckman S.M., Functional magnetic resonance imaging and c-Fos mapping in rats following a glucoprivic dose of 2- deoxy- D- glucose. *J. Neurochem.* **2010**, 113, 1123-1132.
- Dodd G.T., Tiganis T.; Insulin action in the brain: roles in energy and glucose homeostasis. *J. Neuroendocrinol.*, **2017**, 29 e, 12513.
- Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E., Cromlish W., Collins S., Lee Loy A., Normandin D., Cheng A., Himms-Hagen J., Chi-Chung Chan, Ramachandran C., Gresser M. J., Tremblay M. L., Kennedy B. P.; Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **1999**, 283, 1544-1548.
- El-Kabbani O., Darmanin C., Schneider T.R., Hazemann I., Ruiz F., Oka M., Joachimiak A., Schulze-Briese C., Tomizaki T., Mitschler A., Podjarny A.; Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with fidarestat and minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *Proteins*, **2004**, 55, 805– 813.
- Emilsson V., Liu Y.L., Cawthorne M.A., Morton N.M.; Davenport M., Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* **1997**, 46, 313-316.
- Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M.; Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **2002**, 23, 599-622.
- Frohnert B.I., Long E.K., Hahn W.S., Bernlohr D.A.; Glutathionylated lipid aldehydes are products of adipocyte oxidative stress and activators of macrophage inflammation. *Diabetes*, **2014**, 63, 89-100.

-
- Fu R.G., Sun Y., Sheng W.B., Liao D.F.; Designing multi-targeted agents: an emerging anticancer drug discovery paradigm. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 195-211.
 - Gattrell W., Johnstone C., Patel S., Sambrook Smith C., Scheel A. and Schindler M.; Designed multiple ligands in metabolic disease research: from concept to platform. *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 692-696.
 - Gozal D., Khalyfa A., Qiao Z., Akbarpour M., Maccari R., Ottanà R.; Protein-tyrosine phosphatase-1B mediates sleep fragmentation-induced insulin resistance and visceral adipose tissue inflammation in mice. *Sleep* **2017**, *40*, zsx111.
 - Graziano A.C., Cardile V., Crascì L., Caggia S., Dugo P., Bonina F., Panico A.; Protective effects of an extract from Citrus bergamia against inflammatory injury in interferon- γ and histamine exposed human keratinocytes. *Life Sci.* **2012**, *90*, 968-974.
 - Graziano A.C.E., Parenti R., Avola R., Cardile V.; Krabbe disease: involvement of connexin43 in the apoptotic effects of sphingolipid psychosine on mouse oligodendrocyte precursors. *Apoptosis* **2016**, *21*, 25-35.
 - Hopkins A.; Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chem. Biol.* **2008**, *4*, 682-690.
 - Hotta N., Yasuda K., Sumita Y., Sano T., Kakuta H., Nagashima M., Hayashi Y., Yamamoto M., Wakao T., Okuyama M, Kobayashi M., Mori K.; Effects of a novel aldose reductase inhibitor, Fidarestat (SNK-860), on vibration perception threshold and subjective symptoms in patients with diabetic polyneuropathy. *Clin. Drug Invest.* **2004**, *24*, 671-680.
 - Hotta N., Kawamori R., Atsumi Y., Baba M., Kishikawa H., Nakamura J., Oikawa S., Yamada N., Yasuda H., Shigeta Y.; Stratified analyses for selecting appropriate target patients with diabetic peripheral neuropathy for long-term treatment with an aldose reductase inhibitor. Epalrestat. *Diabet. Med.* **2008**, *25*, 818-825.
 - Hunter T., Tyosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2009**, *21*, 140-146.
 - Ito Y., Banno R., Hagimoto S., Ozawa Y., Arima H., Oiso Y., TNF α increases hypothalamic PTP1B activity via the NF κ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. *Regulatory Peptides* **2012**, *174*, 58-64.

-
- Ito Y., Fukui M., Kanda M., Morishita K., Shoji Y., Kitao T., Hinoi E., Shirahase H.; Therapeutic effects of the allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor KY-226 on experimental diabetes and obesity via enhancements in insulin and leptin signaling in mice. *Journal of Pharmacological Sciences. J. Pharm Sci*, **2018**, 137, 38-46.
 - Jeon Y., Lee S., Kim S., Kwon Y., Kim K., Chung C.G., Lee S., Lee S. B., Kim H.; Neuroprotective effects of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition against ER stress-induced toxicity. *Mol. Cells*, **2017**, 40, 280-290.
 - Johnson T.O. et al.; Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 696-709.
 - Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R.; Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.
 - Julien S.G., Dubè N., Read M., Penney J., Paquet M., Han Y., Kennedy B.P., Muller W.J., Tremblay M.L.; Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protect from lung metastasis. *Nature Gen.*, **2007**, 39, 338-346.
 - Kawamura I., Lacey E., Yamamoto N., Sakai F., Takeshita S., Inami M., Nishigaki F., Naoe Y., Tsujimoto, S., Manda T., Shimomura K., Goto T.; Ponalrestat, an aldose reductase inhibitor, inhibits cachexia syndrome induced by colon26 adenocarcinoma in mice. *Anticancer Res.* **1999**, 19, 4105-4111.
 - Klamon L.D., Boss O., Peroni O.D., Kim J. K., Martino J. L., Zabolotny J.M., Moghal N., Lubkin M., Kim Y.B., Sharpe A.H., Stricker-Krongrad A., Shulman G.I., Neel B.G., Kahn B.B.; Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Mol. and Cell. Bio.* **2000**, 20, 5479-5489.
 - Kolmodin K., Åqvist J.; The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Letters* **2001**, 498, 208-213.
 - Koren S., Fantus I.G.; Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract, Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, 21, 621-640.

-
- Krishnan N., Koveal D. et al. Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nature Chem. Biol.*, **2014**, 10, 558-566.
 - Krishnan N., Konidaris K.F., Gasser G., Tonks N.K.; A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 1517-1525.
 - Laffin B.; Petrash J.M.; Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Front. Pharmacol.* **2012**, 3, 104, doi: 10.3389/fphar.2012.00104.
 - Lantz K.A., Emeigh Hart S.G., Planey S.L., Roitman M.F., Ruiz-White I.A., Wolfe H.R., McLane M.P.; Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity* **2010**, 18, 1516-1523.
 - Lazo J.S, McQueeney K.E., Burnett J.C., Wipf P., Sharlow E.R.; Small molecule targeting of PTPs in cancer. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2018**, 96, 171-181-
 - Lessard L., Stuiblé M., Tremblay M.L.; The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **2010**, 1804, 613-619.
 - Li L., Chang K.C., Zhou Y., Shieh B., Ponder J., Abraham A.D., Ali H., Snow A., Petrash J.M., LaBarbera D.V.; Design of an amide N-glycoside derivative of β -glucogallin: a stable, potent, and specific inhibitor of aldose reductase. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 71-77.
 - Liljebris C., Larsen S.D., Ogg D., Palazuk B.J., Bleasdale J.E.; Investigation of potential bioisosteric replacements for the carboxyl groups of peptidomimetic inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: identification of a tetrazole-containing inhibitor with cellular activity. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1785-1798.
 - Liu G.; Technology evaluation: ISIS-113715, Isis. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2004**, 6,331-336.
 - Maccari R., Ottanà R., Curinga C., Vigorita M.G., Rakowitz D., Steindl T., Langer T.; Structure–activity relationships and molecular modelling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2809-2823.
 - a) Maccari R., Paoli P., Ottanà R., Jacomelli M., Ciurleo R., Manao G., Steindl T., Langer T., Vigorita M. G., Camici G.; 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 5137-5149.

-
- b) Maccari R., Ottanà R., Ciurleo R., Vigorita M., Rakowitz D., Steindl T., Langer T.; Evaluation of in vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 3886-3893.
 - Maccari R., Ottanà R., Ciurleo R., Rakowitz D., Matuszczak B., Laggner C., Langer T.; Synthesis, induced-fit docking investigations, and in vitro aldose reductase inhibitory activity of non-carboxylic acid containing 2,4-thiazolidinedione derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5840-5852.
 - Maccari R., Ottanà R., Ciurleo R., Paoli P., Manao G., Camici G., Laggner C., Langer T.; Structure-Based Optimization of Benzoic Acids as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 957-962.
 - Maccari R., Ciurleo R., Giglio M., Cappiello M., Moschini R., Del Corso A., Mura U., Ottanà R.; Identification of new non-carboxylic acid containing inhibitors of aldose reductase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4049-4055.
 - Maccari R., Del Corso A., Giglio M., Moschini R., Mura U., Ottanà R., In vitro evaluation of 5-arylidene-2-thioxo-4-thiazolidinones active as aldose reductase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 200-203.
 - Maccari R., Ottanà R.; Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases as emerging targets for the design of novel therapeutic agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2-22.
 - Maccari R., Vitale R.M., Ottanà R., Rocchiccioli M., Marrazzo A., Cardile V., Graziano A.C.E., Amodeo P., Mura U., Del Corso A.; Structure-activity relationships and molecular modelling of new 5-Arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 1-14.
 - Maccari R., Ottanà R.; Targeting aldose reductase for the treatment of diabetes complications and inflammatory diseases: new insights and future directions, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2047-2067.
 - Maccari R., Ettari R., Adornato I., Naß A., Wolber G., Bitto A., Mannino F., Aliquò F., Bruno G., Nicolò F., Previti S., Grasso S., Zappalà M., Ottanà, R.; Identification of 2-

thioxoimidazolidin-4-one derivatives as novel noncovalent proteasome and immunoproteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2018**, 28, 278-283.

- Marks J.L., et al.; Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* **1990**, 127, 3234-3236.
- McNay E., Ong C.T., McCrimmon R.J., Cresswell J., S.Bogan J.S., Sherwin R.S.; Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem*, **2010**, 93, 546-553.
- Medina-Franco J.L., Giulianotti M.A., Welmaker G.S., Houghten R.A.; Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2013**, 495-501.
- Meshkani R., Adeli K.; Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* **2009**, 42, 1331-1346.
- Miranda S., Gonzalez-Rodriguez A., Revuelta-Cervantes J., Rondinone C.M., Valverde A.M.; Beneficial effects of PTP1B deficiency on brown adipocyte differentiation and protection against apoptosis induced by pro- and anti-inflammatory stimuli. *Cell. Sign.* **2010**, 22, 645-659.
- Miyamoto S.; Molecular Modeling and Structure-based Drug Discovery Studies of Aldose Reductase Inhibitors. *Chem. Bio. Inform. J.* **2002**, 2, 74-85.
- MohammadTaghvaei N., Taheripak G., Taghikhani M., Meshkani R.; Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor κ B (NF- κ B) activation. *Cell. Signal.*, **2012**, 24, 1964-1970.
- Morphy R., Rankovic Z.; Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm, *J. Med.Chem.* **2005**, 48, 6523-6543.
- Nichols A.J., Mashal R.D., Balkan B.; Toward the discovery of small molecule PTP1B inhibitors for the treatment of metabolic diseases, *Drug. Dev. Res.* **2006**, 67, 559-566.
- Nieto-Vazquez I., Fernandez-Veledo S., De Alvaro C., Rondinone C.M., Valverde A.M., Lorenzo M.; Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. *Diabetes* **2007**, 56, 404-413.

-
- Ottanà R., Maccari R., Barreca M.L., Bruno G., Rotondo A., Rossi A., Chiricosta G., Di Paola R., Sautebin L., Cuzzocrea S., Vigorita M.G.; 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel antiinflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4243-4252.
 - Ottanà R., Maccari R., Ciurleo R., Paoli P., Jacomelli M., Manao G., Camici G., Laggner C., Langer T.; 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1928-1937.
 - Ottanà R., Maccari R., Giglio M., Del Corso A., Cappiello M., Mura U., Cosconati S., Marinelli L., Novellino E., Sartini S., La Motta C., Da Settimo F.; Identification of 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives endowed with dual activity as aldose reductase inhibitors and antioxidant agents for the treatment of diabetic complications, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 2797-2806.
 - Ottanà R., Maccari R., Amuso S., Wolber G., Schuster D., Herdinger S., Manao G., Camici G., Paoli P.; New 4-[(5-arylidene-2-arylimino-4-oxo-3-thiazolidinyl)methyl]benzoic acids active as protein tyrosine phosphatase inhibitors endowed with insulinomimetic effect on mouse C2C12 skeletal muscle cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 50, 332-343.
 - Ottanà R., Maccari R., Mortier J., Caselli A., Amuso S., Camici G., Rotondo A., Wolber G., Paoli P.; Synthesis, biological activity and structure–activity relationships of new benzoic acid-based protein tyrosine phosphatase inhibitors endowed with insulinomimetic effects in mouse C2C12 skeletal muscle cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 71, 112-127.
 - Ottanà R., Paoli P., Naß A., Lori G., Cardile V., Adornato I., Rotondo A., Graziano A.C.E., Wolber G., Maccari R.; Discovery of 4-[(5-arylidene-4-oxothiazolidin-3-yl)methyl]benzoic acid derivatives active as novel potent allosteric inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: In silico studies and in vitro evaluation as insulinomimetic and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 127, 840-858.
 - Oyama T., Miyasita Y., Watanabe H., Shirai K.; The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2006**, 73, 227-234.

-
- Panico A., Maccari R., Cardile V., Crascì L., Ronsisvalle S., Ottanà R.; 5-Arylidene-4-thiazolidinone Derivatives Active as Antidegenerative Agents on Human Chondrocyte Cultures. *Med. Chem.* **2013**, *9*, 84-90.
 - Puius Y.A., Zhao Y., Sullivan M., Lawrence D.S., Almo S.C., Zhang Z.Y.; Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 13420-13425.
 - Rakowitz D., Maccari R., Ottanà R., Vigorita M.; In vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-benzyl-2,4-thiazolidinediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 567-574.
 - Ramana K.V., Friedrich B., Srivastava S., Bhatnagar A., Srivastava S.K.; Activation of Nuclear Factor- κ B by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* **2004**, *53*, 2910-2920.
 - Ramana K.V.; Friedrich B.; Tammali R.; West M.B.; Bhatnagar A.; Srivastava S.K.; Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **2005**, *54*, 818-829.
 - Ramana K.V.; Srivastava S.K.; Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine* **2006**, *36*, 115-122.
 - Ramana K.V.; Aldose reductase: new insights for an old enzyme. *BioMol. Concepts* **2011**, *2*, 103-114.
 - Reddy A.B.M., Ramana K.V.; Aldose reductase inhibition: emerging drug target for the treatment of cardiovascular complications. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* **2010**, *5*, 25-32.
 - Reddy K.A., Kumar P.U., Srinivasulu M., Triveni B., Sharada K., Ismail A., Reddy G.B.; Overexpression and enhanced specific activity of aldoketo reductases (AKR1B1 & AKR1B10) in human breast cancers. *The Breast*, **2017**, *31*, 137-143.
 - Rondeau J.M., Tête-Favier F., Podjarny A., Reymann J.M., Barth P., Biellmann J.F., Moras D.; Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **1992**, *355*, 469-472.

-
- Roy S., Kern T.S., Song B., Stuebe C.; Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: implications for targeting diabetic retinopathy. *Am. J. Pathol.* **2017**, *187*, 9-19.
 - Sainz N., Barrenetxe J., Moreno-Aliaga M.J., Martinez J.A.; Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* **2015**, *64* 35-46.
 - Salmeen A., Andersen J.N., Myers M.P., Tonks N.K, Barford D.; Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1401-1412.
 - Saltiel A.R., Kahn C.R.; Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **2001**, *414* 799-806.
 - Sastry S.K, Elferink L.A.; Checks and balances: interplay of RTKs and PTPs in cancer progression. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 435-440.
 - Scapin G., Patel S.B., Becker J.W., et al.; The Structural Basis for the Selectivity of Benzotriazole Inhibitors of PTP1B. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11451-11459.
 - Schmidt M.I., Saad M.J.A., Duncan B.B.; Subclinical inflammation and obesity, diabetes and related disorders. *Drug Discov. Today: Disease Mechanisms* **2005**, *2*, 307-312.
 - Schneider R., Beumer C., Simard J.R., Grütter C, Rauh D.; Selective detection of allosteric phosphatase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 6838–6841.
 - Shoeb M.; Ansari N.H.; Srivastava S.K.; Ramana K.V.; 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 230-237.
 - Singh R., White M.A., Ramana K.V., Petrash J.M., Watowich S.J., Bhatnagar A., Srivastava S.K.; Structure of a Glutathione Conjugate Bound to the Active Site of Aldose Reductase. *Proteins* **2006**, *64*, 101-110.
 - Sivitz W.I., Walsh S.A, Morgan D.A., Thomas M.J., Haynes W.G.; Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rat. *Endocrinology*, **1997**, *138*, 3395-3401.
 - Song G.J., Jung M., Kim J.H., Park H., Rahman M.H., Zhang S., Zhang Z.Y., Park D.H., Kook H., Lee I.K. Suk K.; A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation. *J. Neuroinflammation*, **2016**, 13-86.

-
- Sonowal H.; Pal, P.B.; Wen J.J.; Awasthi S.; Ramana K.V.; Srivastava S.K.; Aldose reductase inhibitor increases doxorubicin-sensitivity of colon cancer cells and decreases cardiotoxicity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3182.
 - Sonowal H., Pal P., Shukla K., Saxena A., Srivastava S.K., Ramana K.V.; Aldose reductase inhibitor, fidarestat prevents doxorubicin-induced endothelial cell death and dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *150*, 181-190.
 - Sotriffer C.A., Krämer O., Klebe G.; Probing Flexibility and “Induced-Fit” Phenomena in Aldose Reductase by Comparative Crystal Structure Analysis and Molecular Dynamics Simulations. *Proteins* **2004**, *56*, 52-66.
 - Srivastava S., Dixit B.L., Cai J., Sharma S., Hurst H.E., Bhatnagar A., Srivastava, S.K.; Metabolism of Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxynonenal (HNE) in Rat Erythrocytes: Role of Aldose Reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 642-651.
 - Srivastava S.K., Ramana K.V., Bhatnagar A.; Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 380-392.
 - Srivastava S.K.; Yadav U.C.S.; Reddy A.B.M.; Saxena A.; Tammali R.; Shoeb M.; Ansari N.H.; Bhatnagar A.; Petrash M.J.; Srivastava S.; Ramana K.V.; Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *191*, 330-338.
 - Steuber H., Zentgraf M., Gerlach C., Sotriffer C. A., Heine A., Klebe G.; Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking and co-crystallisation conditions, *J. Mol. Biol.* **2006**, *363*, 174-187.
 - Steuber H.; An old NSAID revisited: crystal structure of aldose reductase in complex with Sulindac at 1.0 Å supports a novel mechanism for its anticancer and antiproliferative effects. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2155-2157.
 - Stuiblé M., Doody K.M., Tremblay M.L.; PTP1B and TC-PTP: regulators of transformation and tumorigenesis. *Cancer Metast. Rev.*, **2008**, *27*, 215–230.
 - Tammali R., Ramana K.V., Srivastava S.K.; Aldose reductase regulates TNF- α -induced PGE₂ production in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2007**, *252*, 299-306.

-
- Tammali R., Srivastava, S.K., Ramana K.V.; Targeting aldose reductase for the treatment of cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, 11, 560-571.
 - Thon M., Hosoi T., Ozawa K.; Possible integrative actions of leptin and insulin signaling in the hypothalamus targeting energy homeostasis. *Front. Endocrinol.*, **2016**, 7, 138.
 - Tiganis T, Bennett BM.; Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.*, **2007**, 402, 1-15.
 - Tonks N.K., Diltz C.D., Fischer E.H.; Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6731-6737.
 - Tonks N.K., Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, 7, 833-846.
 - Urzhumtsev A., Tête-Favier F., Mitschler A., Barbanton J., Barth P., Urzhumtseva L., Biellmann J.-F., Podjarny A.D., Moras D.A.; 'Specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors Tolrestat and Sorbinil. *Structure* **1997**, 5, 601-612.
 - Van Huijsduijnen R.H., Bombrun A., Swinnen D.; Selecting protein tyrosine phosphatases as drug targets. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 1013-1019.
 - Vedantham S., Thiagarajan D., Ananthakrishnan R., Wang L., Rosario R., Zou Y.S., Goldberg I., Yan S.F., Schmidt A.M., Ramasamy R.; Aldose reductase drives hyperacetylation of Erg-1 in hyperglycemia and consequent upregulation of proinflammatory and prothrombotic signals. *Diabetes* **2014**, 63, 761-774.
 - Vieira M.N.N., Lyra N. M., Ferreira S.T., De Felice F.G.; Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): A potential target for Alzheimer's therapy?. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, 9, art.7
 - Vintonyak V.V., Antonchick A.P., Rauh D., Waldmann H.; The therapeutic potential of phosphatase inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 272-283.
 - Vintonyak V.V., Waldmann H., Rauh D.; Using small molecules to target protein phosphatases. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2145-2155.
 - Vyas B., Silakari O. et al.; Integrated pharmacophore and docking-based designing of dual inhibitors of aldose reductase (ALR2) and protein tyrosine phosphatase (PTP1B) as

novel therapeutics for insulin-resistant diabetes and its complications. *J. Chemometrics* **2015**, 29, 109-125.

- Wiesmann C., Barr K.J., Kung J., Zhu J., Erlanson D.A., Shen W., Fahr B.J., Zhong M., Taylor L., Randal M., McDowell R.S., Hansen S.K. Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 730-737.
- Wilson D. K., Bohren K.M., Gabbay K.H., Quijcho F.A.; An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **1992**, 257, 81-84.
- Wolber G., Langer T.; LigandScout: 3-D Pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 160-169.
- Wolber G., Dornhofer A.A., Langer T.; Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, 20, 773-788.
- www.who.int (Global reports on diabetes).
- Yip S.C., Saha S. Chernoff J.; PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Cell* **2010**, 141, 1-8.
- Yu Z.H., Zhang Z.Y.; Regulatory mechanism and novel therapeutic targeting strategies for protein tyrosine phosphatases. *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 1069-1091.
- Zabolotny J.M., Bence-Hanulec K.K., Stricker-Krongrad A., Haj F., Wang Y., Minokoshi Y., Kim Y.B., Elmquist J.K., Tartaglia L.A., Kahn B.B., Neel B.G.; PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* **2002**, 2, 489-495.
- Zabolotny J.M., Kim Y.B., Welsh L.A., Kershaw E.E., Neel B.G., Kahn B.B.; Protein-tyrosine Phosphatase 1B Expression Is Induced by Inflammation in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 14230-14241.
- Zeng K.W., Li J., Dong X., Wang Y.H., Ma Z.Z., Jiang Y., Jin H.W., Tu P.F.; Anti-neuroinflammatory efficacy of the aldose reductase inhibitor FMHM via phospholipase C/protein kinase C-dependent NF-κB and MAPK pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 273, 159-171.
- Zhang S., Zhang Z.Y.; PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov. Today*, **2007**, 12, 373-381.

- Zhang Z.Y., Dodd G.T., Tiganis T.; Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol Sci.* **2015**, 36:661-674.
- Zhang Y., Li Q., Youn Y., Cai H.; Protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in calpain-dependent feedback regulation of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2) in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **2017**, 292, 407-416.
- Zhao A.Z., Shinohara M.M., Huang D., Shimizu M., Eldar-Finkelman H., Krebs E.G., Beavo J.A., Bornfeldt K.E.; Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 11348-11354.
- Zhao J.X. Yuan Y.W., Cai C.F., Shen D.Y., Chen M.L., Ye F., Mi Y.J., Luo Q.C., Cai W.Y., Zhang W., Long Y., Zeng Y., Ye G.D., Yang S.Y.; Aldose reductase interacts with AKT1 to augment hepatic AKT/mTOR signaling and promote hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, **2017**, 8, 66987-67000.
- Zheng X., Zhang L., Chen W., Chen Y., Xie W., Xiaopeng H.; Partial inhibition of aldose reductase by nitazoxanide and its molecular basis. *ChemMedChem* **2012**, 7, 1921-1923.