

PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI SISTEMI ETEROCICLICI QUALI ANTAGONISTI PER I RECETTORI ADENOSINICI. VALIDAZIONE DI MODELLI RECETTORIALI.

Riassunto dell'elaborato della tesi di dottorato XX ciclo.

Il lavoro di dottorato qui presentato si è centrato sullo sviluppo di nuovi antagonisti adenosinici che presentassero attività nei confronti dei vari sottotipi recettoriali del ligando naturale Adenosina.

Tali recettori ubiquitari, che mediano numerose e importanti funzioni fisiologiche, sono stati suddivisi da Burnstock nel 1978 in A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , in base alla loro capacità di inibire, nel caso dei sottotipi A_1 e A_3 , o stimolare nel caso invece di A_{2A} e A_{2B} , l'enzima Adenilato Ciclasi.

In particolare, mentre i sottotipi A_1 e A_{2A} sono stati ampiamente caratterizzati grazie alla scoperta di ligandi potenti e selettivi, la ricerca è attualmente rivolta ai due sottotipi meno noti e per i quali sono stati intravisti interessanti impieghi terapeutici.

Si è notato infatti che l'inibizione selettiva del recettore A_3 determina, fra le varie risposte, un aumento dell'adesione di linfociti citotossici alle cellule tumorali di alcune linee cellulari di linfoma e una significativa diminuzione della pressione intraoculare; pertanto A_3 -antagonisti potrebbero essere utilizzati come possibili antitumorali nonché nel trattamento del glaucoma.

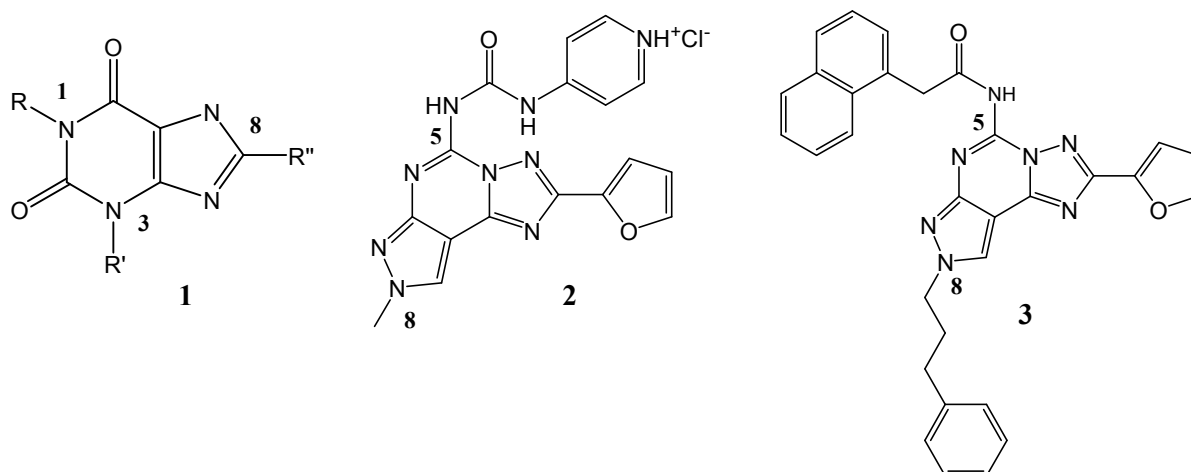
Proprietà antiasmatiche sono state attribuite, invece, ad inibitori del recettore A_{2B} data la sua elevata espressione sulla superficie degli eosinofili.

Il punto di partenza nella ricerca di antagonisti adenosinici potenti e selettivi è stato sicuramente lo studio dei ligandi naturali quali l'adenina e le xantine: numerosi derivati di tali composti sono infatti noti in letteratura quali potenti antagonisti nei confronti dei recettori adenosinici.

Il nostro gruppo di ricerca da anni si occupa della sintesi e dello studio di SAR di sistemi policiclici azotati di diversa natura che hanno evidenziato un buon profilo di binding verso tali sottotipi recettoriali.

Uno dei templati impiegati è proprio il nucleo xantinico che permette un certo numero di variazioni sul nucleo centrale; è infatti possibile introdurre sostituenti di varia natura nelle posizioni 1, 3 e 8 **(1)**.

Un altro template, che è stato quello maggiormente studiato dal nostro gruppo di ricerca, è il nucleo pirazolo-triazolo-pirimidinico il quale, opportunamente sostituito nelle posizioni N^5 ed N^8 , ha permesso di ottenere potenti antagonisti verso i recettori adenosinici; in particolare, verso A_3 , è stato sintetizzato il più potente e selettivo antagonista solubile in acqua (15 mM) **(2)** mentre, per quanto riguarda il sottotipo A_{2B} , si è ottenuto un derivato, caratterizzato da sostituenti ingombranti sia in N^5 che in N^8 , che ha dimostrato buone affinità e selettività **(3)**.



Tramite la sintesi quindi di numerosi composti è stato possibile estrapolare un profilo di SAR piuttosto dettagliato per tale classe di derivati (figura 1).

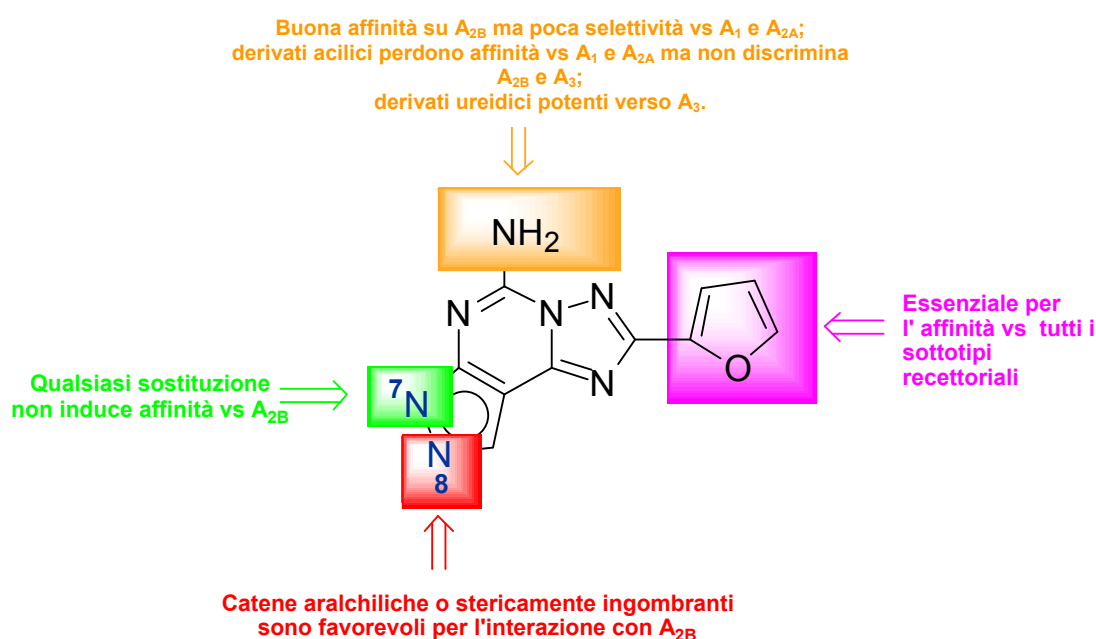


Figura 1

Il lavoro del mio corso di dottorato si è quindi centrato in parte sull'approfondimento degli studi precedenti tramite la sintesi di nuovi derivati di natura sia xantinica che pirazolo-triazolo-pirimidinica.

Per quanto riguarda il template xantinico, abbiamo deciso di sintetizzare dei derivati della teofillina caratterizzati dalla presenza di un nucleo fuso tra le posizioni 7 e 8 (**4**); in studi precedenti si era infatti osservato che tale modifica portava ad un buon profilo di binding verso il recettore A_3 .

Purtroppo, tramite lo studio effettuato, non è stato raggiunto l'obiettivo desiderato dal momento che nessuno dei composti sintetizzati mostra affinità verso i recettori adenosinici: tale inattività è stata comunque razionalizzata tramite studi di sovrapposizione molecolare per ottimizzare studi futuri più mirati.

In merito al template pirazolo-triazolo-pirimidinico, abbiamo deciso di approfondire gli studi precedenti allo scopo sia di ottenere nuovi antagonisti potenti e selettivi verso i recettori A_{2B} e A_3 in particolare, sia di capire, tramite l'ausilio del "molecular modeling", le interazioni coinvolte all'interno della tasca recettoriale per quanto riguarda il sottotipo A_3 . Sono quindi stati sintetizzati un numero elevato di composti caratterizzati da sostituenti di natura diversa e di diverso ingombro sterico nelle posizioni N^5 ed N^8 allo scopo di riuscire a discriminare fra i vari sottotipi recettoriali. Tramite tali studi abbiamo potuto confermare l'importanza della presenza di almeno un gruppo carbonilico in N^5 al fine di instaurare delle interazioni tipo legame idrogeno con alcuni residui amminoacidici dei TM del recettore hA_3 .

Dallo studio in merito al recettore A_{2B} è invece emerso che sostituenti ingombranti sia in posizione N^5 che in N^8 non sono favorevoli, contrariamente a quanto emerso dagli studi precedenti, per l'interazione recettoriale. Si è quindi riusciti a dipingere un nuovo profilo di SAR.

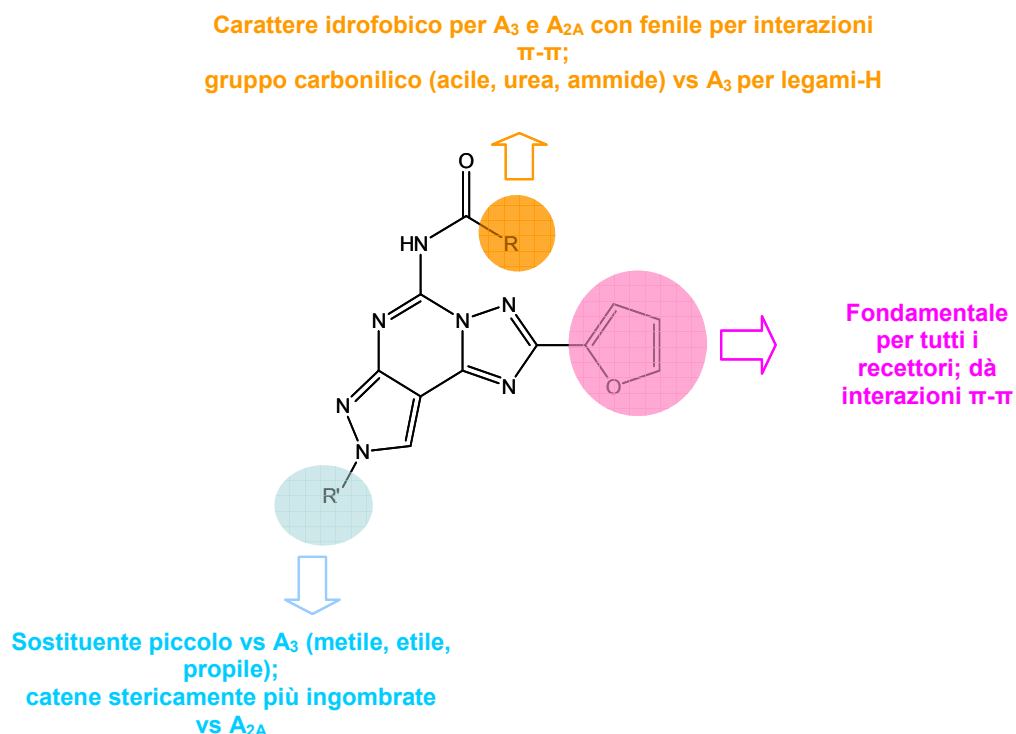


Figura 2

Uno degli obiettivi del nostro gruppo di ricerca è stato inoltre quello di collaborare in questi anni col Dr. Stefano Moro dell'Università di Padova al fine di creare dei modelli QSAR che permettessero la predizione di molecole attive nei confronti dei recettori adenosinici.

Risultano infatti evidenti i vantaggi che si avrebbero in termini di risparmio di tempo e di denaro se tali predizioni fossero esatte.

Nel presente elaborato di dottorato sono quindi presentati diversi modelli recettoriali, riguardanti i sottotipi A_3 , A_{2A} e A_{2B} .

In particolare, per quanto riguarda il recettore A_3 , vengono presentati la validazione esterna del modello basato sulle mappe di potenziale elettrostatico e uno studio mirato all'ottenimento di nuovi composti solubili in acqua potenzialmente attivi verso A_3 .

Per quanto riguarda invece il recettore A_{2A} , viene presentata la validazione del modello costruito tramite l'impiego delle tecniche 3D-QSAR (autoMEP/PLS&autoMEP/RSA) ed LBHM (Ligand Based Homology Modeling) in tandem (figura 3).

Infine viene presentata anche la validazione del modello A_{2B} costruito unicamente tramite la metodologia del LBHM. Tale innovativo approccio è stato recentemente riportato da Moro e collaboratori quale tool per simulare i cambiamenti conformazionali del recettore indotti dal ligando: l'idea che la cavità recettoriale potesse adattarsi al ligando è nata dall'osservazione che composti predetti inattivi a causa delle dimensioni incompatibili con il volume ipotetico della cavità recettoriale, presentavano in realtà un buon profilo di binding. Viene quindi introdotto per la prima volta il concetto di plasticità recettoriale.

I risultati ottenuti dagli studi di validazione effettuati dimostrano come l'impiego di tali metodologie sia promettente al fine di trovare nuovi antagonisti per i recettori adenosinici.

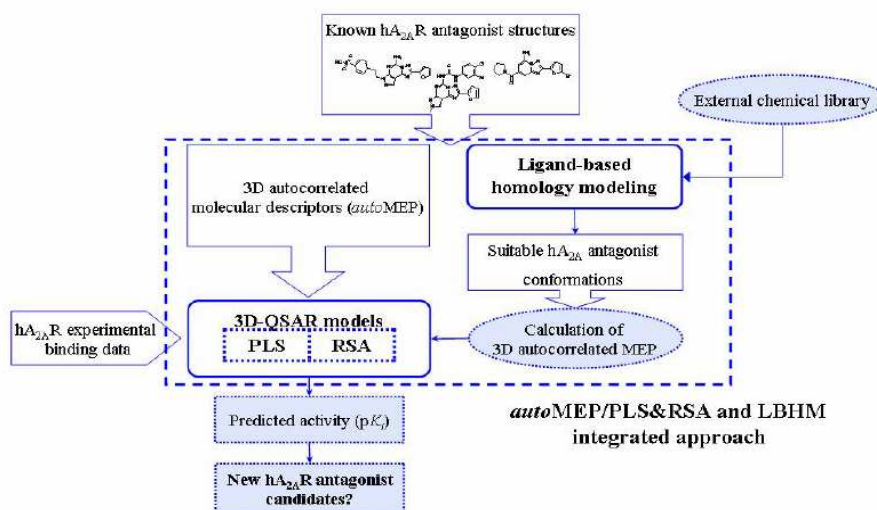


Figura 3

PARTECIPAZIONI E COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

- Partecipazione al “*XXV Corso avanzato di Chimica Farmaceutica*” tenutosi a Urbino nel periodo 3-7/ 07/ 2005.
- Partecipazione al “*Second Joint Italian-German Purine Club Meeting*” tenutosi a Lipsia (Germania) nel periodo 12-15 settembre 2007.
- Comunicazioni a Congressi:
 - *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Giampiero Spalluto, Claudia Cusan, Chiara Bolcato, Kenneth A. Jacobson, Barbara Cacciari, Stefano Moro, Karl Norbert Klotz. (2004). “5-7 Disubstituted triazolo-triazines as new adenosine receptor antagonists.” XVII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana. Pisa, Settembre 6-10.*
 - *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Chiara Bolcato, Christian Montopoli, Stefano Moro, Barbara Cacciari, Pier Giovanni Baraldi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Giampiero Spalluto. “Synthesis and biological studies of a new series of water soluble hA₃ adenosine receptor antagonists.” (2004) Second Joint Italian-Swiss meeting on medicinal chemistry. Modena, September 12-16.*
 - *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Chiara Bolcato, Christian Montopoli, Stefano Moro, Barbara Cacciari, Pier Giovanni Baraldi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Giampiero Spalluto. (2005). “Synthesis, biological and modeling studies of new water soluble hA₃ adenosine receptor antagonists.” First Joint Italian-German Purine Club meeting. Chieti, September 18-20.*
 - *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Chiara Bolcato, Christian Montopoli, Stefano Moro, Giampiero Spalluto. (2006). “Antagonisti umani A₃ idrosolubili: effetto dell’eteroatomo sull’affinità.” I Giovani e la Chimica in Friuli Venezia Giulia. Trieste, Maggio 5-6.*
 - *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Chiara Bolcato, Christian Montopoli, Stefano Moro, Barbara Cacciari, Pier Giovanni Baraldi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Giampiero Spalluto. (2006). “5-Heteroarylcarbamoilamino-Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidines as hA₃ adenosine receptor antagonists.” 8th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides. Ferrara, Italy, May 24-28.*
 - *Lisa Michielan, Magdalena Bacilieri, Andrea Schiesaro, Chiara Bolcato, Giorgia Pastorin, Giampiero Spalluto, Barbara Cacciari, Karl-Norbert Klotz, Chosei Kaseda, Stefano Moro. (2007). “Linear and non-Linear 3D-QSAR approaches in tandem with LBHM as a strategy to depict the antagonist binding site of the hA_{2A} adenosine receptor. 2nd Joint Italian-German Purine Club Meeting. Lipsia, Germany, September 12-15.*
 - *Mattia Sturlese, Erica Morizzo, Chiara Bolcato, Giorgia Pastorin, Giampiero Spalluto, Barbara Cacciari, Karl-Norbert Klotz, Stefano Moro. (2007). “Ligand-Based homology modeling as computational strategy to characterize the antagonist binding site of the human A_{2B} adenosine receptor.” 2nd Joint Italian-German Purine Club Meeting. Lipsia, Germany, September 12-15.*
 - *Helge Joa, Stefano Moro, F. Marighetti, Chiara Bolcato, Giampiero Spalluto, Karl-Norbert Klotz. (2007). “The role of Q167 in the second extracellular loop of the human A₃ adenosine receptor for species selectivity of antagonists.” 2nd Joint Italian-German Purine Club Meeting. Lipsia, Germany, September 12-15.*
 - *Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Barbara Cacciari, Karl-Norbert Klotz, Sonja Kachler, Stefano Moro, Magdalena Bacilieri, Erika Morizzo, Mattia Sturlese, Giampiero Spalluto.*

(2007). “N⁵-arylacetyl-pyrazolo-triazolo-pyrimidines as adenosine receptor antagonists. Effects of the substituents at the N⁵ and N⁸ positions on the affinity.” **2nd Joint Italian-German Purine Club Meeting**. Lipsia, Germany, September 12-15.

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Barbara Cacciari, Sonja Kachler, Karl Norbert Klotz, Christian Montopoli, Stefano Moro, Giampiero Spalluto.* “Synthesis, biological studies and molecular modeling investigation of 1,3-dimethyl-2,4-dioxo-6-methyl-8-(substituted)-1,2,3,4-tetrahydro[1,2,4]triazolo[3,4-f]purines as potential adenosine receptor antagonists”. **Il Farmaco** **2005**, *60*, 299-306.
- *Barbara Cacciari, Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Giampiero Spalluto, Magdalena Bacilieri, Stefano Moro.* “A_{2B} Adenosine Receptor Antagonists: Recent Developments”. **Mini Rev. Med. Chem.** **2005**, *5*, 1053-1060.
- *Giorgia Pastorin, Chiara Bolcato, Barbara Cacciari, Sonja Kachler, Karl Norbert Klotz, Christian Montopoli, Stefano Moro, Giampiero Spalluto.* “Synthesis, biological and modeling studies of 1,3-di-n-propyl-2,4-dioxo-6-methyl-8-(substituted)-1,2,3,4-tetrahydro[1,2,4] triazolo[3,4-f]purines as adenosine receptor antagonists”. **Il Farmaco** **2005**, *60*, 643-651.
- *Giorgia Pastorin, Tatiana Da Ros, Chiara Bolcato, Christian Montopoli, Stefano Moro, Barbara Cacciari, Piero Giovanni Baraldi, Katia Varani, Pier Andrea Borea, Giampiero Spalluto.* “Synthesis and biological studies of a new series of 5-heteroarylcarbamoylamino-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as human A₃ adenosine receptor antagonists. Influence of the heteroaryl substituent on binding affinity and molecular modeling investigation”. **J. Med. Chem.** **2006**, *49*, 1720-1729.
- *Stefano Moro, Magdalena Bacilieri, Barbara Cacciari, Chiara Bolcato, Claudia Cusan, Giorgia Pastorin, Karl-Norbert Klotz, Giampiero Spalluto.* “The application of a 3D-QSAR (autoMEP/PLS) approach as an efficient pharmacodynamic-driven filtering method for small-size virtual library: application to a lead optimization of a human A₃ adenosine receptor antagonist”. **Bioorg. Med. Chem.** **2006**, *14*, 4923-4932.
- *Barbara Cacciari, Chiara Bolcato, Giampiero Spalluto, Karl-Norbert Klotz, Magdalena Bacilieri, Francesca Deflorian, Stefano Moro.* “Pyrazolo-triazolo-pyrimidines as adenosine receptor antagonists: a complete structure-activity profile”. **Purinergic Signalling.** **2007**, *3*, 183-193.
- *Chiara Bolcato, Claudia Cusan, Giorgia Pastorin, Giampiero Spalluto, Barbara Cacciari, Karl Norbert Klotz, Erica Morizzzo, Stefano Moro.* “Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidines as adenosine receptor antagonists: Effect of the N-5 bond type on the affinity and selectivity at the four adenosine receptor subtypes.” **Purinergic Signalling**, In Press.
- *Catia Lambertucci, Gloria Cristalli, Diego Dal Ben, Chiara Bolcato, Karl Norbert Klotz, Giampiero Spalluto, Rosaria Volpini.* “New 2,6,9 tri-substituted adenines as adenosine receptor antagonists: a preliminary SAR profile.” **Purinergic Signalling**, In Press.
- *Lisa Michielan, Magdalena Bacilieri, Andrea Schiesaro, Chiara Bolcato, Giorgia Pastorin, Giampiero Spalluto, Barbara Cacciari, Karl-Norbert Klotz, Chosei Kaseda, Stefano Moro.* “Linear and non-linear 3D-QSAR approaches in tandem with Ligand-Based Homology Modeling as computational strategy to depict the antagonist binding site of the human A_{2A} adenosine receptor.” **J. Chem. Inform. Mod.**, Submitted.