



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXVII
COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

**Progettazione, sintesi ed attività di
inibitori del Proteasoma a base
peptidica**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottoranda

Dott.ssa Alessandra Scotti

(firma)

Tutore

Marastoni Mauro

(firma)

2012/2014

INDICE

INTRODUZIONE	1
Sistema ubiquitina-proteasoma	3
Il proteasoma	5
Il core 20S	6
INIBITORI DEL PROTEASOMA	14
SCOPO DELLA TESI	19
Serie issossazolin, vinyl esterea	21
<i>Sintesi degli inibitori</i>	24
<i>Isolamento e purificazione del proteasoma</i>	27
<i>Saggi di inibizione enzimatica</i>	28
<i>Conclusioni</i>	29
Serie etil-estere dell'acido trans-trans muconico	31
<i>Sintesi degli inibitori</i>	33
<i>Isolamento e purificazione del proteasoma</i>	35
<i>Saggi di inibizione enzimatica</i>	36
<i>Conclusioni</i>	37
Serie dipeptidi naftochinonici	37
<i>Sintesi degli inibitori</i>	41
<i>Studi di modeling</i>	45
<i>Conclusioni</i>	46
Serie aminoacidi naftochinonici	48
<i>Linker etilendiaminico</i>	48
<i>Linker butilendiaminico</i>	58
<i>Linker cicloesildiaminico</i>	68
CONCLUSIONI GENERALI	77
PARTE SPERIMENTALE	79
<i>Materiali e metodi</i>	79
<i>Procedure sintetiche generali</i>	80
<i>Test di attività dei proteasomi</i>	91
<i>Test di inibizione enzimatica</i>	92
BIBLIOGRAFIA	93

INTRODUZIONE

Lo studio riguardante gli inibitori del proteasoma rappresenta un campo di ricerca in costante sviluppo sia in ambito accademico che industriale. Queste molecole sono strumenti fondamentali per lo studio degli importanti processi cellulari regolati dalla via metabolica “ubiquitina-proteasoma”, che rappresenta un importante bersaglio nel trattamento di patologie quali il cancro, distrofie muscolari, infiammazioni e disturbi immunitari.

Attualmente numerosi sono gli inibitori del complesso enzimatico multicatalitico sottoposti a studi clinici avanzati quali potenziali farmaci anticancro. Il Bortezomib (Velcade®), un derivato boronico pseudo-dipeptidico, è da qualche tempo in terapia per il trattamento del mieloma multiplo e del linfoma delle cellule della corteccia cerebrale refrattari agli altri protocolli terapeutici.

Le proteine sono il prodotto finale dell'informazione contenuta nella cellula. Ogni cellula sintetizza migliaia di proteine le quali svolgono i processi biologici dopo essere state trasportate negli idonei compartimenti cellulari. Le proteine sono caratterizzate da una vita molto variabile (da pochi minuti a mesi) e la loro presenza è regolata dal giusto equilibrio tra sintesi e degradazione.

La degradazione interessa le proteine vecchie, danneggiate, denaturate, erroneamente assemblate e le proteine ad attività regolatoria che hanno svolto la loro funzione e devono essere eliminate per bloccarne l'attività. In quest'ultimo caso la degradazione ha una funzione regolatoria mentre negli altri casi impedisce l'accumulo di materiale che può mettere a rischio la sopravvivenza della cellula. Nelle cellule eucariotiche la degradazione è operata dal sistema lisosomiale (10-20%) e dal sistema ubiquitina-proteasoma (80-90%) (**figura 1**).

Il sistema lisosomiale si occupa prevalentemente della degradazione di proteine di membrana o di proteine internalizzate per endocitosi.

Il sistema ubiquitina-proteasoma è il principale sistema degradativo e lo si trova nel citoplasma e nel nucleo dove degrada proteine non correttamente sintetizzate, proteine a vita breve e lunga nonché proteine regolatorie. Risulta quindi evidente che difetti nel funzionamento di questo strumento proteolitico possono condurre a disordini nel funzionamento cellulare e causare gravi disturbi.^{1,2}

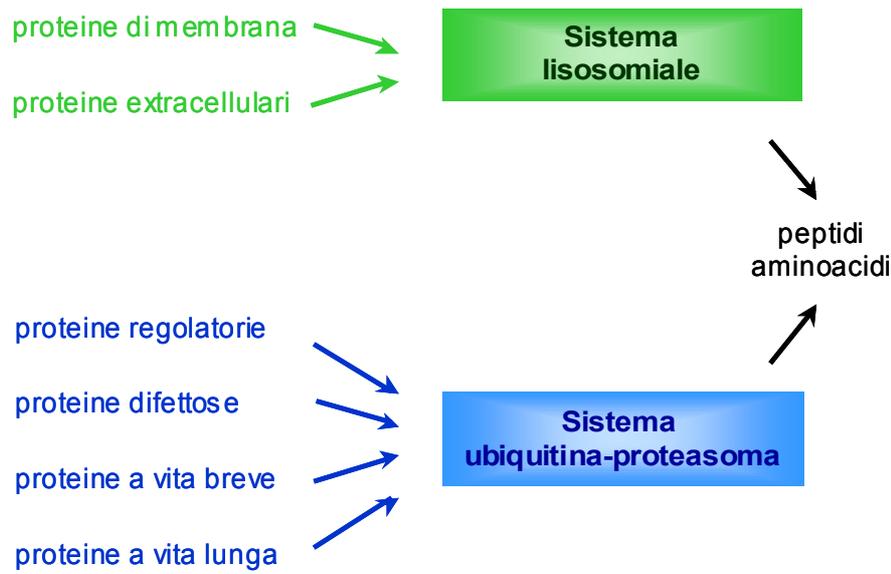


Figura 1. Sistemi di degradazione cellulare.

L'inibizione del proteasoma porta a morte cellulare, ciò sta ad indicare che il sistema proteolitico è anche coinvolto nella costante degradazione di fattori apoptotici.

Gli inibitori di questo sistema degradativo costituiscono infatti una nuova classe di farmaci antitumorali. Attualmente inibitori di questo enzima vengono studiati e testati come potenziali agenti anti-infiammatori, nella regolazione della risposta immunitaria e nel trattamento di neoplasie.

Gli studi in questo ambito sono sempre più numerosi e approfonditi e riguardano principalmente il disegno e la sintesi di molecole selettive per ognuna delle tre principali attività proteasiche del complesso multicatalitico. Strutture capaci di inibire in modo specifico le singole azioni del proteasoma possono modulare ed indirizzare la via metabolica in modo mirato e conseguentemente rappresentare agenti terapeutici in grado

di contrastare solo determinate patologie.

Sistema ubiquitina-proteasoma

Le proteine che devono essere degradate da questo sistema vengono marcate covalentemente con l'ubiquitina. L'ubiquitina è una piccola proteina del peso di 8kDa costituita da 76 aminoacidi.

La marcatura ha lo scopo di far riconoscere il substrato da degradare al complesso enzimatico multicatalitico.

La degradazione interessa substrati proteici anche molto diversi tra loro, ed è basato su un meccanismo di riconoscimento e marcatura molto ingegnoso ed efficiente.³

L'attacco dell'ubiquitina al substrato avviene attraverso la formazione del legame isopeptidico che si genera tra il capossi-terminale dell'ubiquitina e il gruppo amminico di un residuo di Lys sul substrato da degradare.

Alla prima molecola di ubiquitina se ne possono attaccare covalentemente delle altre portando così alla formazione di catene di ubiquitina (figura 2). Si è osservato che catene costituite da 4 o più unità di ubiquitina costituiscono il segnale per la proteolisi operata da proteasoma 26S. L'attacco dell'ubiquitina è un processo ATP dipendente che viene catalizzato da tre enzimi: E1, E2, E3, che conferiscono anche specificità al processo. La prima reazione, catalizzata da E1, è responsabile dell'attivazione dell'ubiquitina: il C-terminale di Gly 76 dell'ubiquitina, attivato in una reazione ATP-dipendente, viene legato alla Cys del sito attivo dell'enzima E1. L'ubiquitina così attivata viene trasferita ad E2, nel cui sito attivo è presente un residuo di Cys.

E2, attraverso un'attività trasferasica, trasferisce l'ubiquitina alla ligasi E3 che lega l'ubiquitina ai residui di Lys della proteina bersaglio, formando un legame isopeptidico con il C-terminale di Gly 76. In alcuni casi, E2 trasferisce l'ubiquitina direttamente alla proteina bersaglio senza l'intervento di E3.

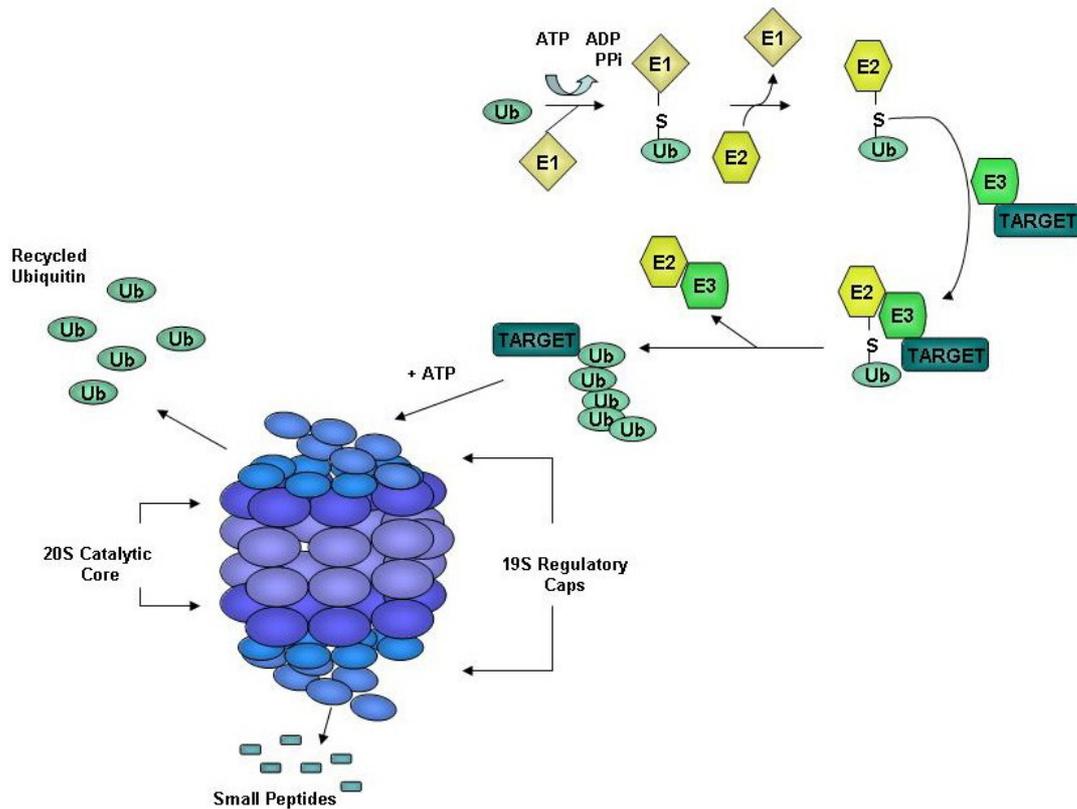


Figura 2. Schema della via metabolica ubiquitina-proteasoma.

Il sistema enzimatico E1, E2, E3 agisce in modo ciclico, permettendo la formazione di un “grappolo” di molecole di ubiquitina dovuto alla progressiva unione di un monomero di ubiquitina alla Lys 48 dell’ubiquitina precedente. La specificità per il substrato nel sistema di ubiquitinazione è dovuta all’azione combinata delle diverse transferasi E2 e delle diverse ligasi E3 che, combinandosi, riconoscono la proteina destinata alla degradazione.

La degradazione inizia con il riconoscimento sulla proteina di specifici segnali da parte degli enzimi E2/E3.

In seguito al riconoscimento del segnale, viene marcato il substrato con l’ubiquitina direzionandolo perciò al proteasoma. I segnali presenti sulla proteina che inducono l’attacco dell’ubiquitina sono: la sequenza dell’N-terminale, la fosforilazione di sequenze PEST, “destruction box” e la perdita di conformazione.

La presenza di particolari aminoacidi all’N-terminale della proteina è un

segnale universale. È stato evidenziato che proteine con residui N-terminali carichi (Lys o Arg) o voluminosi (Phe, Leu, Tyr, Trp) sono rapidamente ubiquitinate e degradate; al contrario, proteine con residui N-terminali piccoli risultano abbastanza stabili.

Il segnale di degradazione richiede nelle vicinanze dell'N-terminale la presenza di una lisina sulla quale assemblare il "grappolo" di ubiquitina.

La fosforilazione di specifiche sequenze (Pro-Glu-Ser-Thr, PEST) o di "destruction-box" (9 aminoacidi) rappresenta un segnale che determina la marcatura con ubiquitina di proteine bersaglio. Questo segnale è utilizzato da alcune proteine che regolano il ciclo cellulare (ad esempio le cicline), dalla p53 e dall'inibitore del fattore di trascrizione NF-kB (IκB).

Proteine danneggiate da ossidazioni, mutazioni o da stress cellulare, proteine che perdono la loro struttura tridimensionale o che sono localizzate in un compartimento cellulare sbagliato diventano ottimi substrati del processo di ubiquitinazione. I segnali che attivano tale processo non sono ancora perfettamente chiari, ma certamente coinvolgono l'esposizione di regioni idrofobiche che normalmente non sono esposte da proteine nella loro struttura nativa. Ad esempio le proteine sintetizzate solo parzialmente o erroneamente nel reticolo endoplasmatico sono chiamate DRiPs (Detective Ribosomal Products); sono circa il 30% delle proteine di nuova sintesi e poiché non si presentano nella loro corretta conformazione nativa sono trasferite, mediante un trasporto specifico, dal reticolo endoplasmatico al citoplasma e degradate dal sistema ubiquitina-proteasoma. In alcuni casi le proteine non correttamente conformate si associano a proteine di assistenza (chiamati chaperones) che mediano il riconoscimento con gli enzimi deputati all'ubiquitinazione.

Il proteasoma

Il proteasoma è un complesso enzimatico multicatalitico situato nel citoplasma e nel nucleo delle cellule eucariotiche. Esso costituisce il principale sistema di degradazione proteica e possiede diversi tipi di

attività proteolitiche, sia eso che endopeptidasiche. Per la sua funzionalità, l'enzima richiede ATP e la marcatura con ubiquitina del substrato da degradare.

Il complesso è in grado di realizzare la compartimentalizzazione della proteolisi in quanto la regione responsabile dell'attività proteolitica (camera proteolitica) è confinata all'interno della struttura complessa chiamata "core" 20S che può essere associata a diversi tipi di regolatori (19S o 11S/PA28).

La compartimentalizzazione è fondamentale per la regolazione della proteolisi ed evita l'erronea degradazione di proteine che devono rimanere integre e funzionali. Il controllo temporale e spaziale della degradazione è regolato non solo dalla marcatura con l'ubiquitina ma anche dai cambiamenti di localizzazione cellulare del proteasoma. Infatti, attraverso l'uso di specifici segnali di localizzazione, il proteasoma può essere indirizzato in differenti compartimenti del citoplasma o del nucleo. Le principali attività svolte dal proteasoma e dai suoi regolatori sono: il riconoscimento ed il legame di proteine coniugate all'ubiquitina, l'attività di assemblaggio e disassemblaggio di proteine, la capacità di traslocare le proteine all'interno della camera proteolitica, diverse attività peptidasiche utilizzate per degradare proteine danneggiate e regolatorie. Questo complesso proteolitico gioca quindi un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi delle proteine, nel ciclo cellulare, nella trascrizione e nella risposta immune in quanto genera i peptidi che legano le molecole di MHC-I.

Il core 20S

Il core 20S è una particella a forma di barile costituita da 4 anelli sovrapposti.

Ogni anello è costituito da 7 subunità per un totale di 28 subunità che formano il core 20S.

Gli anelli esterni sono costituiti da subunità α mentre i 2 anelli interni da subunità β .

All'interno del complesso ci sono 3 compartimenti: quella situata tra le 2 subunità β è la camera proteolitica centrale mentre le altre due situate tra gli anelli α ed i β sono le anticamere (**figura 3**).

Il meccanismo di assemblaggio delle subunità non è ancora del tutto definito, ma è certo che richieda un processo altamente orchestrato per assicurare il corretto posizionamento di ciascuna subunità e la formazione di un complesso funzionale.

Le subunità α occludono l'accesso al proteasoma e solo in seguito all'interazione con il substrato ubiquitinato, nelle subunità α avviene un cambiamento conformazionale che apre il foro (~3nm) per l'accesso alla camera proteolitica centrale in cui avviene la degradazione vera e propria. L'ingombro sterico situato all'entrata è dato dalla presenza di sequenze di 20-30 aminoacidi presenti all'N-terminale delle subunità α .⁴

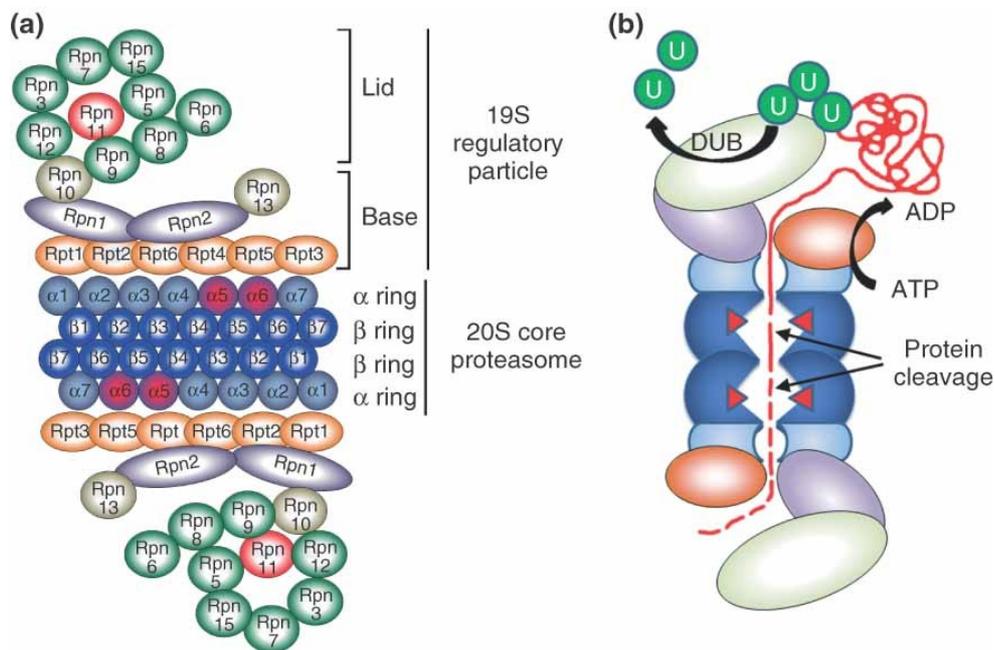


Figura 3. Rappresentazione schematica del proteasoma 20S (a) e del processo di proteolisi (b).

- a. Le subunità α e β costituiscono gli anelli che formano il core 20S del proteasoma.
- b. Sezione verticale del proteasoma 20S: gli anelli α creano le anticamere; gli anelli β danno invece origine alla camera proteolitica che risulta essere in posizione centrale.

Il proteasoma possiede 3 diverse attività catalitiche associate alle subunità $\beta 1$ (Y), $\beta 2$ (Z), $\beta 5$ (X). Queste subunità catalitiche sono inizialmente sintetizzate come precursori più lunghi, e successivamente durante l'assemblaggio del core 20S vengono tagliate all'N-terminale esponendo così la Thr, che costituisce il residuo catalitico di tutte le tre subunità.

Le altre subunità β non espongono la Thr e non presentano attività catalitica. Si è visto che le subunità $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ in forma monomerica non mostrano attività ma in seguito all'assemblaggio per la formazione del complesso diventano attive.

Le tre subunità catalitiche che si affacciano all'interno della cavità centrale del core 20S differiscono tra loro per specificità di substrato.⁵

Il sito attivo della subunità $\beta 5$ è chiamato "Chymotripsin-like" poiché esplica un'attività simile alla chimotripsina tagliando la catena aminoacidica dopo residui idrofobici e aromatici.

La subunità $\beta 2$ è sede dell'attività "Trypsin-like" perché, analogamente alla tripsina idrolizza il legame peptidico dopo residui basici. Infine, in $\beta 1$ si ha attività "Caspase-like" con idrolisi della catena dopo residui acidi (attività post-acidica). La denominazione utilizzata fa riferimento al tipo di substrato processato e non al meccanismo catalitico.

Si sono rivelate altre 2 attività del proteosoma svolte dalle subunità β quale la "branched-chain amino acid-preferring" responsabile del taglio dopo un aminoacido con catena laterale ramificata, e la "small neutral amino acid-preferring" poiché l'idrolisi avviene dopo un aminoacido neutro e di piccole dimensioni. Queste due attività non sono ancora attribuibili con certezza ad un sito catalitico in particolare.

I tre siti attivi non funzionano in modo indipendente tra loro, ma l'attività chimotriptica risulta limitare la velocità di tutte le altre attività. La degradazione delle proteine avviene con cicli di attivazione e inattivazione del sito chimotriptico, e grazie all'azione degli altri siti catalitici, le proteine che sono internalizzate nei proteasomi vengono idrolizzate in oligopeptidi sufficientemente corti (da 3 a 26 residui con una sequenza media di 6 aminoacidi) da poter diffondere fuori dal complesso.

Proprietà ed attività specifiche del proteasoma
- Dimensioni enormi (2.5 MDa)
- Struttura cilindrica cava
- Proteasi unica, non un insieme di proteasi
- Riconoscimento dei substrati marcati con ubiquitina e capacità deubiquitinante
- Sei siti attivi con tre differenti attività, confinati in compartimenti isolati
- Traslocazione delle proteine all'interno della camera proteolitica
- Degradazione delle proteine (attività peptidasica)
- 3 attività proteolitiche:
• Chimotriptica ($\beta 5/X$) taglia dopo AA idrofobici e aromatici
• Post-acidica ($\beta 1/Y$) taglia dopo AA acidi
• Triptica ($\beta 2/Z$) taglia dopo AA basici

Fondamentale per l'attività risulta essere il residuo di treonina all'N-terminale di ogni subunità β attiva in quanto è il promotore nucleofilo della proteolisi. L'ossidrile in catena laterale della treonina è responsabile dell'attacco nucleofilo al substrato facilitando così la protonazione del gruppo amminico del legame scissile con formazione di un intermedio tetraedrico che poi si rompe fornendo il primo prodotto peptidico e il corrispondente acil-enzima.

Questo schema idrolitico, comune alle tre attività, prevede l'intervento di una molecola d'acqua e costituisce la base chimica di una nuova classe di proteasi definita "idrolasi nucleofila N-terminale".

La molecola d'acqua de-acila la treonina catalitica, fornisce il secondo prodotto di reazione e ripristina il proteasoma (**figura 4**).

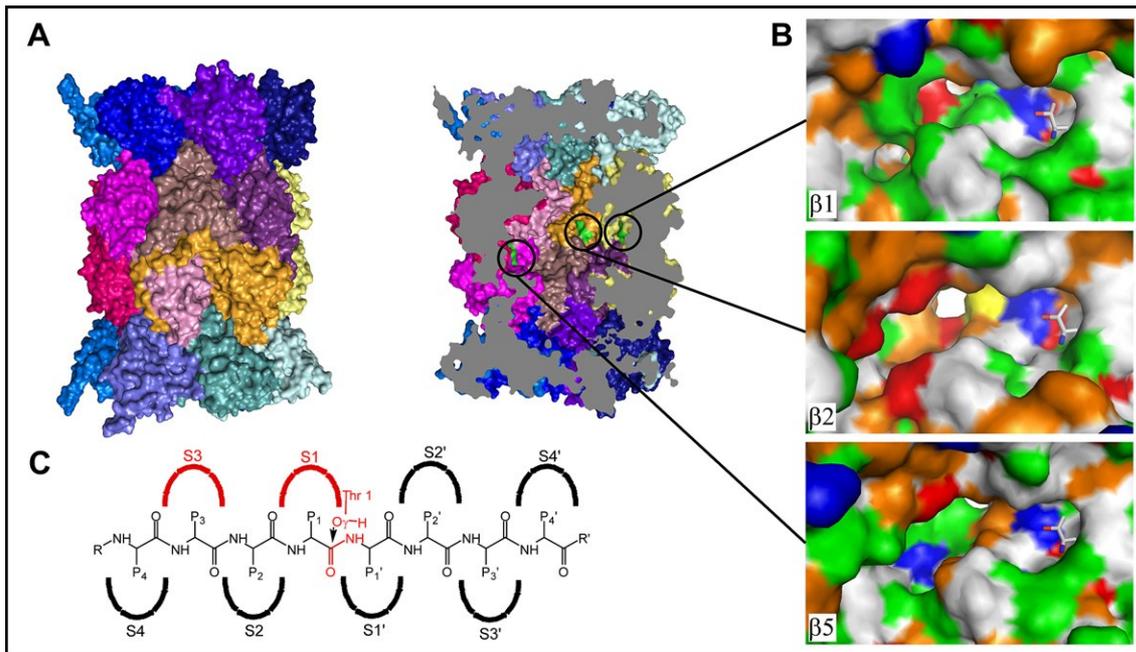


Figura 4. Localizzazione dei siti proteolitici e meccanismo catalitico del proteasoma.

Il “core” catalitico 20S si può associare con dei regolatori che hanno il ruolo di riconoscere i substrati e mediarne l’ingresso nella camera

proteolitica.

Il regolatore 19S (890 KDa), detto anche PA700 si posiziona in modo ATP dipendente in testa e/o coda al proteasoma a formare un coperchio. Si possono ottenere così due tipi di strutture; una costituita da 19S-20S-19S chiamata 26S e l'altra "single-capped" composta da 19S-20S.

Non si sa quale delle due sia più importante nel processo degradativo **(figura 5)**.

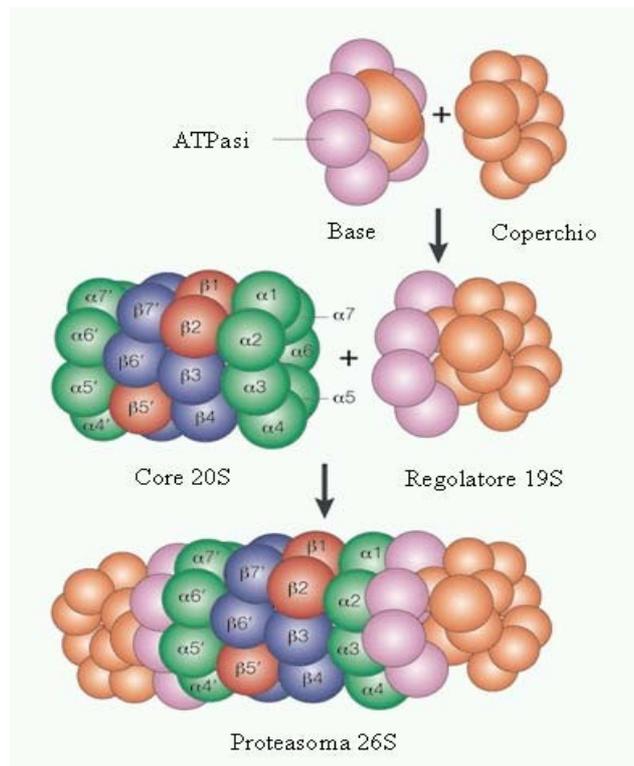


Figura 5. Il core 20S si associa ai regolatori 19S dando origine al proteasoma 26S.

I complessi 19S, presi singolarmente, sono strutture rigide; tuttavia è stato osservato che, pur rimanendo legati al 20S, hanno una certa flessibilità nello spazio. Ogni 19S è formato da una base e da un coperchio. La base è composta a sua volta da 8 subunità: 2 subunità di grandi dimensioni e 6 ATPasi che si assemblano a formare un anello che trova localizzazione all'interfaccia tra il 19S e il 20S.

Queste subunità svolgono diverse funzioni, prima tra tutte è

l'assemblaggio ATP-dipendente del complesso 19S al 20S. Ad assemblaggio avvenuto, le subunità della base regolano altri tipi di eventi: controllano lo stato di apertura del canale centrale del proteasoma e l'accessibilità alla camera proteolitica. Inoltre, grazie ad una attività di "unfolding", contribuiscono a far perdere alle proteine la conformazione tridimensionale, così da renderle lineari, facilitandone l'ingresso. Il coperchio è formato anch'esso da 8 subunità di cui solo una non ha omologia di sequenza con le altre proteine del complesso. Questa struttura risulta necessaria per la degradazione di proteine ubiquitinate. Infatti, il coperchio riconosce e lega la catena di poli-ubiquitina con elevata affinità permettendo così il corretto riconoscimento delle proteine target. La durata dell'interazione tra proteina ubiquitinata e coperchio è proporzionale alle dimensioni del "grappolo" di ubiquitina, fenomeno che esercita un controllo sul destino della proteina ubiquitinata: interazioni brevi, quindi grappoli piccoli, non sono sufficienti per destinare la proteina alla degradazione mentre interazioni più durature ("grappoli" grandi) innescano il processo di degradazione. Inoltre, alcune subunità del coperchio appartengono alla famiglia degli enzimi de-ubiquitinanti e hanno la capacità di staccare le molecole di ubiquitina dalle proteine bersaglio.

Un altro regolatore del proteasoma è il complesso 11S (chiamato anche PA28). È un complesso eterodimerico composto da tre paia alternate di subunità α e β differenti ma correlate tra loro, assemblate in una struttura di 200 kDa di forma conica cava con un diametro interno di circa 300 nm **(figura 6)**.

Come il complesso 19S, l'11S può associarsi ad una o ad entrambe le estremità del proteasoma 20S, ma non è richiesto ATP (*immunoproteasoma*). La presenza di 11S favorisce l'uscita dei prodotti (peptidi) dalla camera proteolitica. Inoltre, il regolatore 11S stimola e modula la capacità degradativa del proteasoma che genera, con efficienza maggiore, peptidi diversi. Questo regolatore sembra essere cruciale nella generazione dei peptidi che legano le molecole di MHC-I.

La sua espressione è infatti regolata dall'interferone- γ (IFN- γ) suggerendo un suo coinvolgimento nel meccanismo di generazione di epitopi

immunogenici.

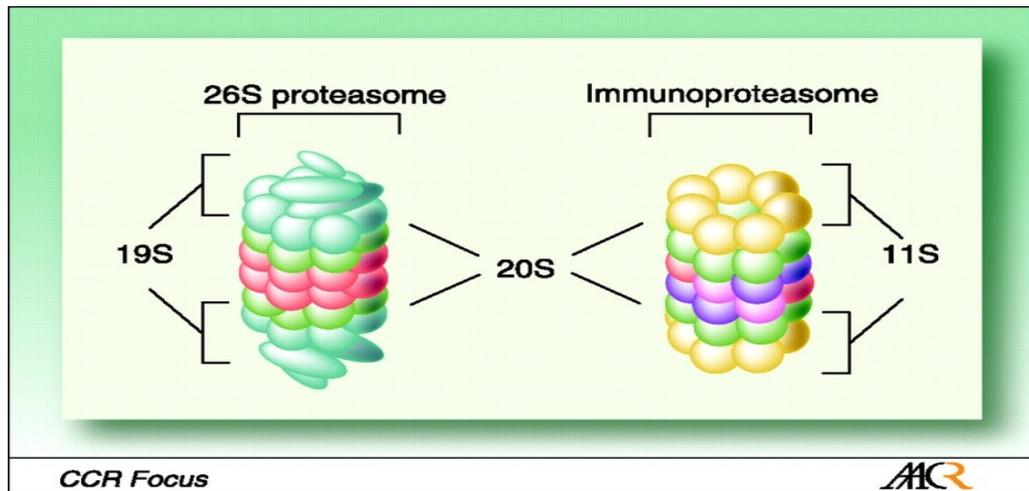


Figura 6. Rappresentazione schematica del proteasoma 26S.

A sinistra: core 20S associato ai regolatori 19S.

A destra: core 20S associato ai regolatori 11S.

INIBITORI DEL PROTEASOMA

Gli inibitori rappresentano un valido strumento nello studio della via degradativa ubiquitina-proteasoma, nel definire il ruolo dell'enzima nei processi biologici, nonché nell'individuazione dei possibili substrati biologici. Poiché questa via è di importanza primaria nell'omeostasi cellulare, l'utilizzo di inibitori porta a variazioni notevoli delle funzioni cellulari da essa regolate. Lo studio in quest'ambito si è rivolto inizialmente a molecole naturali o sintetiche già note per la loro capacità di inibire altre proteasi.

Le principali conseguenze dovute all'azione degli inibitori del proteasoma sono ovviamente dovute alla riduzione della degradazione proteica; che comporta l'accumulo di proteine ubiquitinate, destrutturate o malfunzionanti nell'ambiente cellulare, con possibilità di produrre condizioni tossiche per la cellula.

Iniziali studi dimostrarono che gli inibitori del proteasoma potevano indurre apoptosi in linee cellulari leucemiche, successivamente si dimostrò che l'inibizione del complesso multicatalitico produceva un ampio spettro di attività anti-proliferativa e pro-apoptotica nei confronti di tumori solidi ed ematologici. Questi riscontri che profilavano un potenziale utilizzo degli inibitori del proteasoma quali agenti anti cancro contribuì allo sviluppo di nuove molecole sempre più potenti e selettive. In alcune linee cellulari la stabilizzazione (derivante appunto da una ridotta attività proteolitica) del fattore p53 (protein tumor suppressor) può indurre apoptosi. Tale capacità, unita alle attività antiangiogenica ed antiproliferativa, fa degli inibitori del proteasoma potenziali farmaci antitumorali (**Figura 7**).

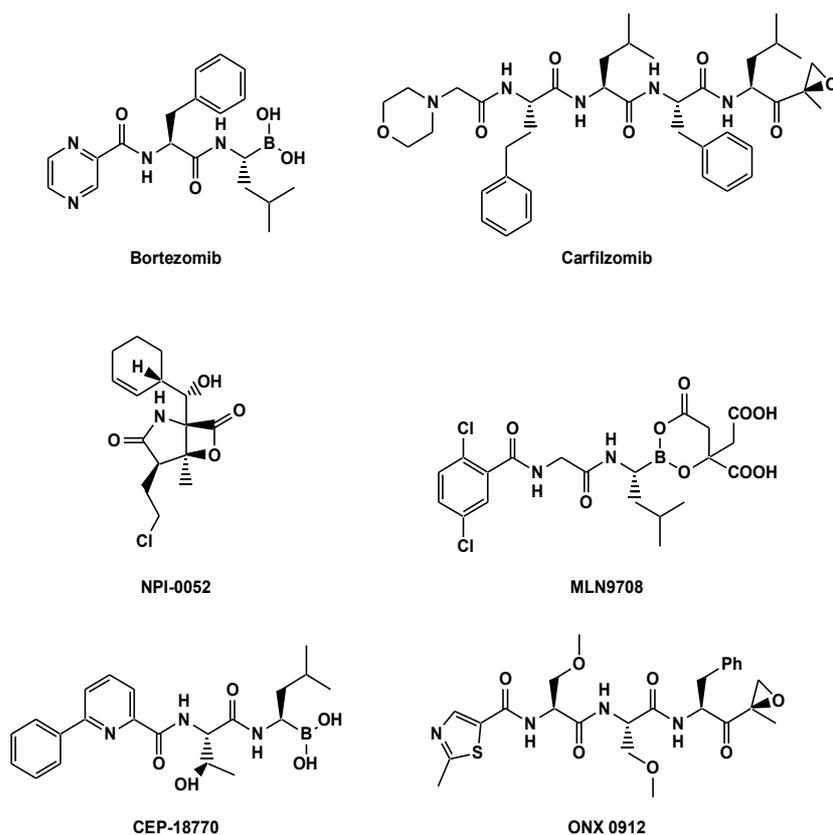


Figura 7. Inibitori del proteasoma ad attività antineoplastica.

Molto importante è il coinvolgimento del proteasoma nella modulazione del fattore di trascrizione NFκB che, nella forma inattivata, è legato al suo inibitore IκB. L'ubiquitinazione e la conseguente proteolisi di IκB, libera NFκB, che trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione di citochine, chemochine, fattori proliferativi, antiapoptotici e angiogenetici. Per questo è ben intuibile come gli inibitori del proteasoma, oltre alla potenziale attività antitumorale, possano essere candidati per la terapia di patologie legate all'infiammazione come infiammazioni croniche, ischemie, artrite reumatoide, asma e, in generale, tutte le patologie in cui il processo infiammatorio può giocare un ruolo importante (Alzheimer, morbo di Crohn, tiroiditi, ecc). Inoltre, molto importante è il ruolo svolto dal proteasoma nella modulazione della risposta immunitaria; esso è infatti responsabile della produzione di epitopi immunogenici presentabili da parte degli MHC-I. L'utilizzo di inibitori potrebbe quindi essere utile, non

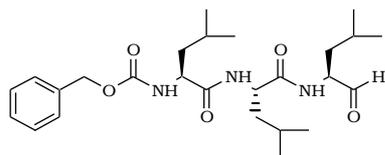
solo per il trattamento di infezione virali, ma anche per quello di patologie autoimmuni come la sclerosi multipla.

Per ogni subunità catalitica β , l'ossidrile treoninico N-terminale rappresenta la funzione nucleofila che permette la proteolisi. Gli inibitori del proteasoma 20S possono essere composti naturali e di sintesi in cui è presente un gruppo funzionale in grado di subire un attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile della treonina catalitica. La variabilità strutturale e farmacoforica sono oggetto di grande interesse per lo sviluppo di nuovi composti.

Va ricordato che l'utilizzo prolungato di inibitori del proteasoma, per motivi legati alla plasticità cellulare, portano ad adattamento da parte della cellula stessa; questa infatti tende a compensare il blocco della via ubiquitina-proteasoma utilizzando altre vie proteolitiche.

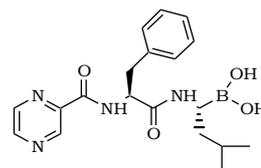
La ricerca è rivolta con maggior slancio allo studio di composti in grado di contrastare l'attività chimotriptica, ritenuta la più importante perché associata alla sopravvivenza delle cellule tumorali e quindi considerata il primo importante bersaglio per lo sviluppo di farmaci antineoplastici. La classificazione degli inibitori viene effettuata su basi chimiche in funzione della struttura del farmacoforo (il gruppo responsabile dell'interazione con la treonina enzima) e per il loro meccanismo d'azione ⁷.

In **Figura 8 e 9** sono presentate le principali classi di inibitori, distinti in covalenti e non covalenti in base al legame formato con il complesso catalitico. Questa distinzione risulta importante per un'eventuale applicazione terapeutica, in particolare per quanto concerne gli effetti collaterali associati al loro utilizzo.



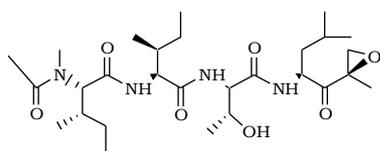
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)

Peptidi aldeidici



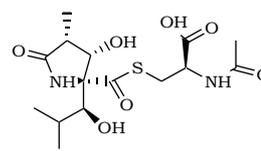
Bortezomib

Peptidi boronici



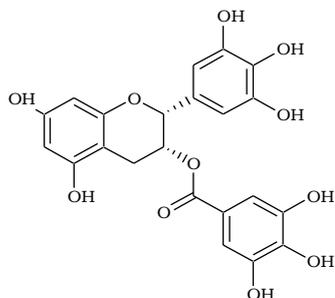
Eposomicina (Ac(Me)-Ile-Ile-Thr-Leu-EX)

Peptidi epossichetonici



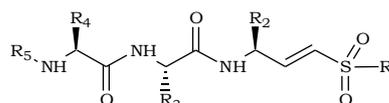
Lactacistina

Beta-lattami e derivati



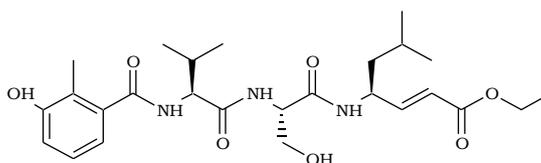
(-)-EGCG

Polifenoli



Struttura generale

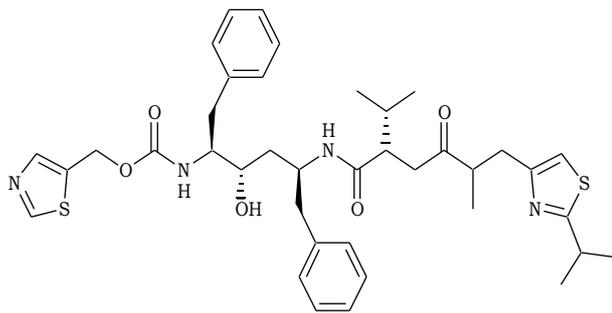
Peptidi vinil solfonici



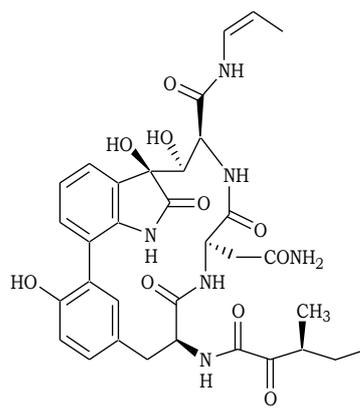
HMB-Val-Ser-Leu-VE

Peptidi vinil esterei

Figura 8. Inibitori covalenti

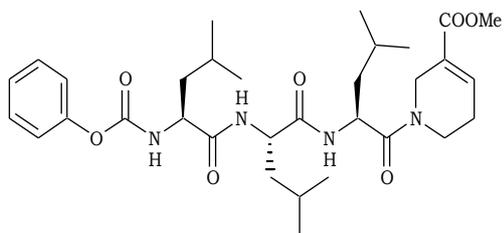


Ritonavir

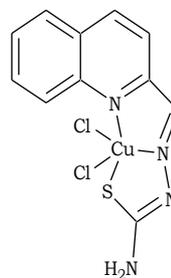


TMC-95A

Peptidi ciclici



Pseudopeptidi arecolinici



Complessi organometallici

Figura 9. Inibitori non covalenti

SCOPO DELLA TESI

La via metabolica ubiquitina-proteasoma (UPS) è implicata nella degradazione della maggior parte delle proteine cellulari, svolgendo un ruolo chiave in moltissimi processi regolatori dell'organismo. L'azione catalitica del proteasoma promuove diverse vie di regolazione intracellulari. L'attività chimotriptica della subunità $\beta 5$, sembra essere coinvolta soprattutto nella regolazione del ciclo cellulare; quella triptica, di cui è responsabile la subunità $\beta 2$, sembra invece implicata maggiormente nella processazione di epitopi antigenici. Infine, per l'attività post-acidica, non sono ancora ben note le vie di regolazione in cui è coinvolta.

Ne consegue che inibitori selettivi per la subunità $\beta 5$ possono funzionare da agenti antitumorali, mentre i $\beta 2$ -selettivi potrebbero trovare impiego nel trattamento di patologie che interessano il sistema immunitario.

Gli inibitori del sistema ubiquitina-proteasoma si possono suddividere in composti naturali e di sintesi. Strutturalmente gli inibitori sintetici sono più omogenei; generalmente si tratta di molecole a base peptidica che presentano al C-terminale il farmacoforo responsabile del legame con le treonine catalitiche. La componente peptidica, invece, dà specificità al composto attraverso interazioni secondarie con i siti presenti nell'intorno del residuo catalitico. La maggior parte dei composti disponibili, hanno attività inibitoria riferita soprattutto alla catalisi chimotriptica ma mantengono anche una residua capacità di blocco parziale delle altre due attività.

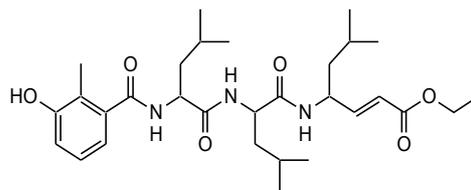
Attualmente la ricerca è essenzialmente rivolta allo sviluppo di molecole con attività selettiva nei confronti delle singole subunità del proteasoma.

Mediante tecniche di sintesi riconducibili alla chimica combinatoriale, ad esempio, sono state riportate modifiche della catena peptidica dell'epossomicina che hanno prodotto derivati molto potenti e specifici per il sito chimotriptico; analogamente nuovi composti aldeidici sono risultati estremamente selettivi per l'attività triptica così come analoghi vinil solfonici. Alcuni nuovi derivati epossichetonici sono risultati in grado di

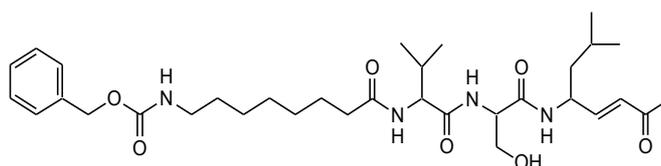
inibire essenzialmente l'attività post-acidica anche se non sono chiare le conseguenze fisiologiche derivanti dall'inattivazione di questo sito.

In questo ambito il nostro interesse si è rivolto allo sviluppo di nuove molecole a struttura pseudopeptidica, recanti diverse unità farmacoforiche nella posizione C-terminale. In particolare è stata sviluppata una classe di composti selettivi per la subunità triptica e attivi già a concentrazione nM aventi una funzionalità vinil esterea in grado di accettare l'ossidrile catalitico della subunità $\beta 2$ subendo un'addizione di Michael con meccanismo simile ai noti analoghi vinil solfonici)⁸⁻¹¹. Questi composti hanno dimostrato di poter modulare la processazione di peptidi antigenici senza alterare i meccanismi di proliferazione cellulare. Sono inoltre risultati stabili alla proteolisi plasmatica, permeano facilmente la membrana cellulare e sono pressoché privi di tossicità. Studi cristallografici ai raggi X e di modellistica molecolare hanno evidenziato generalmente una struttura disordinata peculiare di molecole con molti gradi di libertà conformazionale.

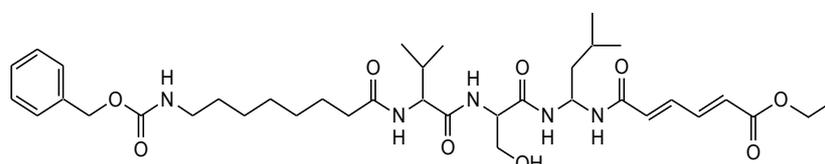
Altri composti sempre di natura pseudopeptidica, recanti nuove unità farmacoforiche potenzialmente in grado di funzionare quali substrati della treonina catalitica sono stati progettati e sintetizzati. In figura sono riportate le strutture delle molecole che hanno fornito la risposta biologica più interessante.



HMB-Leu-Leu-Leu-VE



Z-NH-(CH₂)₇-CO-Val-Ser-Leu-VK



Z-NH-(CH₂)₇-CO-Val-Ser-Leu-NHCO-CH=CH-CH=CH-COOEt

Figura 10. Serie precedenti di inibitori del proteasoma.

Serie issosazolin, vinil esterea ¹²

In base a queste ultime evidenze, nella prima parte del mio periodo di dottorato, mi sono occupata della progettazione e sintesi di nuovi inibitori del complesso enzimatico aventi la struttura generale sotto riportata (**Figura 11**), dove tra la funzionalità vinil esterea C-terminale e la catena oligopeptidica è stato inserito un ciclo issosazolinico con l'intento di favorire l'attacco nucleofilo della treonina catalitica, aumentando la coniugazione dell'unità farmacoforica. Questo evento rappresenta lo stadio primario ed essenziale per un'efficace inibizione.

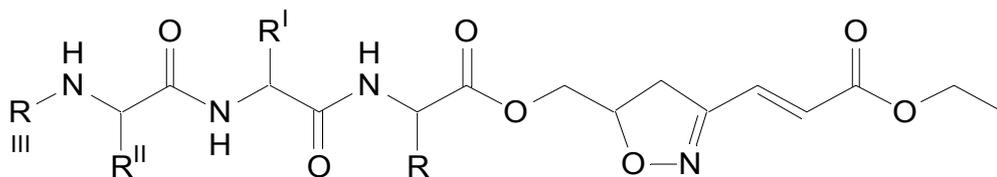


Figura 11. Struttura generale dei nuovi inibitori.

Molecole con coniugazioni estese come i calconi (1,3 difenilpropen-1-oni) avevano mostrato capacità antiproliferativa ed antiangiogenica. Funzioni di questo tipo presenti in composti naturali appartenenti alla famiglia dei flavonoidi consente a questi derivati di essere promettenti strumenti per il trattamento di patologie neoplastiche¹³⁻¹⁴. Inoltre derivati boronici recanti una struttura a base calconica hanno mostrato capacità di inibire il complesso enzimatico¹⁵.

In un nostro lavoro precedente si era sviluppata una serie di analoghi aventi struttura generale a simmetria C2 progettati in base a risultati presentati da altri ricercatori (**figura 12a**).

Malgrado l'estesa coniugazione la risposta biologica si è rivelata poco soddisfacente, indice di una interazione poco efficace con i siti catalitici del complesso enzimatico. I composti presentati in questa Tesi hanno invece una struttura più canonica, con il farmacoforo C-terminale legato ad oligosequenze amminoacidiche (**figura 12b**).

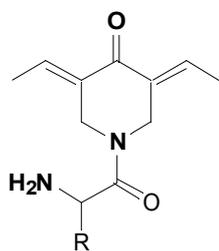
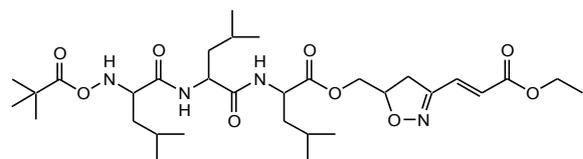
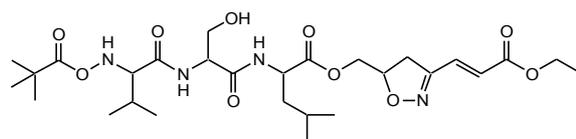


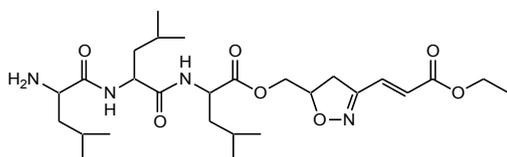
Figura 12a. Strutture generale dei calconi.



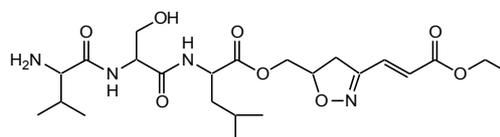
composto 1



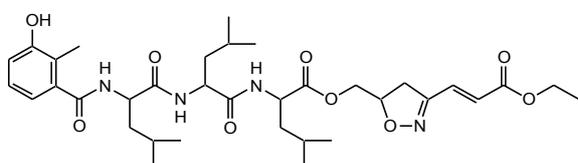
composto 6



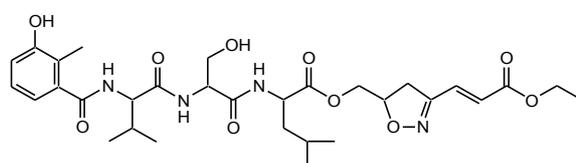
composto 2



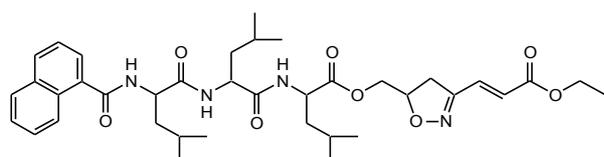
composto 7



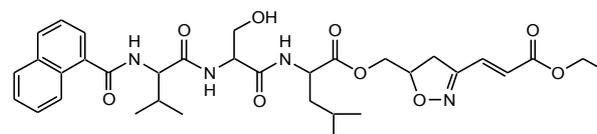
composto 3



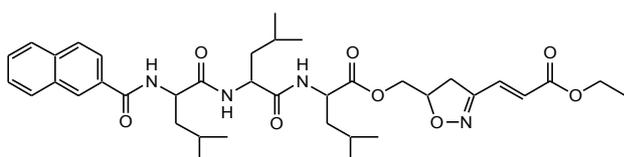
composto 8



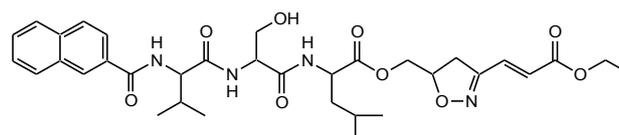
composto 4



composto 9



composto 5



composto 10

Figura 12b. Strutture dei derivati isossazolin vinil esterei.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

La preparazione dei nuovi composti pseudotripeptidici isossazolin vinil esterei **1-10** è stata effettuata seguendo gli **schemi 1 e 2**. La strategia seguita è quella che ha permesso di ottenere tutti i derivati voluti con il minor numero di passaggi sintetici e con le rese migliori.

Nello schema 1 è riportata la procedura utilizzata per la preparazione dell'intermedio necessario ad ottenere il raggruppamento farmacoforico direttamente legato al carbossile della leucina N-protetta.

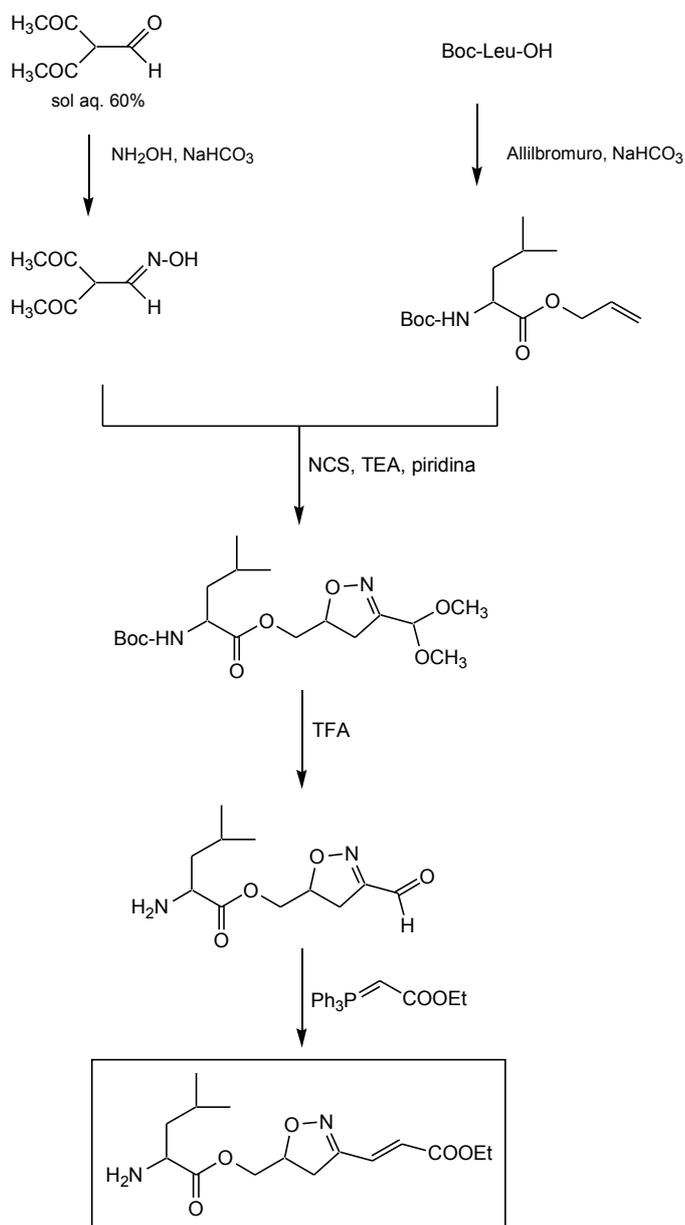
Lo stadio sintetico caratterizzante è rappresentato dalla reazione di cicloaddizione tra l'ossima e l'estere allilico della leucina protetta, con l'ausilio di N-clorosuccinimide (NCS), trietilamina (TEA) e piperidina. L'ossima viene ottenuta per reazione tra dimetossi-acetaldeide, idrossilammina ed NaHCO_3 . La leucina allil estere a sua volta è preparata a partire da Boc-Leu-OH per reazione con allilbromuro in presenza di NaHCO_3 .

L'intermedio I acetalico viene trattato con TFA ottenendo la contemporanea rimozione del gruppo protettore uretanico ed il ripristino della funzionalità aldeidica. Lo step successivo prevede una reazione di Wittig in THF anidro tra l'aldeide ottenuta in precedenza ed [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano che porta alla formazione dell'unità isossazolin vinil esterea legata al carbossile della leucina.

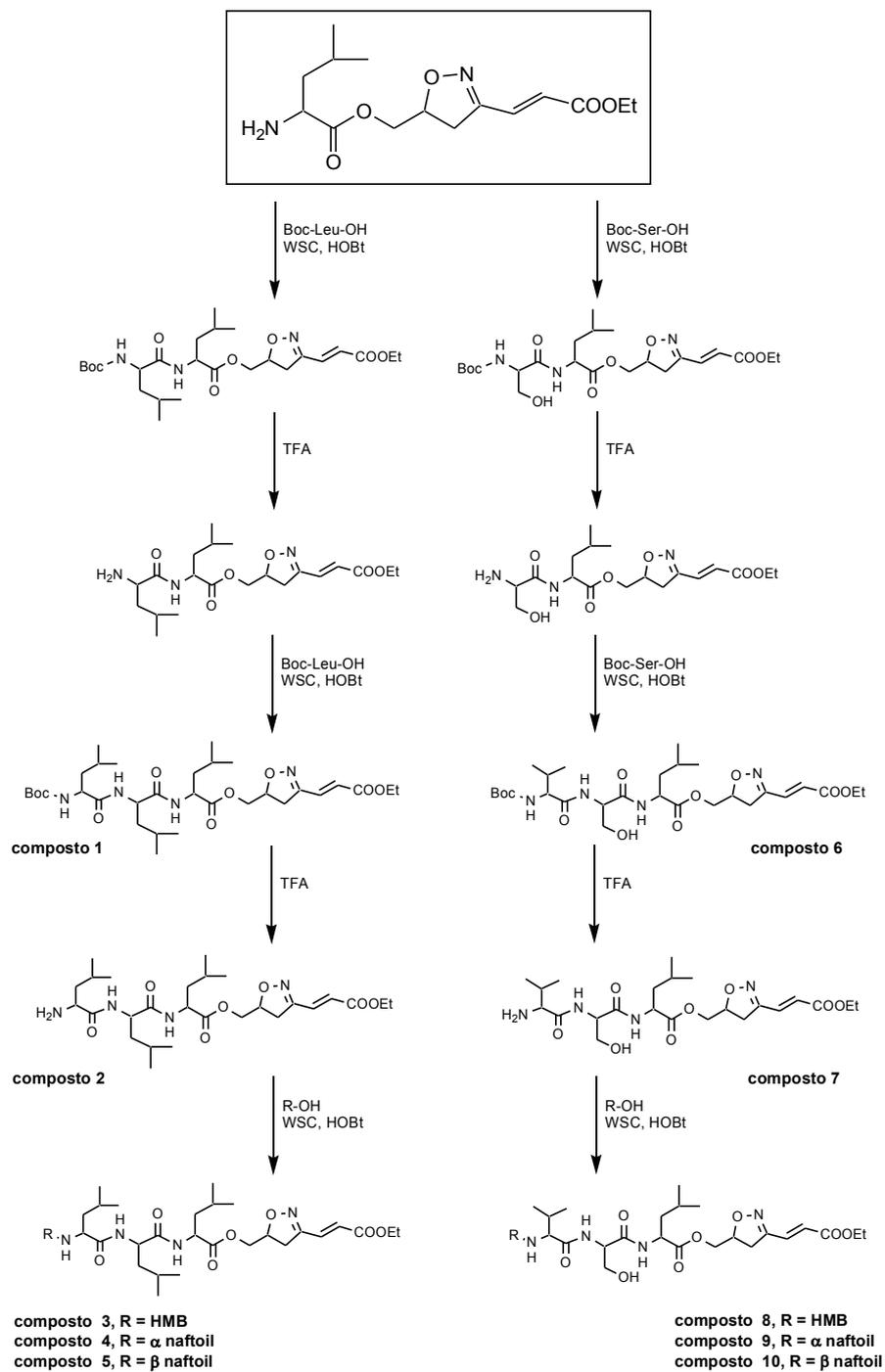
Da questo intermedio chiave, mediante sintesi step by step a partire dal C-terminale abbiamo ottenuto tutti i derivati della serie. Le condensazioni degli aminoacidi Boc-protetti sono state effettuate mediante l'utilizzo di agenti condensanti WSC "1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodimide" ed HOBt "N-idrossibenzotriazolo".

Dopo ogni step di acilazione il Boc viene rimosso con TFA. Anche le funzionalizzazioni N-terminali (HMB, α -naftoil, β -naftoil) sono state

condensate sempre via WSC/HOBt. Di tutti i prodotti è stata valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR dopo analisi e purificazione tramite RP-HPLC.



Schema 1: Sintesi dell'unità farmacoforica leucil isossazolin vinil-esterea



Schema 2: Sintesi pdegli seudotripeptidici isossazolin vinil esterei
(composti 1-10)

N° Composto	HPLC	MP	$[\alpha]D^{20}$	MS
-------------	------	----	------------------	----

	T _r (min)	°C	(c=1, MeOH)	M+H ⁺
Inibitore 1	14.76	Olio	-22,0	639,79
Inibitore 2	12.34	Olio	-14,1	539,68
Inibitore 3	13.63	Olio	-20,3	673,81
Inibitore 4	15.17	60-64	-12,0	693,34
Inibitore 5	15.39	72-75	-13,8	693,34
Inibitore 6	12.90	Olio	-19,4	599,69
Inibitore 7	10.02	Olio	-16,7	499,57
Inibitore 8	11.21	Olio	-24,5	633,70
Inibitore 9	13.50	84-88	-21,9	653,73
Inibitore 10	13.90	90-93	-18,5	653,73

Tabella 1. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori.

Isolamento e purificazione del proteasoma

Per questo lavoro, l'enzima è stato isolato e purificato mediante lisi meccanica delle cellule per centrifugazione in presenza del tampone di lisi e di sferette di vetro. L'enzima così isolato è stato utilizzato per valutarne l'azione proteolitica mediante saggi di attività che prevedono l'impiego di substrati fluorogenici specifici per le tre principali attività catalitiche del proteasoma ed anche per determinare la capacità inibitrice delle nuove molecole riferita all'attività di inibitori noti.

Saggi di inibizione enzimatica

Tutti i composti sono stati saggiati quali inibitori del complesso enzimatico isolato secondo le procedure discusse nel precedente paragrafo. Per determinare la capacità inibitoria degli analoghi **1-10** e degli inibitori di riferimento (MG-132, epossomicina), 25 μL di una soluzione del composto in esame a tre diverse concentrazioni (1 μM , 10 μM e 100 μM) sono stati incubati con 25 μL di enzima per 45 min a 37°C. Sono stati aggiunti 50 μL di substrato 0.1 mM specifico per le singole attività catalitiche del proteasoma e dopo 30, 60, 90 e 120 min è stata misurata mediante spettrofluorimetro la fluorescenza data dai metaboliti fluorofori generati dai substrati. Di tutti si è valutata l'inibizione dell'attività chimotriptica, triptica e post-acidica.

In **tabella 2** sono riportati i valori di IC_{50} relativi all'inibizione dopo 60 minuti delle subunità $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ del complesso multi catalitico.

N° Composto	ChT-L $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	T-L $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	PGHP $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
Inibitore 1	>100	>100	>100
Inibitore 2	>100	>100	>100
Inibitore 3	>100	>100	91.6
Inibitore 4	>100	89.5	>100
Inibitore 5	>100	>100	>100
Inibitore 6	>100	>100	>100
Inibitore 7	83.5	>100	>100
Inibitore 8	>100	>100	78.3
Inibitore 9	75.4	>100	83.7
Inibitore 10	53.2	92.4	61.4

Tabella 2. Dati di inibizione dei derivati isossazolin vinil esterei.

L'analisi complessiva dei risultati permette di affermare che generalmente l'attività è poco significativa.

L'inibizione delle subunità post-acidica (PGPH) e chimotriptica (ChT-L) per alcuni derivati è risultata di qualche interesse con valori di IC_{50} compresi tra 50 e 90 μM ; comunque decisamente inferiori ai dati relativi ai noti e

potenti inibitori di riferimento che sono nel range di valori nM specie per quanto concerne l'inibizione dell'attività chimotriptica.

Nei confronti della subunità tripsino-simile localizzata in $\beta 2$ l'attività risulta irrilevante con valori di IC_{50} vicini o superiori a concentrazioni di 100 μM .

I composti della serie risultati più efficaci sono **9** e **10** recanti la sequenza tripeptidica centrale costituita da Val-Ser-Leu e la funzionalizzazione N-terminale rappresentata da un gruppo α - o β - naftoilico rispettivamente.

Una prima analisi del rapporto struttura-attività in base alla risposta biologica fornita dai nuovi derivati tripeptidici isossazolin vinil esterei ci consente di affermare che l'unità farmacoforica C-terminale non rappresenta un raggruppamento elettrofilo in grado di funzionare da ottimale substrato per l'attacco nucleofilo da parte della treonina catalitica. Le interazioni secondarie che stabilizzano il legame inibitore-enzima risultano più efficaci quando la sequenza tripeptidica ha caratteristiche più idrofiliche; in effetti i composti **1-5** con le tre leucine centrali hanno mostrato un'inibizione praticamente non rilevabile per le tre principali attività del complesso enzimatico. Infine i sostituenti N-terminali più favorevoli per la risposta biologica si sono dimostrati i raggruppamenti naftoilici, indicando che in posizione P4 è favorito un gruppo ad elevato ingombro sterico.

Conclusioni

La peculiarità di questi composti è la presenza in posizione C-terminale di un raggruppamento isossazolin vinil estereo quale unità farmacoforica responsabile dell'interazione primaria con le subunità attive dell'enzima.

Con l'estensione della coniugazione nel farmacoforo abbiamo ideato una struttura molecolare che potesse funzionare ipoteticamente in modo più efficace quale substrato per l'attacco nucleofilo dell'ossidrilico in catena laterale della treonina catalitica.

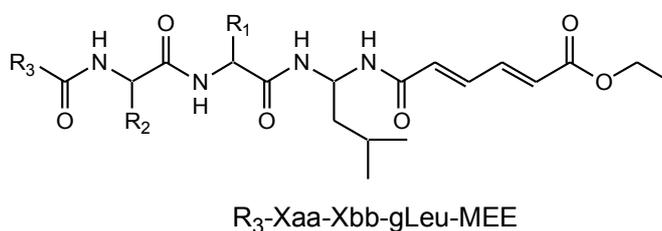
I dati inerenti la risposta biologica di alcuni analoghi componenti questa

nuova serie, hanno evidenziato una capacità di inibizione del proteasoma molto blanda. Solamente alcuni derivati, in particolare i composti **9** e **10**, sono risultati sensibilmente attivi nei confronti delle subunità $\beta 1$ (PGHP) e $\beta 5$ (ChT-L) seppure con una potenza decisamente inferiore rispetto a noti inibitori di riferimento.

In base a questi risultati si può affermare che la nuova unità farmacoforica C-terminale non consente un'efficace interazione primaria con la treonina N-terminale che rappresenta il residuo attivo nelle tre principali tasche catalitiche del complesso enzimatico.

Serie tripeptidica con farmacoforo “etil-estere dell'acido trans-trans muconico”¹⁶

In uno studio precedente era stata prodotta una nuova classe di molecole con legame ammidico C-terminale retroinvertito tra le sequenze tripeptidiche e la potenziale unità farmacoforica con estesa coniugazione costituita dall'ac. *trans,trans*-6-oxo-esa-2,4-dienoico etil estere (MEE).

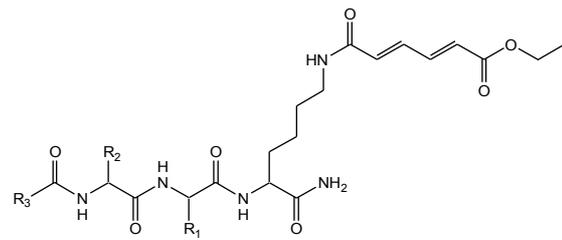


In base ai risultati ottenuti, nel mio periodo di dottorato, ho sintetizzato composti pseudopeptidici strutturalmente correlati alla serie precedente recanti l'acido *trans,trans*-muconico quale farmacoforo inserito in catena laterale di un residuo di lisina, aminoacido C-terminale comune a tutti i nuovi derivati.

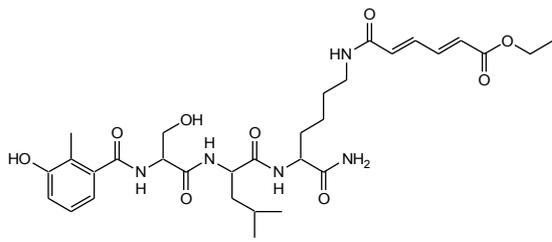
Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare come la diversa disposizione spaziale dell'unità farmacoforica, rispetto alla serie precedente, potesse fornire una migliore interazione con la treonina catalitica. In teoria l'estesa coniugazione del farmaco foro, nella nuova struttura, dovrebbe essere più esposta e quindi maggiormente suscettibile all'attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile in catena laterale della treonina N-terminale dei subsiti attivi del complesso enzimatico.

L'intento è quello di facilitare l'interazione tra enzima ed inibitore e di conseguenza migliorare la risposta biologica.

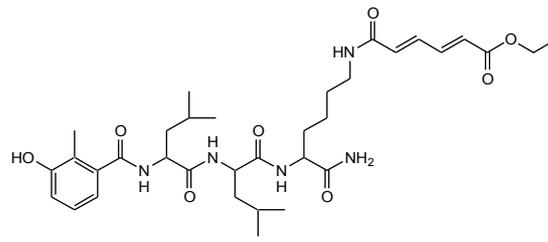
Le strutture dei composti sono riportate in **figura 13**.



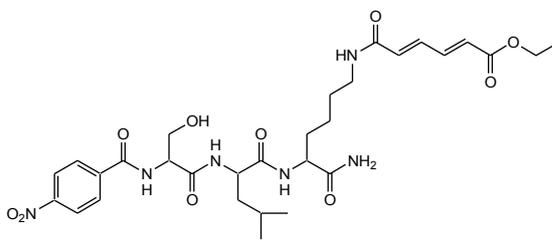
R_3 -Xaa-Xbb-Lys(MEE)-NH₂



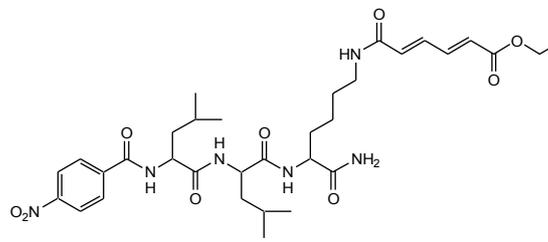
1



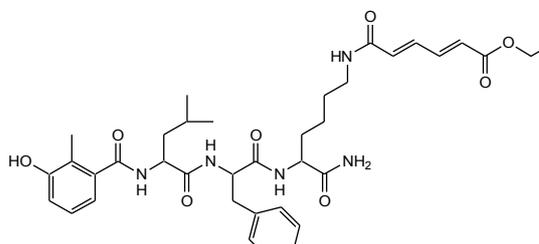
2



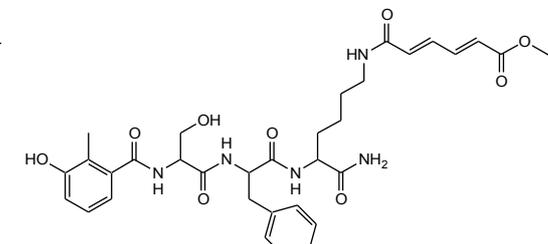
3



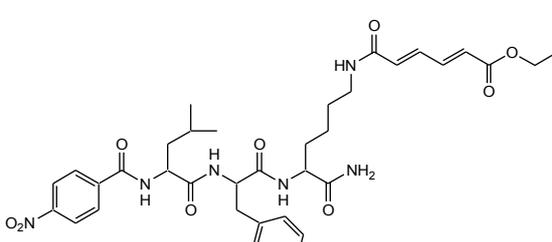
4



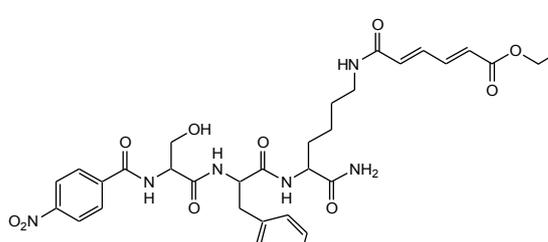
5



6



7



8

Figura 13. Struttura generale e strutture dei derivati **1-8**.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

La preparazione dei derivati pseudotripeptidici funzionalizzati con la nuova unità farmacoforica, costituita dal raggruppamento *trans,trans*-muconico etil estereo, ha previsto un approccio sintetico misto. Le sequenze tripeptidiche sono state costruite in fase solida mentre la condensazione finale del farmacoforo in catena laterale della lisina è avvenuta in soluzione.

Nello **schema 3** è riportata la strategia sintetica seguita.

La resina rink-amidica è stata il supporto solido utilizzato, costituita da una matrice polistirenica funzionalizzata con un linker 5-(4'-aminometil-3',5'-dimetossifenossi)valeroilico, recante il gruppo 9-fluorenil-metossi-carbonilico (Fmoc) legato alla funzionalità aminica. La metodica utilizzata per la sintesi in fase solida dei substrati tripeptidici è riconducibile alla chimica Fmoc/tBu. Dopo rimozione dello Fmoc al supporto solido, le condensazioni dei residui sono state effettuate a partire dal C-terminale mediante attivazione della funzionalità carbossilica via estere attivi, utilizzando WSC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide) ed HOBt (N-idrossibenzotriazolo) quali agenti condensanti. Dopo ogni step di acilazione, il gruppo protettore della funzionalità α -aminica viene rimosso mediante piperidina. Le protezioni delle catene laterali sono di tipo *tert*-butilico ed in particolare Boc per la lisina e *tert*-butil etere per la serina.

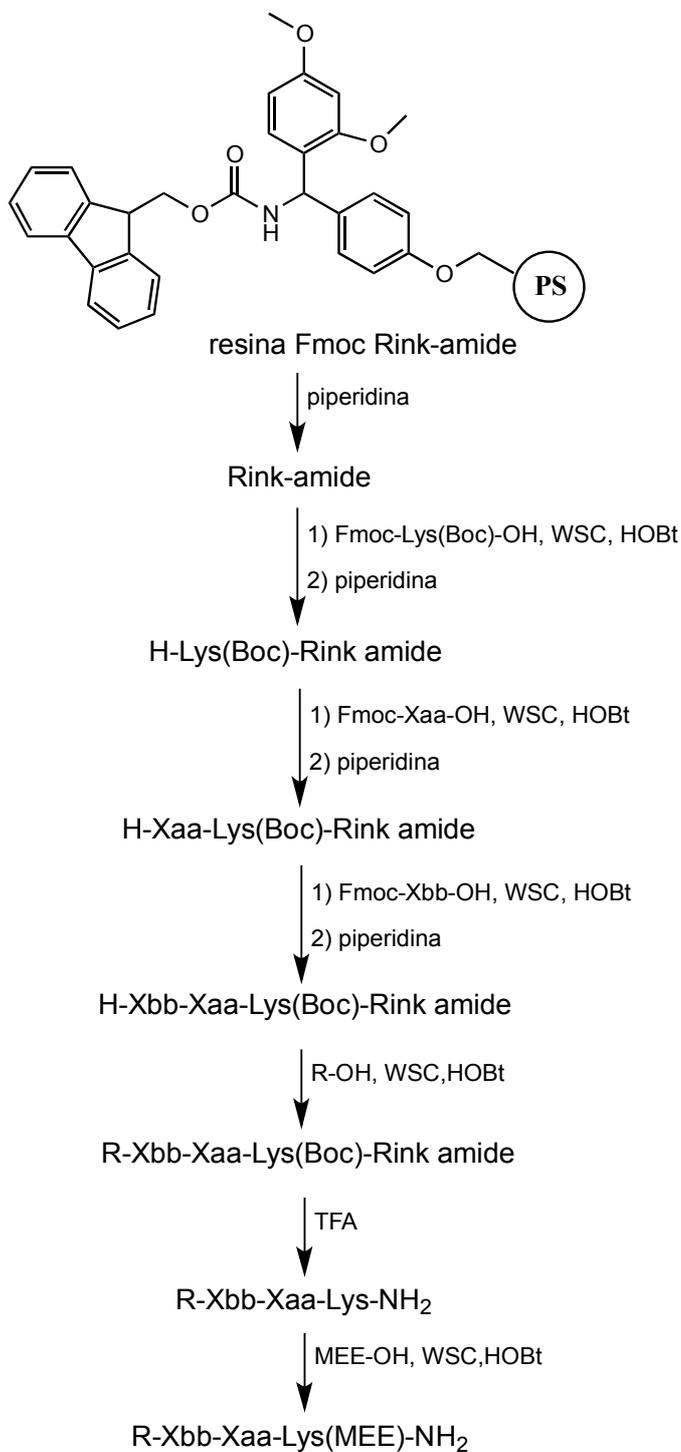
Le funzionalizzazioni N-terminali mediante acido 3-idrossi-2-metil benzoico (HMB) e con acido p-nitro benzoico (pNBz) sono state effettuate sempre via WSC/HOBt.

Le catene assemblate su supporto solido sono state rimosse con contemporaneo ripristino delle funzionalità laterali mediante trattamento acido per TFA (ac. trifluoroacetico) in presenza di opportuni scavengers.

I composti finali sono stati ottenuti per acilazione del gruppo aminico in ϵ della lisina con acido *trans,trans*-muconico etil estere ancora in presenza

di WSC/HOBt.

Dopo purificazione dei composti **1-8** tramite RP-HPLC preparativo, si è valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR. Le caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi composti sono riportate in **Tabella 3**.



trans,trans-muconil pseudotripeptidi **1-8**

Xaa= Leu, Phe; Xbb=Ser, Leu; R=HMB-OH, pNBz-OH

Schema 3. Preparazione dei derivati MEE pseudotripeptidici **1-8**.

N° Composto	HPLC	MP	[α]D ²⁰	MS
	T _r (min)	°C	(c=1, MeOH)	M+H ⁺
1. Hmb-Ser-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	27.06	135-139	-7.2	632.45
2. Hmb-Leu-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	29.83	132-136	-12.4	658.53
3. pNBz-Ser-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	32.87	147-151	-8.9	646.45
4. pNBz-Leu-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	35.54	139-143	-10.5	672.53
5. Hmb-Leu-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	32.61	133-137	-18.6	692.55
6. Hmb-Ser-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	29.80	146-150	-16.2	666.47
7. pNBz-Leu-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	37.89	129-132	-9.3	707.45
8. pNBz-Ser-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	33.41	130-134	-16.8	681.47

Tabella 3. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei nuovi inibitori **1-8**.

Isolamento e purificazione del proteasoma

Come descritto in precedenza, l'enzima è stato isolato e purificato mediante lisi meccanica delle cellule per centrifugazione in presenza del tampone di lisi e di sfere di vetro. L'enzima, così isolato, è stato utilizzato per valutarne l'azione proteolitica mediante saggi di attività che prevedono l'impiego di substrati fluorogenici specifici per le tre principali attività catalitiche del proteasoma ed anche per determinare la capacità inibitrice delle nuove molecole riferita all'attività di inibitori noti.

Saggi di inibizione enzimatica

Tutti i composti sono stati saggiati quali inibitori del complesso enzimatico

isolato secondo le procedure riportate in precedenza.

In **tabella 4** sono riportati i valori di IC₅₀ risultanti da una media di tre saggi, relativi alle inibizioni delle subunità β2, β5 e β1 prodotte dai nuovi composti dopo 90 min.

N° Composto	Enzima Isolato		
	IC ₅₀ (μM)		
	T-L	ChT-L	PGPH
1. Hmb-Ser-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	>100	> 100	>100
2. Hmb-Leu-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	93±8.9	22±1.9
3. pNBz-Ser-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	> 100
4. pNBz-Leu-Leu-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	> 100
5. Hmb-Leu-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	35±3.1
6. Hmb-Ser-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	> 100
7. pNBz-Leu-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	> 100
8. pNBz-Ser-Phe-Lys-(MEE)-NH ₂	> 100	> 100	87±9.2

Tabella 4. Valori di IC₅₀ degli inibitori di riferimento e della serie 1-8.

Da un'analisi generale del profilo biologico della nuova classe di derivati si evince che la nuova unità farmacoforica costituita dall'etil estere dell'acido *trans,trans*-muconico, introdotta in catena laterale della lisina, aminoacido C-terminale della sequenza tripeptidica, non costituisce un raggruppamento favorevole per l'interazione con la treonina catalitica. Benché le caratteristiche elettrofiliche del farmacoforo appaiano suscettibili all'attacco nucleofilo del γ-ossidrilico della treonina enzimatica, risulta evidente la prevalenza di aspetti conformazionali non adeguati ad un'ottimale interazione enzima-inibitore.

Tutti gli analoghi presentano una IC₅₀ superiore a 100 μM per quanto concerne l'inibizione dell'attività triptica situata nella subunità β2 del complesso multicatalitico. Solamente l'analogo **2** mostra una blanda attività nei confronti della subunità β5 responsabile dell'azione chimotriptica. Risultati più confortanti si sono ottenuti per l'inibizione

della subunità $\beta 1$ post-acidica con alcuni derivati che presentano valori di IC_{50} tra 20 e 90 μM . In particolare i composti più attivi sono risultati gli analoghi **2** e **5** con, rispettivamente, una inibizione pari a 22 e 35 μM .

Da un'analisi del rapporto struttura-attività risulta che per l'interazione con la tasca catalitica situata nella subunità $\beta 1$ del proteasoma, le sequenze dipeptidiche più favorevoli risultano Leu-Leu e Leu-Phe, con caratteristiche idrofobiche. La funzionalizzazione N-terminale preferita sembra essere quella ottenuta mediante acido 3-idrossi-2-metil benzoico teoricamente posto in posizione P4.

Conclusioni

Dall'analisi di questi dati si può affermare che i nuovi derivati non costituiscono un substrato favorevole per l'interazione primaria tra farmacoforo MEE e treonina catalitica ed una certa incidenza sulla capacità inibitrice deriva unicamente dalle interazioni secondarie con la tasca catalitica ottenute con determinate sequenze tripeptidiche N-funzionalizzate.

Derivati dipeptidici naftochinonici ¹⁷

Ho proseguito il mio dottorato, occupandomi dello sviluppo di una nuova serie di derivati a base dipeptidica recanti in posizione C-terminale un'unità farmacoforica identificata dal raggruppamento 2-cloronaftochinonico. Il gruppo naftochinonico è presente in diverse molecole dotate di attività biologica: è infatti possibile ritrovarlo nella struttura molecolare di potenti agenti antidiabetici e di inibitori di proteintirosin fosfatasi¹⁸⁻²⁰. Recentemente, mediante screening di librerie, sono stati individuati composti recanti l'unità 2-cloronaftochinonica, in grado di esprimere, in test in vitro e in vivo, una buona inibizione nei confronti dell'attività chimotriptica (CT-L) del proteasoma ed azione selettiva per cellule maligne. La struttura del derivato prototipo visibile in figura 13 presenta struttura non peptidica in cui lo scaffold naftochinonico è legato

a un raggruppamento 4-amino-N-piridin-2-il-benzensolfonamidico (a). Nella **figura 14** è schematizzata la struttura generale sulla cui base sono stati sviluppati composti analoghi, il cui studio ha portato a derivati, sempre non peptidici, più potenti del prototipo iniziale (b)²¹⁻²³.

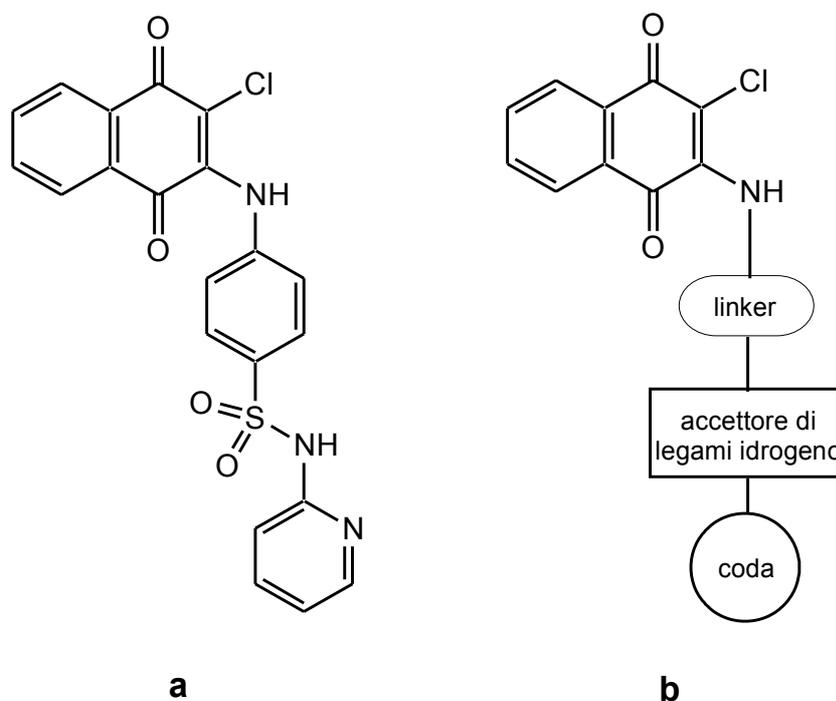


Figura 14. a) prototipo iniziale; b) struttura generale dei derivati

Sulla base di questi studi sono stati progettati composti pseudopeptidici aventi la struttura generale riportata in **figura 15**. Il gruppo 2-cloro naftochinonico(CINafQ) che rappresenta l'unità farmacoforica in grado di funzionare quale potenziale substrato elettrofilo per la treonina catalitica, si trova in posizione C-terminale di sequenze dipeptidiche. Il legame tra la porzione peptidica ed il farmacoforo viene ottenuto mediante uno spaziatore costituito dall'etilendiammina, mentre l'estremità N-terminale è funzionalizzata con opportuni raggruppamenti aventi diverse caratteristiche elettroniche e steriche (t-butossicarbonile, 2-metil-3-idrossibenzoile e p-nitrobenzoile).

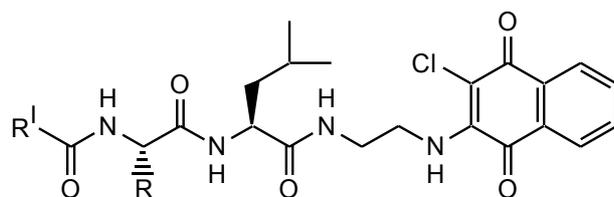


Figura 15. Struttura generale dei derivati dipeptidici naftochinonici

Le sequenze dipeptidiche centrali hanno la posizione 2 costante con la presenza di un residuo di leucina, mentre la posizione 1 prevede residui con caratteristiche diverse come serina, fenilalanina, leucina o asparagina. Le strutture dei derivati **1-8** sono riportate in **figura 16**.

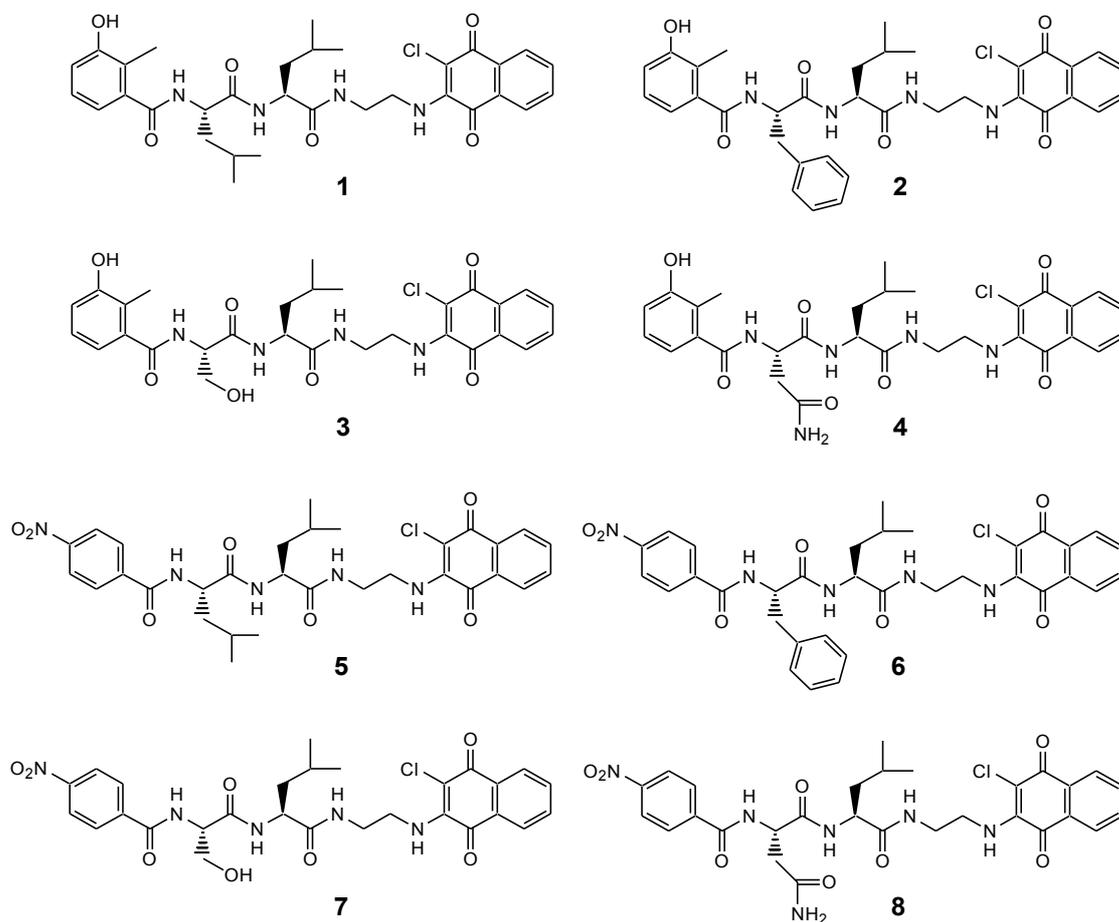
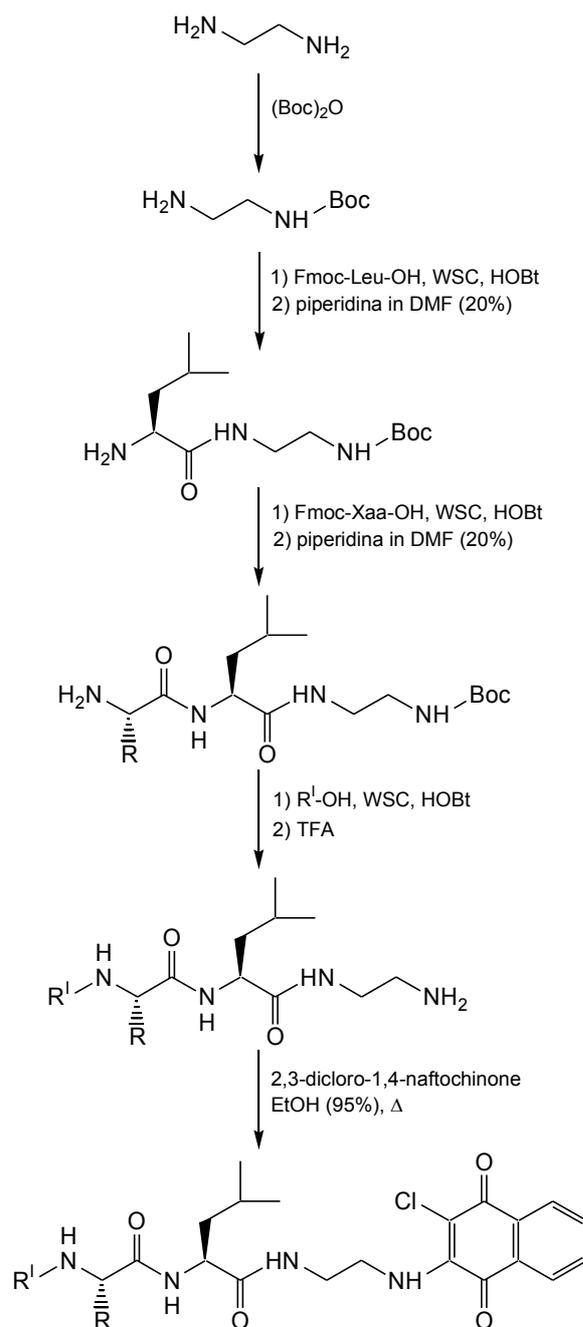


Figura 16. Strutture dei derivati dipeptidici naftochinonici **1-8**.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

La preparazione dei nuovi composti pseudodipeptidici recanti l'unità farmacoforica naftochinonica condensata alla porzione C-terminale mediante uno spaziatore costituito dall'etilendiammina è riportata nello **schema 5**. La strategia sintetica utilizzata è quella che ha permesso di ottenere tutti i composti con il minor numero di steps sintetici. Si tratta di una sintesi in soluzione in cui viene assemblata la sequenza dipeptidica, opportunamente funzionalizzata, all'N-terminale e legata al linker etilendiamminico all'estremità opposta. L'etilendiammina viene monoprotetta su una funzionalità amminica mediante reazione con di-terz-butyl dicarbonato $(\text{Boc})_2\text{O}$. Viene condensata la leucina Fmoc-protetta mediante 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide (WSC) e N-idrossibenzotriazolo (HOBt) quali agenti condensanti, a dare l'intermedio funzionalizzato sull'appropriato linker. Dopo rimozione del gruppo protettore fluorenilmetossicarbonile mediante piperidina, viene completata la sequenza dipeptidica per condensazione dell'opportuno residuo (Leu, Phe, Ser, Asn) Fmoc-protetto, sempre per attivazione della funzionalità carbossilica via WSC/HOBt. Dopo rimozione dello F-moc la funzionalizzazione N-terminale viene effettuata per acilazione dei derivati dipeptidici con acido 2-metil-3-idrossibenzoico o acido p-nitrobenzoico, sempre mediante utilizzo di WSC/OHBt quali agenti condensanti. Dopo rimozione del Boc in ambiente acido per TFA si può procedere alla condensazione della sequenza dipeptidica N-funzionalizzata e legata al linker etilendiamminico, al C-terminale, con 2,3 dicloro naftochinone. La sostituzione sullo scaffold naftochinonico avviene direttamente in EtOH (95%) a riflusso, per una durata media di tre giorni.



Xaa = Leu, Phe, Ser, Asn; R¹ = HMB, Np

Schema 5. Sintesi dei derivati pseudopeptidici naftochinonici **1-8**.

Di tutti i prodotti è stata valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR, dopo analisi e purificazione tramite RP-HPLC. I dati analitici dei nuovi composti pseudopeptidici sono riportati in **tabella 5**.

N° Composto	HPLC	MP	$[\alpha]D^{20}$	MS
	T _r (min)	°C	(c=1, MeOH)	M+H ⁺
1. HMB-Leu-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	18.63	97-102	-23.6	611
2. HMB-Phe-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	19.08	116-121	-16.2	644
3. HMB-Ser-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	9.09	129-132	-18.5	585
4. HMB-Asn-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	6.89	122-126	-20.5	611
5. Np-Leu-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	19.77	92-95	-24.2	625
6. Np-Phe-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	23.44	93-97	-22.03	659
7. Np-Ser-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	19.67	124-128	-18.5	600
8. Np-Asn-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	17.02	106-111	-24.2	626

Tabella 5. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati dipeptidici naftochinonici **1-8**.

I saggi di inibizione sono stati effettuati sul proteosoma isolato secondo le metodiche sperimentali già descritte.

In **tabella 6** sono riportati i valori di IC₅₀ relativi all'inibizione dopo 60 minuti delle subunità β1, β2 e β5 del complesso multi catalitico.

N° Composto	ChT-L	T-L	PGHP
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
Inibitore 1	>100	>100	4.51
Inibitore 2	46.15	91.40	20.29
Inibitore 3	87.24	77.49	25.10
Inibitore 4	34.2	>100	15.82
Inibitore 5	39.40	>100	0.73
Inibitore 6	>100	>100	13.74
Inibitore 7	74.35	93.6	60.28
Inibitore 8	24.79	>100	02.34.00

Tabella 6. Inibizione delle subunità del proteosoma dei derivati dipeptidici naftochinonici 1-8

L'attività riportata a concentrazione μM è il risultato di un saggio di inibizione, e dovrà essere confermata mediante altre prove per confermare la riproducibilità del dato biologico.

L'analisi complessiva dei risultati permette di affermare che il profilo dell'attività biologica dei nuovi derivati naftochinonici presenta valori interessanti.

L'inibizione delle subunità post-acidica (PGPH) e chimotriptica (ChT-L) è generalmente significativa ed, in alcuni casi, si avvicina a concentrazioni dell'ordine nM. In particolare, l'attività nei confronti della subunità $\beta 1$ risulta sensibile per gli analoghi **1**, **5** e **8** con valori di IC_{50} inferiori a noti inibitori quali il derivato aldeidico MG132 e l'epossomicina. Anche la risposta biologica verso l'attività chimotriptica (ChT-L) è risultata di interesse con valori leggermente superiori alla post-acidica per gli stessi composti. In questo caso l'inibizione risulta decisamente inferiore alle molecole di riferimento, potenti e specifiche per la subunità $\beta 5$.

Nei confronti della subunità tripsino-simile localizzata in $\beta 2$ l'attività risulta irrilevante, con valori di IC_{50} vicini o superiori a concentrazioni di 100 μM .

I composti della serie risultati più efficaci sono **5** e **8**, recanti la sequenza dipeptidica centrale costituita rispettivamente da Leu-Leu e Asn-Leu con funzionalizzazione N-terminale costituita dal raggruppamento p-nitrobenzoilico. Una prima analisi del rapporto struttura-attività in base alla risposta biologica fornita dai nuovi derivati dipeptidici naftochinonici ci consente di affermare che l'unità farmacoforica C-terminale si conferma un buon substrato elettrofilo anche in molecole oligopeptidiche in grado di subire l'attacco nucleofilo da parte della treonina catalitica. Le interazioni secondarie che stabilizzano il legame inibitore-enzima risultano più efficaci quando la sequenza dipeptidica ha caratteristiche più idrofobiche, con catena alchilica ramificata (Leu) in posizione P2. Mediamente gli analoghi con il sostituente N-terminale in P4 costituito dal gruppo Np (**5-8**) risultano più attivi dei corrispondenti derivati con il 2-metil-3-idrossibenzoile nella stessa posizione.

Ricordiamo infine che inibitori già in terapia come farmaci antineoplastici hanno un profilo biologico simile a questa nuova serie, con una spiccata attività anti-chimotriptica ed una residua inibizione per la postacidica anche se, per questi derivati naftochinonici a base peptidica, l'attività verso la subunità $\beta 5$ è sensibilmente inferiore.

Questi nuovi composti hanno evidenziato durante i saggi di inibizione una progressiva diminuzione dell'attività nel tempo, riconducibile ad una

interazione reversibile con le tasche catalitiche del proteasoma, inserendo questa nuova classe tra gli inibitori non covalenti del complesso enzimatico.

Studi di modeling

Il derivato 5 è stato valutato mediante studi di docking nei confronti delle cavità catalitiche $\beta 1$ e $\beta 5$. In entrambi i subsiti la molecola è posizionata in prossimità del residuo catalitico thr1. In $\beta 1$ con l'O2 chinonico vicino alla Thr1 ed alla Gly47 con distanze di 2.6 e 2.7 Å compatibili con la formazione di un legame ad idrogeno (**figura 17**).

In $\beta 5$ l'O1 chinonico è posto ad una distanza superiore (3.1 Å), ma si possono osservare interazioni addizionali tra il sostituito N-terminale ed i residui enzimatici Ser115, Gln 131, Gly128 ed Asp116 (**figura 18**) con distanze comprese tra 3.0-3.5 Å che contribuiscono alla stabilità del legame.

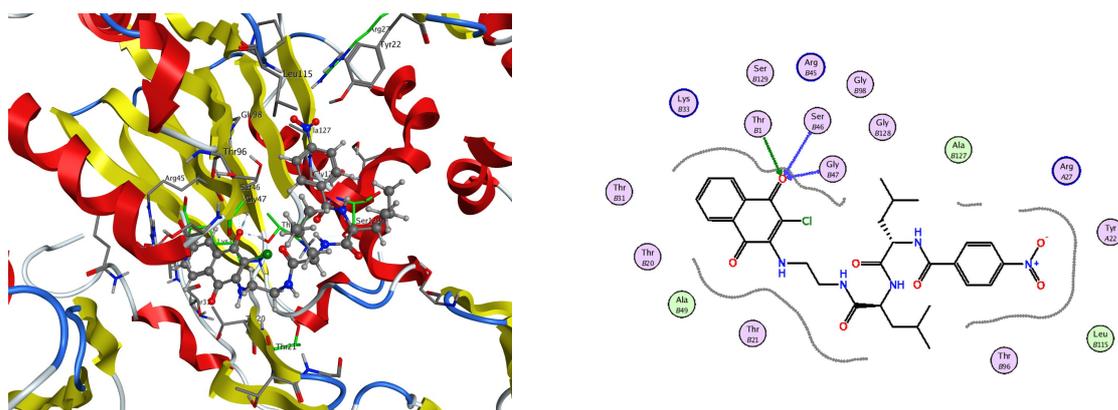


Figura 17. Composto 5 legata al subsito $\beta 1$ e diagramma schematico delle interazioni inibitore/enzima.

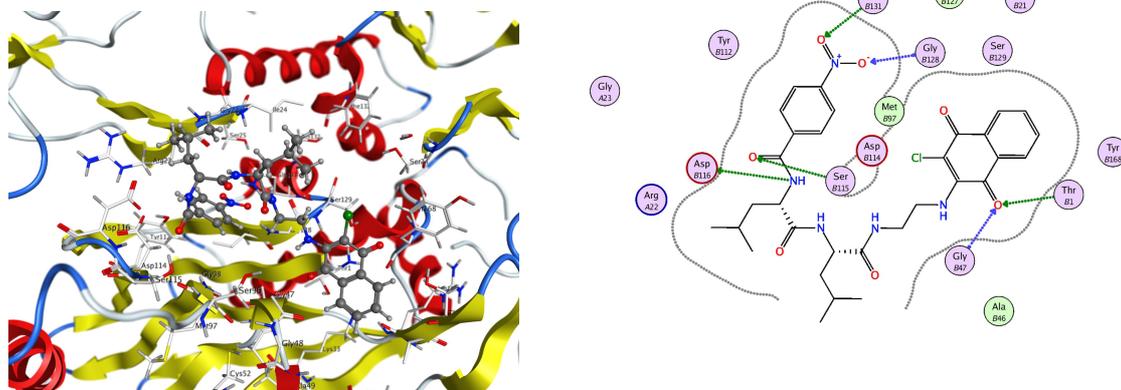


Figura 18. Composto 5 legata al subsito $\beta 5$ e diagramma schematico delle interazioni inibitore/enzima.

Conclusioni

La peculiarità di questi composti è la presenza in posizione C-terminale di un raggruppamento 2-cloronaftochinonico quale unità farmacoforica responsabile dell'interazione primaria con le subunità attive dell'enzima.

Lo stesso scaffold è presente in molecole non peptidiche già riportate quali inibitori del complesso multicatalitico.

I dati inerenti la risposta biologica di alcuni analoghi componenti questa nuova serie, hanno evidenziato una interessante capacità di inibizione del proteasoma. I derivati **5** e **8**, sono risultati i più attivi nei confronti delle subunità $\beta 1$ (PGHP) e $\beta 5$ (ChT-L), con un profilo biologico che li rende potenzialmente in grado di funzionare quali agenti neoplastici.

La struttura molecolare dei nuovi inibitori permette ulteriori studi sul rapporto struttura-attività, mantenendo al C-terminale il farmacoforo naftochinonico e variando le sequenze oligopeptidiche ed il sostituente N-terminale, anche mediante procedure sintetiche riconducibili alla chimica combinatoriale.

Derivati aminoacidici etilendiaminici naftochinonici

Dato il riscontro positivo ottenuto dalla precedente classe di composti, abbiamo sintetizzato una seconda serie di derivati, in cui è stato mantenuto il gruppo 2-cloronaftochinonico come farmacoforo e l'etilendiammina come spacer. In questo caso però si è deciso di creare composti con struttura aminoacidica anzichè peptidica. L' N-terminale è stato funzionalizzato oltre che con i consueti acido 3-idrossi-2-metil benzoico e acido 4-nitrobenzoico, anche con alfa naftoico e acido benzoico. La struttura generale dei composti sviluppati è riportata in **figura 19**.

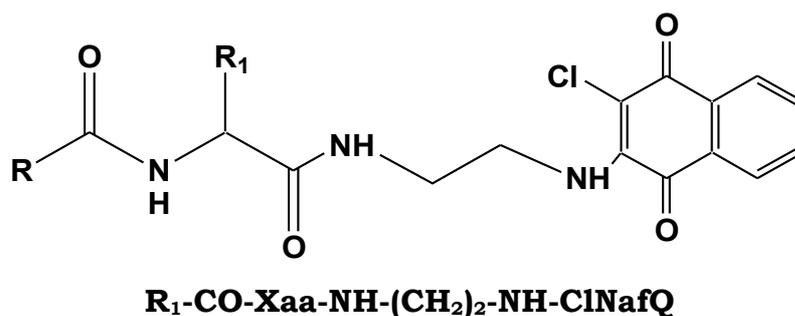
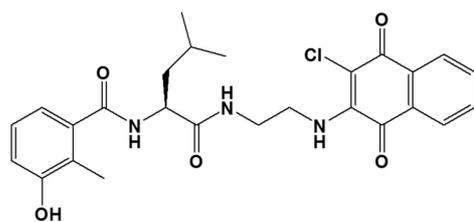
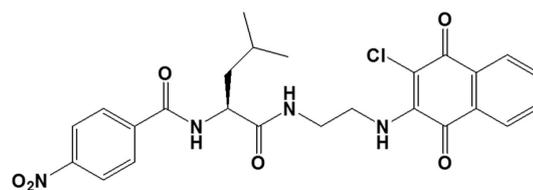


Figura 19. Struttura generale dei nuovi derivati aminoacidici naftochinonici

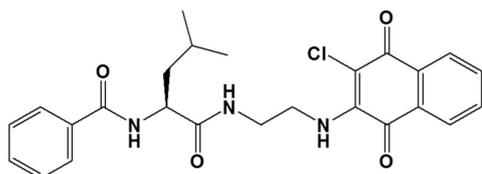
Le strutture delle molecole sintetizzate, purificate e valutate biologicamente in questa tesi sono riportate in **figure 20 e 21**.



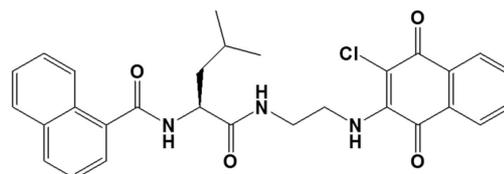
1. HMB-Leu-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



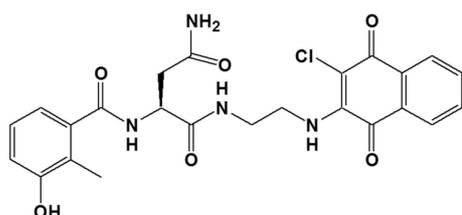
2. pNO₂Bz-Leu-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



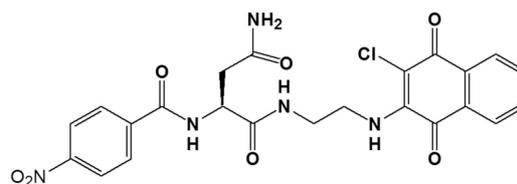
3. Bz-Leu-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



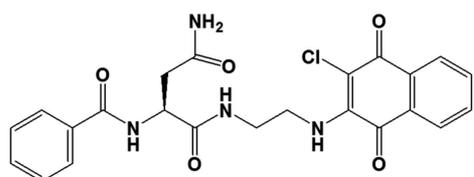
4. 1-NaftCO-Leu-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



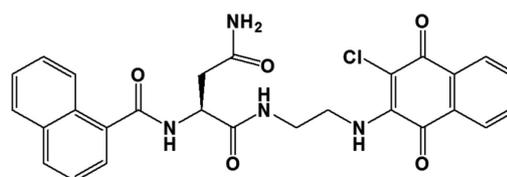
5. HMB-Asn-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



6. pNO₂Bz-Asn-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ

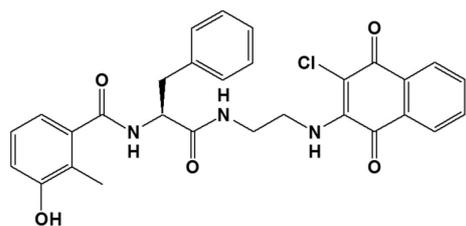


7. Bz-Asn-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ

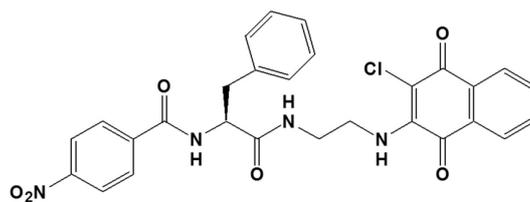


8. 1-NaftCO-Asn-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ

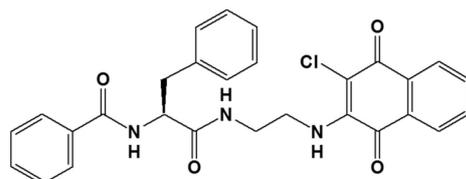
Figura 20. Strutture dei derivati aminoacidici **1-8** funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone



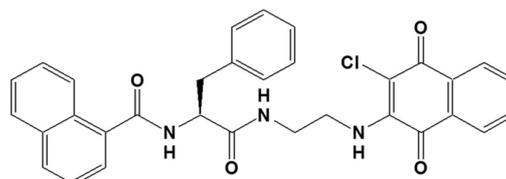
9. HMB-Phe-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



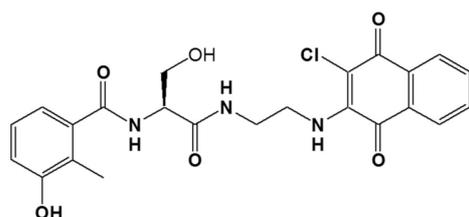
10. pNO₂Bz-Phe-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



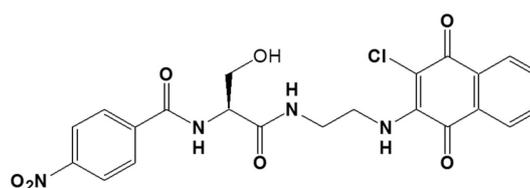
11. Bz-Phe-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



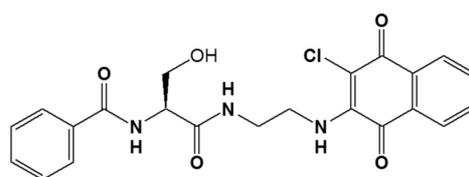
12. 1-NaftCO-Phe-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



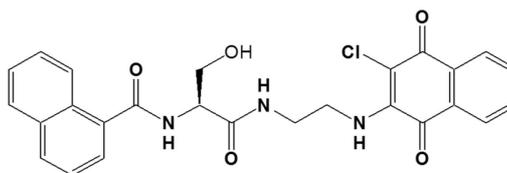
13. HMB-Ser-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



14. pNO₂Bz-Ser-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



15. Bz-Ser-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ



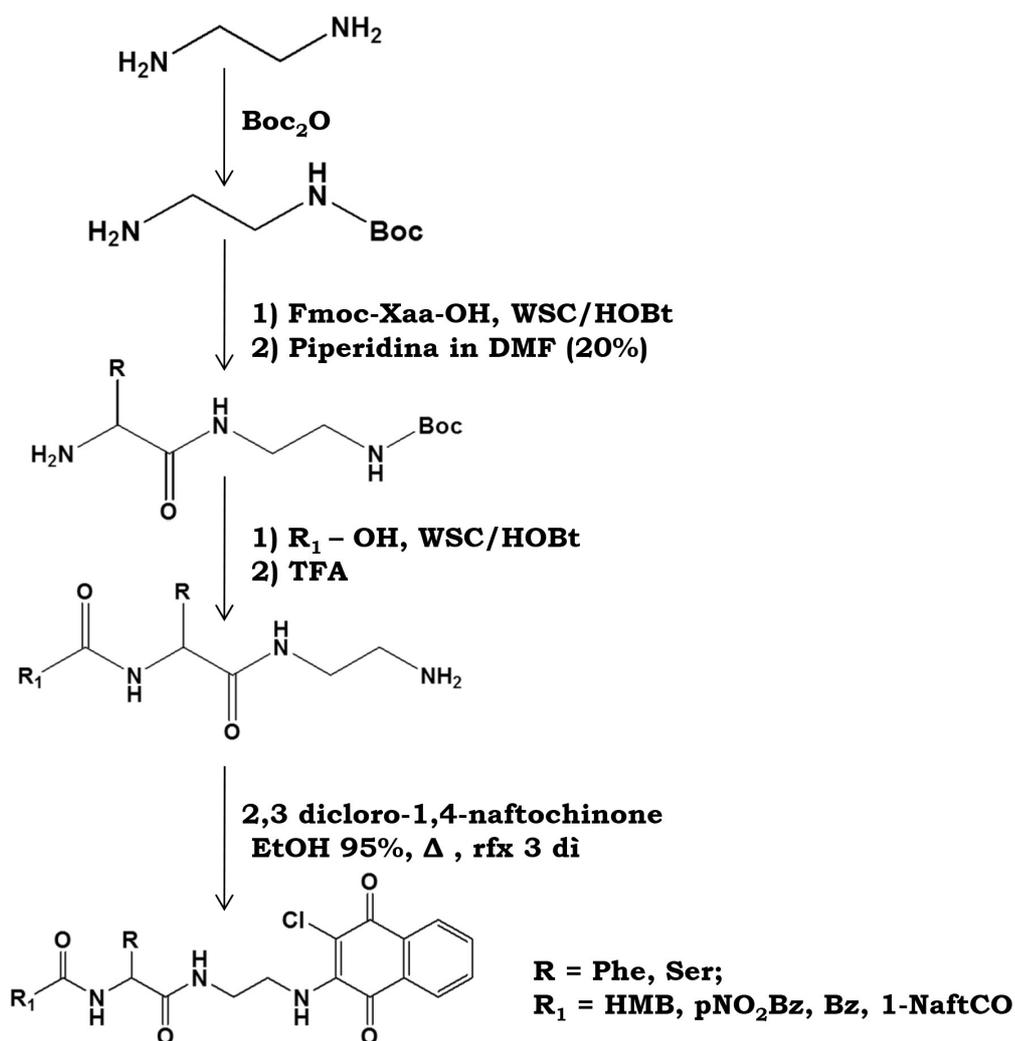
16. 1-NaftCO-Ser-NH-(CH₂)₂-NH-ClNafQ

Figura 21. Strutture dei derivati aminoacidici **9-16** funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

I nuovi composti aminoacidici presentano il gruppo farmacoforico cloronaftochinone condensato al C-terminale mediante uno spacer costituito dall'etilendiammina; lo schema di sintesi applicato nella preparazione di queste molecole è illustrato nello **schema 6**.



Schema 6. Sintesi dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone

La strategia sintetica utilizzata è quella che ha permesso di ottenere i composti con il minor numero di steps possibili. Si tratta di una sintesi in soluzione in cui l'aminoacido viene opportunamente funzionalizzato all'N-terminale e legato al linker etilendiamminico all'estremità C-terminale. L'etilendiammina viene monoprotetta su una funzionalità amminica con il gruppo Boc e successivamente condensata con l'aminoacido protetto all'estremità N-terminale da un gruppo Fmoc, mediante l'utilizzo di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide (WSC) e N-idrossibenzotriazolo (HOBt) quali agenti condensanti, a dare l'intermedio funzionalizzato sull'appropriato linker. Successivamente si procede alla rimozione del gruppo protettore fluorenilmetossicarbonile mediante soluzione basica di piperidina. La funzionalizzazione N-terminale viene effettuata per acilazione dei derivati aminoacidici con acido alfa-naftoico, acido benzoico, acido 4-nitrobenzoico oppure con acido 3-idrossi-2-metil-benzoico, sempre tramite l'ausilio di agenti condensanti: WSC/HOBt. Dopo rimozione del Boc in ambiente acido per TFA si ottiene l'aminoacido funzionalizzato all'N-terminale e provvisto del linker etilendiamminico. A questo punto si procede alla condensazione in posizione C-terminale con 2,3-dicloro naftochinone. La reazione avviene in soluzione di EtOH al 95% posta a riflusso ad una temperatura di circa 115°C per una durata media di tre giorni.

Dopo analisi e purificazione dei composti tramite RP-HPLC preparativo, si è valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR. Le caratteristiche chimiche, fisiche ed analitiche dei nuovi composti aminoacidici sono riportate in **Tabelle 7 e 8**.

N° Composto	HPLC T _r (min)	MP °C	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	MS M+H ⁺
1. HMB-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	16,76	111-114	-30,2	498
2. Np-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	18,40	134-137	-26,4	513
3. Benz-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	17,71	128-130	-22,4	468
4. α-naft-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	19,11	145-148	-33,2	518
5. Hmb-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	13,21	128-130	-42,1	499
6. Np-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	13,66	168-170	-38,8	514
7. Benz-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	14,30	165-167	-26,6	469
8. α-naft-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	15,43	178-183	-42,8	519

Tabella 7. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati aminoacidici recanti il linker etilendiaminico **1-8**.

N° Composto	HPLC T _r (min)	MP °C	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	MS M+H ⁺
9. HMB-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	16,91	121-124	-31,4	531
10. Np-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	18,73	141-144	-28,9	546
11. Benz-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	18,05	122-124	-23,4	501
12. α-naft-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	19,65	130-134	-33,2	551
13. Hmb-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	12,84	117-120	-45,1	471
14. Np-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	13,22	142-146	-39,8	486
15. Benz-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	13,97	155-157	-30,6	523
16. α-naft-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	14,86	163-166	-41,5	491

Tabella 8. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati aminoacidici recanti il linker etilendiaminico **9-16**.

Isolamento e purificazione del proteasoma e saggi di inibizione enzimatica

Tutti i composti sono stati saggiati sul proteasoma isolato e purificato

secondo le procedure discusse precedentemente.

In **tabelle 9 e 10** sono riportati i valori di IC₅₀ a concentrazione μM , dopo 60 minuti, relativi ai saggi di inibizione rispettivamente nei confronti dell'attività triptica (T-L), chiotriptica (ChT-L) e post-acidica (PGPH) degli otto analoghi della nuova serie. I valori riportati sono la media di tre determinazioni separate.

N° Composto	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	T-L	ChT-L	PGPH
1.HMB-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	77,44±6,51	>100	1,21±0.08
2. pNO ₂ Bz-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	65,32±5,91	>100	2,35±0,21
3. Bz-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	58,43±5,13	>100	2,61±0.23
4. 1-NaftCO-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	21,08±1,85	0,82±0,08	0,91±0,07
5.HMB-Asn-NH (CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	68,35±5,14	8,47±0,75	6,18±0,55
6.pNO ₂ Bz-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	17,23±1,09	0,92±0,09	1,19±0,13
7.Bz-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	49,66±3,87	7,99±0,67	11,23±0,98
8.1-NaftCO-Asn-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	35,23±2,77	>76,25±6,82	10,01±1,27

Tabella 9. Dati di inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma dei derivati cloronaftochinonici recanti il linker etilendiaminico **1-8**

N° Composto	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	T-L	ChT-L	PGPH
9.HMB-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	>100	0,85±0.07	0,88±0.08
10. pNO ₂ Bz-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	35,40±2,91	0.77±0,06	0.24±0,3
11. Bz-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	53,18±6,70	6,22±0,48	1,05±0.09
	49,75±3,97	9,14±1,02	35,76±4,03

12. 1-NaftCO-Phe-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ			
13.HMB-Ser-NH (CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	>100	>100	91,52±7,69
14.pNO ₂ Bz-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	63,36±7,01	83,47±8,03	78,66±8,14
15.Bz-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	53,82±4,88	24,11±1,98	5,78±4,35
16.1-NaftCO-Ser-NH-(CH ₂) ₂ -NH-ClNafQ	>100	>100	>100

Tabella 10. Dati di inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma dei derivati cloronaftochinonici recanti il linker etilendiaminico **9-16**

Per quanto riguarda l'inibizione della subunità $\beta 5$ (ChT-L) dalla **Tabella 10** si evidenzia che alcuni derivati presentano una buona attività in particolare risultano più attivi gli analoghi **4**, **6**, **9** e **10** con valori di IC₅₀ a concentrazioni submicromolari. L'inibizione dell'attività triptica che ha sede nella cavità $\beta 2$, generalmente non risulta di particolare interesse con un range di valori che si avvicinano o sono superiori a 100 μ M.

L'attività più rilevante si è riscontrata nei confronti della subunità $\beta 1$ post-acidica dove generalmente tutti gli analoghi esplicano una inibizione paragonabile o superiore all'inibitore di riferimento. In questo saggio i derivati più attivi risultano essere quelli recanti la leucina quale residuo centrale e il composto **6** avente l'asparagina nella stessa posizione. I composti **9-11** presentano buoni valori di inibizione di questo sito catalitico anche se paragonati a noti potenti inibitori del proteasoma. Il derivato più attivo della serie è il composto **10** che presenta una rilevante inibizione della tasca post-acidica affiancata da una sensibile capacità di contrastare l'attività chimotriptica.

Una generale analisi del rapporto struttura-attività evidenzia una interazione favorevole con le subunità catalitiche del complesso multienzimatico per i composti che presentano la fenilalanina quale residuo aminoacidico centrale. I sostituenti N-terminali favoriti hanno struttura monociclica ed in particolare risulta più funzionale nei confronti della risposta biologica il raggruppamento p-nitro benzoilico.

Dai risultati biologici si può in definitiva affermare che l'unità farmacoforica cloronaftochinonica risulta in grado di interagire con la treonina catalitica; legame che viene favorito da interazioni secondarie prodotte dalla presenza di specifici residui nel core strutturale delle molecole preparate e saggiate.

La interessante inibizione dell'attività post-acidica affiancata da una sensibile risposta nei confronti dell'attività chimotriptica del complesso multicatalitico è una caratteristica che si riscontra in inibitori già utilizzati come agenti antineoplastici che generalmente sono dotati di elevata attività antichimotriptica associata ad una residua inibizione della subunità $\beta 1$.

Conclusioni

I dati inerenti la risposta biologica degli analoghi componenti questa nuova serie, hanno evidenziato per alcuni analoghi una interessante capacità di inibizione del proteasoma. L'attività più rilevante si è riscontrata nei confronti della subunità $\beta 1$ (PGHP) del proteasoma sede dell'attività post-acidica. Per gli stessi analoghi è risultata evidente anche l'inibizione della cavità $\beta 5$ (ChT-L), con un profilo biologico che rende queste nuove molecole potenzialmente in grado di funzionare quali agenti neoplastici.

Un'altra peculiarità composti è mediamente il basso peso molecolare e la presumibile resistenza all'idrolisi enzimatica; questi parametri possono presupporre buone caratteristiche farmacocinetiche favorevoli per un ipotetico utilizzo terapeutico.

Infine, la struttura molecolare dei nuovi inibitori è tale da permettere ulteriori studi sul rapporto struttura-attività, mantenendo l'unità farmacoforica naftochinonica, variando le caratteristiche del residuo centrale ed il linker diamminico in sostituzione dell'etilendiamina presente in questi composti.

Derivati aminoacidici naftochinonici con linker butilendiaminico

Alla luce dei positivi dati biologici ottenuti è stata sviluppata una nuova serie di derivati, in cui la differenza sostanziale rispetto agli analoghi della serie precedente riguarda la sostituzione dello spacer etilendiaminico con una funzione butilendiaminica come linker tra il carbossile aminoacidico ed il farmacoforo naftochinonico. In questo lavoro viene riportata la sintesi e la capacità di inibire le subunità catalitiche del proteasoma di 16 derivati contenenti lo spaziatore butilendiaminico tra l'unità farmacoforica ed il residuo aminoacidico opportunamente funzionalizzato al gruppo α -aminico con derivati aromatici quali acido 3-idrossi-2-metil benzoico (HMB), acido 4-nitrobenzoico (pNO₂Bz), acido benzoico (Bz) ed acido alfa-naftoico (1-NaftCO). Il residuo centrale può essere la fenilalanina (**1-4**), la serina (**5-8**), la leucina (**9-12**) o l'asparagina (**13-16**) scelti in base alle diverse proprietà chimico-fisiche che caratterizzano i due aminoacidi ed allo scopo di indagare le peculiarità necessarie per un'ottimale interazione con la tasca catalitica in posizione P1. La struttura generale dei composti sviluppati è riportata in **figura 22**.

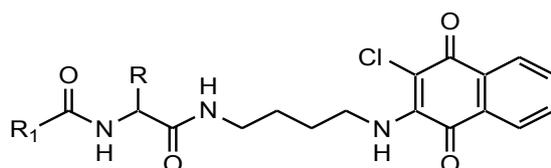


Figura 22. Struttura generale dei nuovi derivati aminoacidici naftochinonici recanti il linker butilendiaminico

Le strutture delle molecole sintetizzate, purificate e valutate biologicamente sono riportate nelle **figure 23 e 24**.

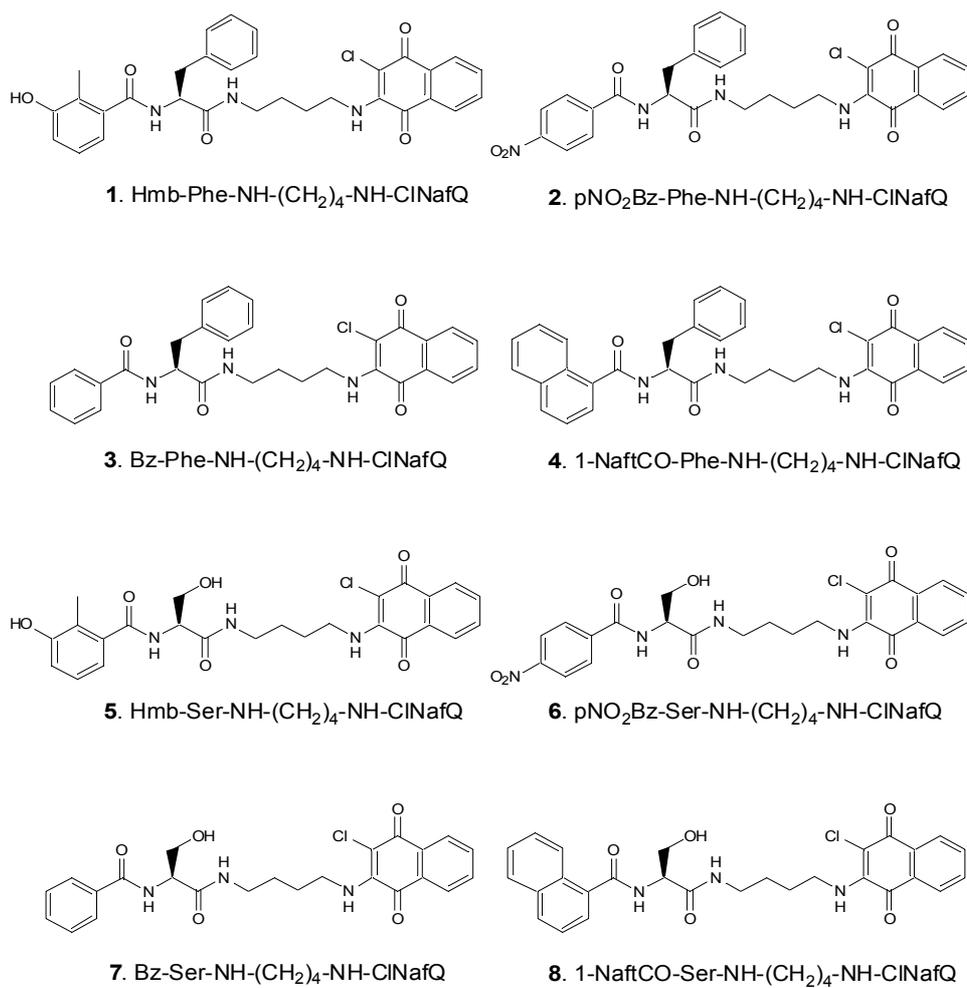


Figura 23. Strutture dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone recanti il linker butilendiaminico **(1-8)**

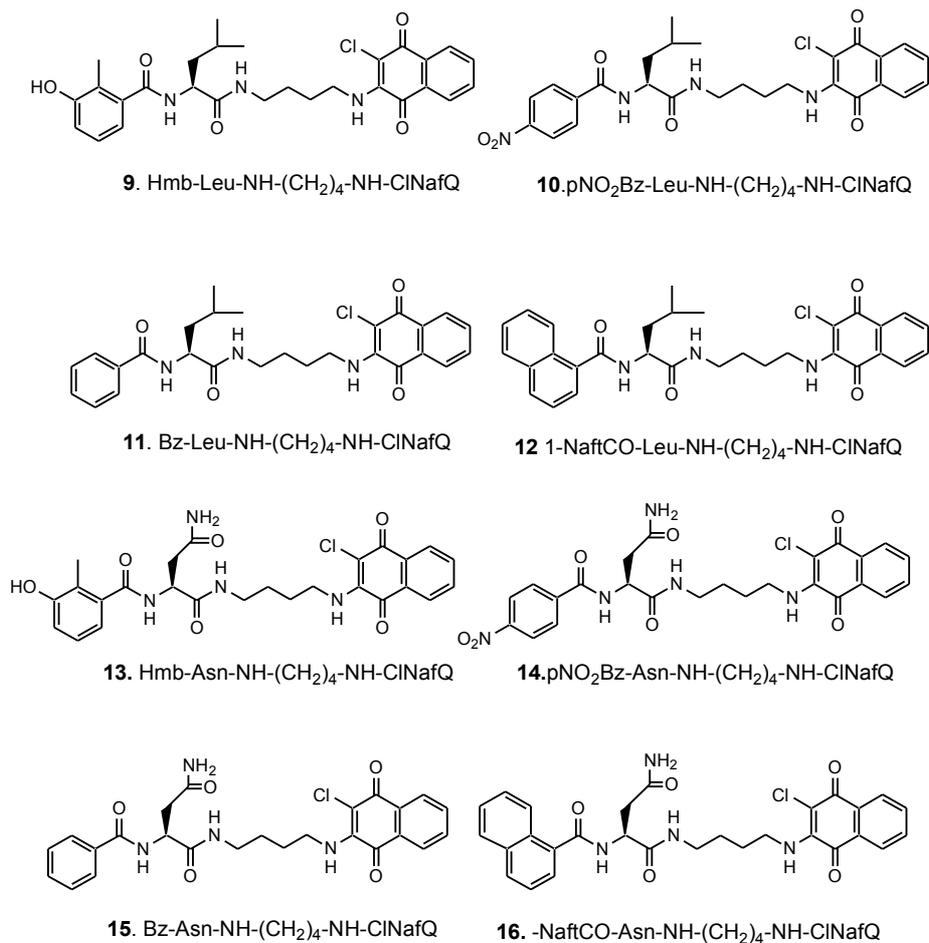
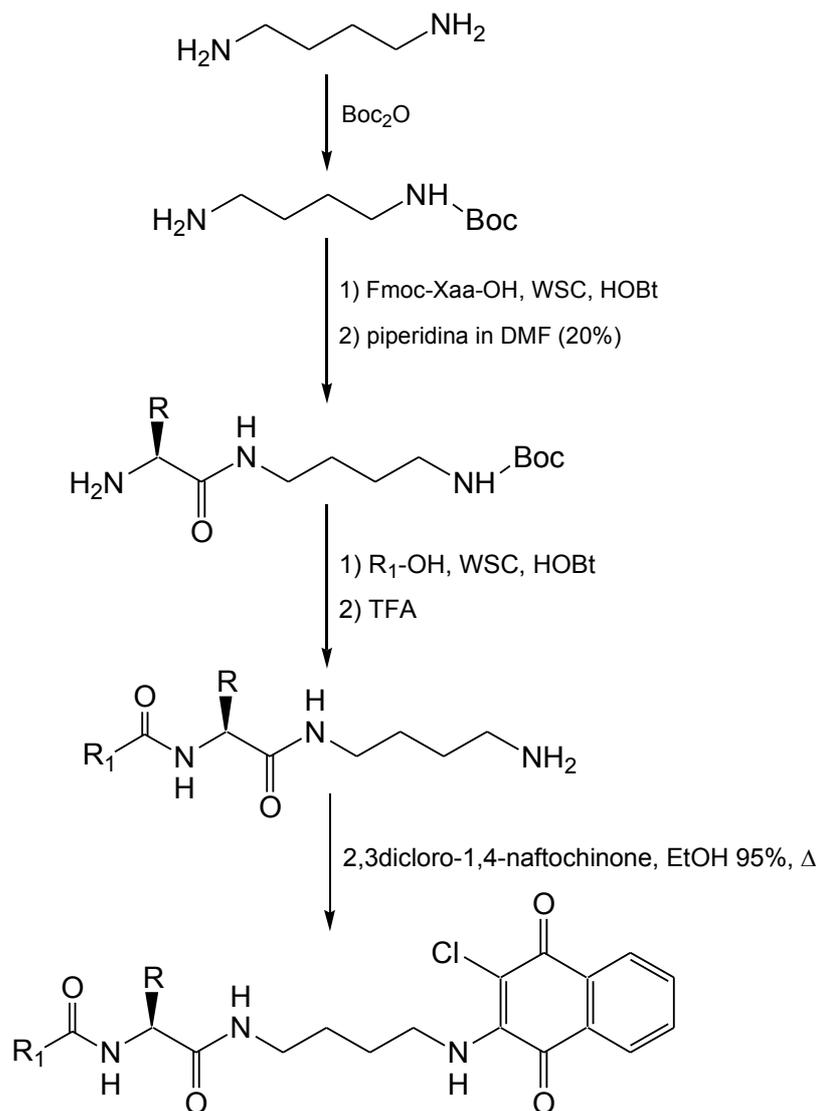


Figura 24. Strutture dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone recanti il linker butilendiaminico **(9-16)**

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

La strategia sintetica applicata alla preparazione dei derivati naftochinonici è illustrata nello **schema 7**. E' stato ripreso lo schema di sintesi della precedente serie, ma partendo da un reagente diverso. Si tratta di una sintesi in soluzione in cui l'aminoacido viene opportunamente funzionalizzato all' α -amina e legato al linker butilendiaminico mediante il gruppo carbossilico. La butilendiamina monoprotetta con il gruppo Boc viene acilata dall'aminoacido Fmoc protetto mediante l'utilizzo di 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide ed N-idrossibenzotriazolo (WSC/HOBt) quali agenti condensanti. La Fmoc-asparagina è stata utilizzata con protezione tritilica ortogonale. Successivamente si procede alla rimozione del gruppo protettore fluorenilmetossicarbonile mediante piperidina al 20% in DMF. La funzionalizzazione del gruppo α -aminico viene effettuata condensando acido 3-idrossi-2-metil-benzoico, acido 4-nitrobenzoico, acido benzoico oppure acido 1-naftoico sempre tramite l'ausilio degli agenti condensanti WSC/HOBt. Dopo rimozione del Boc in ambiente acido per TFA, per i derivati **5-8** recanti la serina in posizione centrale si ha il contemporaneo ripristino della catena laterale liberata dalla protezione *tert*-butil eterea, e per i derivati **13-16** recanti l'asparagina in posizione centrale si ha il contemporaneo ripristino della catena laterale liberata dalla protezione tritilica. Infine, si procede alla condensazione con 2,3-dicloronaftochinone. La reazione avviene in soluzione di EtOH al 95% posta a riflusso ad una temperatura di circa 115°C per una durata media di tre giorni.



R = Phe, Asn, Leu, Asn; **R₁** = HMB, pNO₂Bz, Bz, 1-NaftCO

Schema 7. Sintesi dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con cloro naftochinone

Dopo analisi e purificazione dei composti tramite RP-HPLC preparativo, si è valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR. Le caratteristiche chimiche, fisiche ed analitiche dei nuovi composti aminoacidici sono riportate nelle Tabelle **11 e 12**.

N° Composto	HPLC T _r (min)	MP °C	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	MS M+H ⁺
1. HMB-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	14,70	118-120	-21,5	560
2. NBz-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	15,88	108-111	-18,2	574
3. Bz-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	16,02	110-113	-13,4	529
4. 1-NaftCO-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	16,39	115-119	-23,5	579
5. HMB-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	12,88	135-138	-35,6	499
6. NBz-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	13,99	130-133	-29,1	514
7. Bz-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	14,07	132-135	-20,4	469
8. 1-NaftCO-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	14,58	139-141	-31,8	519

Tabella 11. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati aminoacidici 1-8

N° Composto	HPLC T _r (min)	MP °C	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	MS M+H ⁺
-------------	------------------------------	----------	---	------------------------

9. HMB-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	15,40	121-124	-11,5	525
10. NBz-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	16,43	115-117	-10,2	541
11. Bz-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	16,10	120-123	-9,4	495
12. 1-NaftCO-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	16,82	123-127	-13,5	546
13. HMB-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	12,36	145-148	-25,6	526
14. NBz-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	13,56	151-153	-18,1	542
15. Bz-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	13,31	142-145	-15,4	496
16. 1-NaftCO-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	14,03	148-151	-22,6	547

Tabella 12. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati aminoacidici 9-16

Isolamento e purificazione del proteasoma

L' enzima è stato isolato e purificato mediante lisi secondo le stesse procedure discusse nei precedenti capitoli.

Saggi di inibizione enzimatica

In **Tabelle 13 e 14** sono riportati i valori di IC₅₀ a concentrazione µM, dopo 60 minuti, relativi ai saggi di inibizione rispettivamente nei confronti dell'attività triptica (T-L), chimitriptica (ChT-L) e post-acidica (PGPH) degli

analoghi della nuova serie. I valori riportati sono la media di tre determinazioni separate.

N° Composto	IC ₅₀ (μM) T-L	IC ₅₀ (μM) ChT-L	IC ₅₀ (μM) PGPH
1. HMB-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	17,50±1,07	8,82±0,71
2. NBz-PheNH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	9,10±0,6	10,54±0,82
3. Bz-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	10,12±0,70	5,43±0,44
4. 1-NaftCO-Phe-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	19,71±1,97	9,30±1,02	25,65±3,03
5. HMB-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	10,24±0,91	45,68±2,59	61,52±4,99
6. NBz-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	73,26±7,21	88,74±8,03	83,66±8,16
7. Bz-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	63,82±4,88	84,11±6,08	3,55±1,65
8. 1-NaftCO-Ser-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	10,75±1,88	>100	83,62±5,48

Tabella 13. Dati di inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma dei derivati cloronaftochinonici recanti il linker butilendiaminico **1-8**.

N° Composto	IC ₅₀ (μM) T-L	IC ₅₀ (μM) ChT-L	IC ₅₀ (μM) PGPH
9. HMB-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	11,50±1,02	7,82±0,71

10. NBz-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	8,40±0,72	10,54±0,82
11. Bz-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	10,12±0,70	2,41±0,14
12. 1-NaftCO-Leu-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	49,30±5,02	45,35±4,03
13. HMB-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	65,38±6,50	9,52±1,09
14. NBz-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	28,52±3,05	>100
15. Bz-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	24,19±2,05	>100
16. 1-NaftCO-Asn-NH-(CH ₂) ₄ -NH-ClNafQ	>100	78,34±6,95	>100

Tabella 14. Dati di inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma dei derivati cloronaftochinonici recanti il linker butilendiaminico **9-16**.

Per quanto riguarda l'inibizione della subunità $\beta 5$ (ChT-L) dalla si evidenzia che alcuni derivati presentano una buona risposta biologica, in particolare risultano più attivi gli analoghi **2-4** e **9-11** con valori di IC₅₀ a concentrazioni micromolari. L'inibizione dell'attività triptica che ha sede nella cavità $\beta 2$, generalmente non risulta di particolare interesse con un range di valori che sono superiori a 100 μ M.

Interessante per alcuni analoghi della serie è l'inibizione riscontrata nei confronti della subunità $\beta 1$ post-acidica. I composti **1-3**, **7**, **9-11** e **13**

presentano buoni valori di IC_{50} di questo sito catalitico. Il derivato più attivo della serie è il composto **11** che presenta una sensibile inibizione della tasca post-acidica affiancata da una buona capacità di contrastare l'attività chimotriptica.

Una generale analisi del rapporto struttura-attività evidenzia una interazione favorevole con le subunità catalitiche del complesso multienzimatico per i composti che presentano la fenilalanina e la leucina quali residui aminoacidici centrale. I sostituenti N-terminali favoriti hanno struttura monociclica. I derivati **13-16** recanti l'asparagina in posizione centrale esplicano inibizione selettiva per la subunità chimotriptica, solamente l'analogo **13** mostra un'attività misurabile a valori di IC_{50} inferiori a 100 μ M anche nei confronti della subunità post-acidica.

I derivati più idrofobici contenenti fenilalanina e la leucina presentano valori di inibizione paragonabili per i subsiti $\beta 1$ e $\beta 5$, mentre la presenza di asparagina conferisce alle molecole un'azione più specifica per $\beta 5$.

Dai risultati biologici ottenuti, si può in definitiva affermare che l'unità farmacoforica cloronaftochinonica risulta in grado di interagire con la treonina catalitica. Il legame viene favorito da interazioni secondarie prodotte dalla presenza di specifici residui nel core strutturale delle molecole preparate e saggiate.

L'allungamento della catena alchilica del linker non produce una sostanziale variazione della risposta biologica se comparata alla serie precedente. La maggiore flessibilità ed esposizione del gruppo farmacoforico naftochinonico legato allo spaziatore butilendiaminico non sembra migliorare l'interazione con i subsiti catalitici rispetto agli analoghi etilendiaminici.

L'inibizione dell'attività post-acidica affiancata da una sensibile risposta nei confronti dell'attività chimotriptica del complesso multicatalitico è una caratteristica che si riscontra in inibitori già utilizzati come agenti antineoplastici che generalmente sono dotati di elevata attività antichimotriptica associata ad una residua inibizione della subunità $\beta 1$.

Conclusioni

I dati inerenti la risposta biologica degli analoghi componenti questa nuova serie, hanno evidenziato per alcuni una interessante capacità di inibizione del proteasoma. L'attività più rilevante si è riscontrata nei confronti della subunità $\beta 1$ (PGHP) del proteasoma sede dell'attività post-acidica. Evidente anche una generale inibizione della cavità $\beta 5$ (ChT-L), con un profilo biologico che rende queste nuove molecole potenzialmente in grado di funzionare quali agenti antineoplastici. Anche in questa serie il basso peso molecolare dei derivati presue la resistenza all'idrolisi enzimatica; questi parametri possono presupporre buone caratteristiche farmacocinetiche favorevoli per un ipotetico utilizzo terapeutico. Infine, la struttura molecolare dei nuovi inibitori è tale da permettere ulteriori studi sul rapporto struttura-attività, mantenendo l'unità farmacoforica naftochinonica, variando le caratteristiche del residuo centrale ed il linker.

Derivati aminoacidici naftochinonici con linker cicloesildiaminico

Alla luce dei soddisfacenti risultati delle serie precedenti, per approfondire lo studio dei derivati aminoacidici recanti l'unità farmacoforica 2-cloro naftochinonica, in questo lavoro sono stati sintetizzati 8 derivati, contenenti uno spaziatore cicloesildiaminico tra il farmacoforo ed il residuo aminoacidico opportunamente funzionalizzato al gruppo α -aminico con derivati aromatici quali acido 3-idrossi-2-metil benzoico (HMB), acido 4-nitrobenzoico (NBz), acido benzoico (Bz) ed acido alfa-naftoico (1-NaftCO). Il residuo centrale può essere la leucina (**1-4**) o la serina (**5-8**), scelti in base alle diverse proprietà chimico-fisiche che caratterizzano i due aminoacidi ed allo scopo di indagare le peculiarità necessarie per un'ottimale interazione con la tasca catalitica in posizione P1. In sostanza, si è voluto approfondire il ruolo dello spaziatore nell'interazione con le cavità catalitiche, inserendo un raggruppamento più

rigido in grado di dare una conformazione meno flessibile, con gradi minori di libertà, alla struttura degli inibitori.

La struttura generale dei composti sviluppati è riportata in **figura 25**.

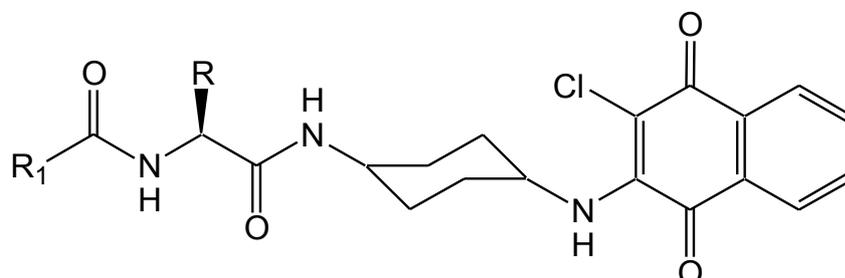


Figura 25. Struttura generale dei nuovi derivati aminoacidici naftochinonici con linke cicloesildiaminico

Le strutture delle molecole sintetizzate, purificate e valutate biologicamente in questa tesi sono riportate in **figura 26**.

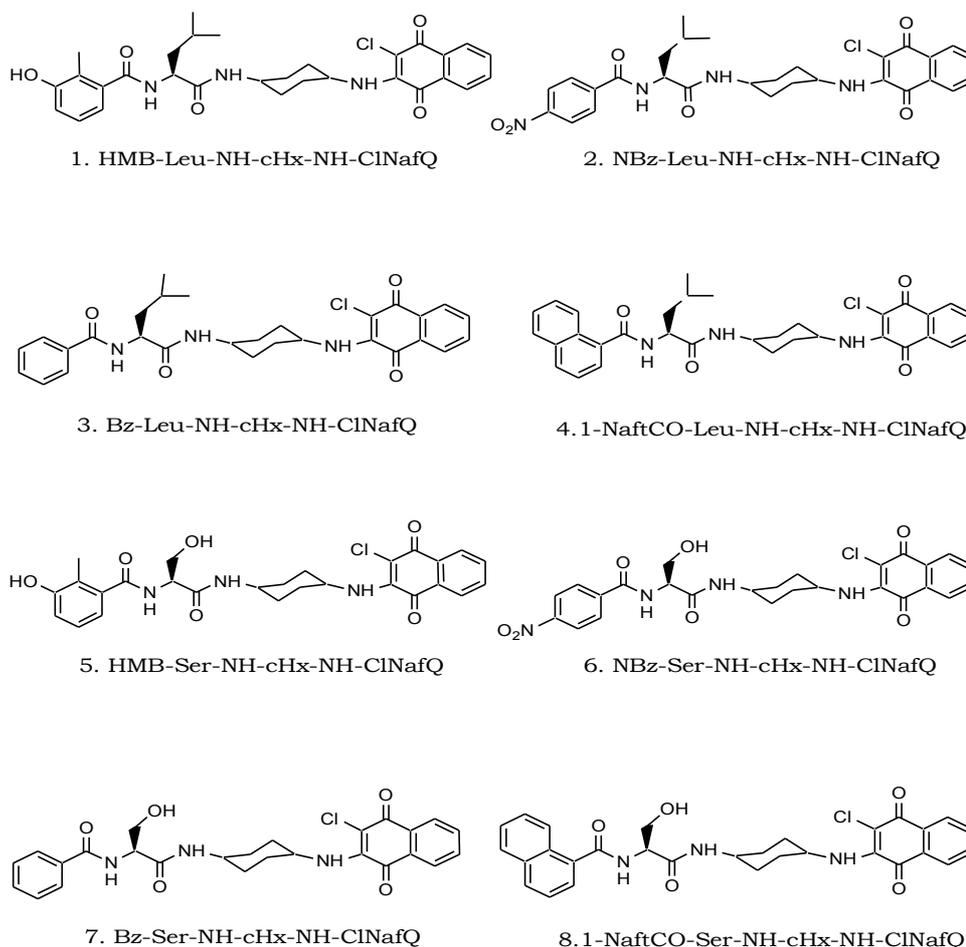
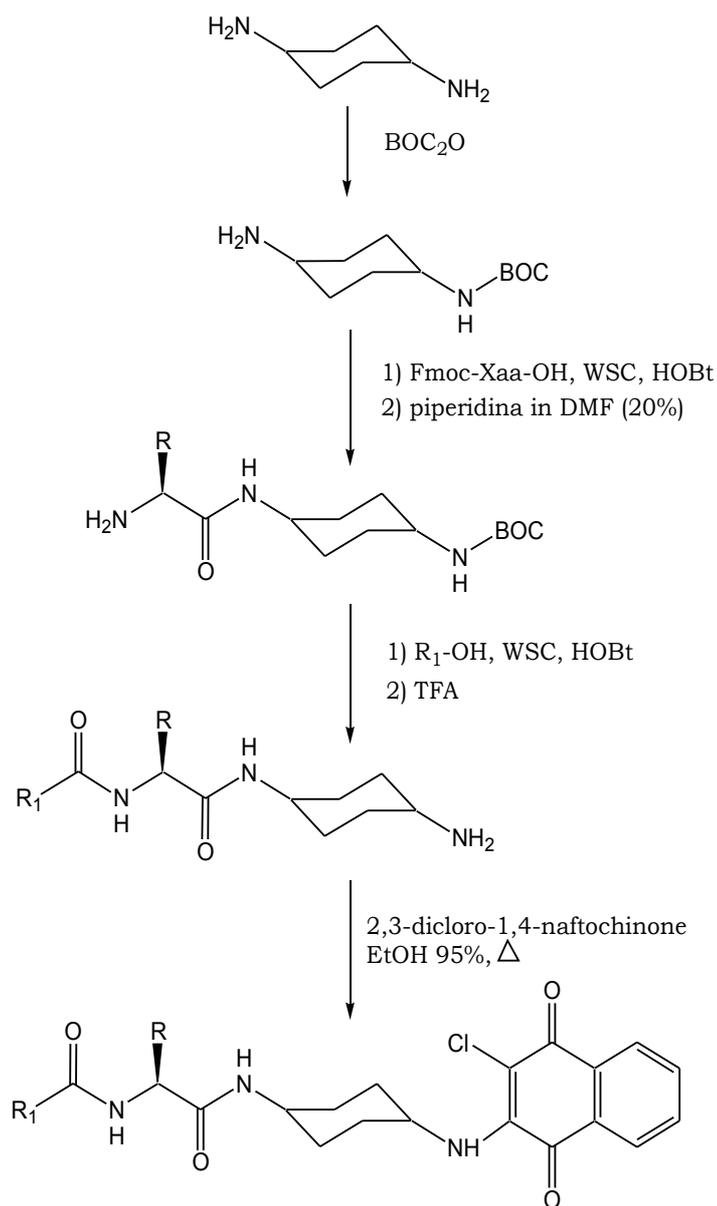


Figura 26. Strutture dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con cloronaftochinone recanti il linker cicloesildiaminico

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sintesi degli inibitori

La strategia sintetica applicata alla preparazione dei derivati naftochinonici è illustrata nello **schema 8**. La sintesi ha permesso di ottenere tutti gli analoghi della nuova serie con il minor numero di steps possibili. Si tratta di una sintesi in soluzione in cui l'aminoacido viene opportunamente funzionalizzato all' α -amina e legato al linker cicloesildiaminico mediante il gruppo carbossilico. La cicloesildiamina monoprotetta con il gruppo Boc viene acilata dall'aminoacido Fmoc protetto, mediante l'utilizzo di 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide ed N-idrossibenzotriazolo (WSC/HOBt), quali agenti condensanti. La Fmoc-serina è stata utilizzata con protezione tert-butilica ortogonale. Successivamente si procede alla rimozione del gruppo protettore fluorenilmetossicarbonile mediante piperidina al 20% in DMF. La funzionalizzazione del gruppo α -aminico viene effettuata condensando acido 3-idrossi-2-metil-benzoico, acido 4-nitrobenzoico, acido benzoico oppure acido 1-naftoico sempre tramite l'ausilio degli agenti condensanti WSC/HOBt. Dopo rimozione del Boc in ambiente acido per TFA, per i derivati **5-8** recanti la serina in posizione centrale si ha il contemporaneo ripristino della catena laterale liberata dalla protezione tert-butilica. Infine, si procede alla condensazione con 2,3-dicloronaftochinone. La reazione avviene in soluzione di EtOH al 95%, posta a riflusso ad una temperatura di circa 115°C, per una durata media di tre giorni.



R = Leu, Ser; **R1** = HMB, NBz, Bz, 1-NaftCO

Schema 8. Sintesi dei derivati aminoacidici funzionalizzati al C-terminale con 2-cloronaftochinone

Dopo analisi e purificazione dei composti tramite RP-HPLC preparativo, si è valutata l'omogeneità strutturale mediante spettrometria di massa ed NMR. Le caratteristiche chimiche, fisiche ed analitiche dei nuovi composti aminoacidici sono riportate in **Tabella 15**.

N° Composto	HPLC T _r (min)	MP °C	[α] _D ²⁰ (c=1,MeOH)	MS M+H ⁺
1. HMB-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	14,12	118-120	-9,7	552
2. NBz-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	16,04	112-115	-8,2	567
3. Bz-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	15,74	117-119	-7,6	522
4. 1-NaftCO-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	16,40	121-124	-11,8	572
5. HMB-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	11,06	142-146	-23,4	526
6. NBz-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	13,74	147-151	-16,5	541
7. Bz-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	13,41	138-141	-13,8	496
8. 1-NaftCO-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	14,30	145-148	-20,7	546

Tabella 15. Caratteristiche chimico-fisiche ed analitiche dei derivati aminoacidici 1-8

Isolamento del proteasoma e saggi di inibizione enzimatica

Per questo lavoro, l'enzima è stato isolato e purificato mediante le stesse procedure discusse in precedenza.

In **Tabella 16** sono riportati i valori di IC₅₀ a concentrazione μM, dopo 60 minuti, relativi ai saggi di inibizione rispettivamente nei confronti dell'attività triptica (T-L), chimotriptica (ChT-L) e post-acidica (PGPH) degli otto analoghi della nuova serie. I valori riportati sono la media di tre determinazioni separate.

N° Composto	IC ₅₀ (μM) T-L	IC ₅₀ (μM) ChT-L	IC ₅₀ (μM) PGPH
1. HMB-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	>100	>100
2. NBz-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	42.10±5.02	>100
3. Bz-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	23.12±1.70	>100
4. 1-NaftCO-Leu-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	59.30±6.42	13.67±1.45
5. HMB-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	>100	>100
6. NBz-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	>100	5.78±0.62
7. Bz-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	>100	3.42±0.51
8. 1-NaftCO-Ser-NH-cHx-NH-ClNafQ	>100	>100	11.71±1.25

Tavola 16. Dati di inibizione delle subunità catalitiche del proteasoma dei derivati cloronaftochinonici recanti il linker cicloesildiaminico **1-8**

Per quanto riguarda l'inibizione della subunità β5 (ChT-L), dalla **Tabella 16** si evidenzia che alcuni derivati presentano una risposta biologica sensibile, in particolare gli analoghi **2-4** mostrano valori di IC₅₀ compresi tra 20 e 60 micromolare. L'inibizione dell'attività triptica che ha sede nella cavità β2, generalmente non risulta di particolare interesse, con un range di dati superiori a 100 μM.

Interessante per alcuni analoghi della serie, è l'inibizione riscontrata nei

confronti della subunità $\beta 1$ post-acidica. I composti **4** e **6-8** presentano buoni valori di IC_{50} compresi tra le concentrazioni 3 e 14 μM . Il derivato piú attivo della serie è il composto **7**, che presenta una sensibile inibizione della tasca post-acidica; mentre l'analogo **4**, è l'unico componente della serie che conserva anche una sufficiente capacità di inibire l'attività chimotriptica.

Una generale analisi del rapporto struttura-attività, evidenzia una interazione favorevole con la subunità catalitica $\beta 1$ del complesso multienzimatico per i composti che presentano la serina quale residuo aminoacidico centrale. I sostituenti N-terminali che favoriscono maggiormente il legame con la cavità catalitica enzimatica hanno struttura aromatica non idrofila. I derivati **2-4** recanti la leucina in posizione centrale, esplicano blanda inibizione selettiva per la subunità chimotriptica, confermando che per questo sito è preferito un residuo idrofobico in posizione P1.

Dai risultati biologici ottenuti, si può in definitiva affermare che, l'unità farmacoforica cloronaftochinonica risulta in grado di interagire con la treonina catalitica. Il legame è selettivo nei confronti delle subunità enzimatiche in funzione dell'aminoacido centrale presente nelle molecole. Infine, comparando i dati biologici con le serie precedenti la rigidità del linker cicloesilaminico non comporta una rilevante differenza in termini di potenza della capacità inibitrice, mentre, la sua presenza rende piú specifica la risposta biologica.

Conclusioni

I dati inerenti la risposta biologica degli analoghi componenti questa nuova serie, hanno evidenziato un'inibizione specifica nei confronti della subunità $\beta 1$ (PGHP) del proteasoma sede dell'attività post-acidica. Altri analoghi, risultati meno attivi, hanno mostrato maggiore selettività per l'attività chimotriptica.

Alcune caratteristiche chimico-fisiche dei nuovi composti quali il basso peso molecolare e la presumibile resistenza all'idrolisi enzimatica, possono

presupporre buone caratteristiche farmacocinetiche favorevoli per un ipotetico utilizzo terapeutico.

Infine, la struttura molecolare dei nuovi inibitori è tale da permettere ulteriori studi sul rapporto struttura-attività, mantenendo l'unità farmacoforica naftochinonica, variando le caratteristiche del residuo centrale ed il linker diamminico in sostituzione della cicloesildiamina.

CONCLUSIONI GENERALI

L'importanza della via metabolica ubiquitina-proteasoma (UPS) nei processi biologici intracellulari, rende questo sistema un importante bersaglio per molecole in grado di modularne l'attività.

In particolare, composti in grado di inibire le attività proteolitiche del complesso enzimatico chiamato proteasoma 26S, responsabile della processazione di molte proteine cellulari, possono promuovere lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche nei confronti di importanti patologie come il cancro, processi infiammatori, risposta immune e malattie neurodegenerative.

Innumerevoli sono i derivati, sia sintetici che naturali, in grado di inibire l'attività del complesso enzimatico; alcuni già applicati in studi clinici avanzati oppure già in terapia come il Bortezomib, utilizzato per il trattamento del mieloma multiplo refrattario.

Tuttavia esiste sempre la richiesta di nuovi composti dotati di azione potente, specifica e selettiva nei confronti delle subunità catalitiche del proteasoma con effetti collaterali trascurabili.

In questo ambito, durante il periodo di dottorato, mi sono occupata della progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di numerose serie di derivati con struttura a base peptidica, recanti nella porzione C-terminale, un'unità farmacoforica in grado di funzionare da substrato elettrofilo per l'attacco della treonina catalitica.

In particolare, il mio interesse si è rivolto all'unità farmacoforica 2-cloro naftochinonica, inserita sia tramite linker lineari che ciclici, all'interno dei derivati sintetizzati, e potenzialmente in grado di subire addizione tipo Michael da parte dell'ossidrile in catena laterale della treonina.

Queste diverse unità farmacoforiche sono sempre legate a sequenze oligopseudopeptidiche o a singoli aminoacidi in grado di produrre interazioni secondarie con le subunità catalitiche del proteasoma determinando quindi inibizione selettiva.

I risultati di questa ricerca, in alcuni casi, hanno prodotto nuove molecole

in grado di inibire selettivamente i subsiti attivi del complesso enzimatico a concentrazioni sub- μM .

Questi risultati potranno permettere la progettazione di nuovi analoghi sviluppati con l'intento di avere molecole sempre più attive e specifiche quali inibitori del complesso multi catalitico composti con potenziale applicazione terapeutica.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi

I punti di fusione sono stati determinati con apparecchio Kofler (Reicher-Jung, Austria) e non sono stati corretti.

Il potere rotatorio è stato misurato con un polarimetro Perkin-Elmer 241 (Norwalk, CT, USA) avente una cella lunga 10 cm. La concentrazione ed il solvente sono specificati in Tabella 2.

I pesi molecolari dei prodotti sono stati confermati mediante spettrometro di massa electrospray ZMD MICROMASS 2000.

Gli spettri NMR sono stati registrati con spettrometro Bruker AC200. La purificazione a gradiente a media pressione è stata condotta con un sistema ISOLERA (BIOTAGE Sweden), utilizzando come fase eluente AcOEt/EtPt (1:8) e come fase stazionaria colonna SNAP di silice preimpaccata.

Gli HPLC analitici sono stati effettuati tramite un cromatografo Beckman dotato di diode array detector. Per l'analisi è stata utilizzata una colonna Kromasil 100-5C18 (250x4.6 mm, dimensioni delle particelle 5 μ m).

I tempi di ritenzione dei composti finali sono stati determinati secondo le seguenti condizioni sperimentali: gradiente lineare da 0 a 100 % di B in 25 minuti ad un flusso di 1 ml/min, dove: A= acqua e B= acetonitrile, entrambi contenenti 0.1 % di TFA (v/v). La purificazione dei composti finali in HPLC preparativo è stata condotta con lo strumento Delta Prep 3000 (Waters, USA) mediante una colonna Delta Pack C-18 300 Å (30x3 cm, 15 μ m). Le condizioni sperimentali ed i solventi usati sono i seguenti: gradiente lineare da 0 a 100 % di B in 25 minuti ad un flusso di 30 ml/min, dove: A= 10 % di acetonitrile in acqua (v/v), B= 60 % di acetonitrile in acqua (v/v), entrambi contenenti 0.1 % di TFA (v/v). Dopo la purificazione tutti i composti hanno dimostrato un grado di purezza superiore al 98 %.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata con lastre di gel di

silice F 254 (Merck, Darmstadt, Germania) usando i seguenti eluenti:

A) cloruro di metilene/metanolo/toluene (17: 2: 1).

B) butanolo/acido acetico/acqua (3: 1: 1).

Le cellule utilizzate per la purificazione del proteosoma hanno le seguenti caratteristiche: MINGOZZI LCL. Linee linfoblastoidi Epstein Barr Virus (EBV) positive. Terreno: RPMI 1640 (SIGMA) arricchito con antibiotici (streptomicina e penicillina) e L-Glutamina + 10% Fetal Calf Serum (FCS) + Cyproxim (2.5 mL in 100 mL).

Procedure sintetiche generali

1) Serie Isossazolin, vinil esterea

Preparazione dell'ossima

A 14 mmoli di idrossilammina cloridrata sciolte in 80 mL di H₂O vengono aggiunte goccia a goccia 24 mmoli di NaHCO₃ precedentemente solubilizzate in 20 mL di H₂O. Si aggiungono poi 14 mmoli di dimetossi-acetaldeide (soluzione acquosa al 60%), 30 mL di Et₂O e si lascia reagire a RT overnight sotto forte agitazione. La reazione viene controllata su TLC (AcOEt/EtPt 1:1) e la fase acquosa viene estratta con CH₂Cl₂ (3x20 mL). La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata.

Preparazione di Boc-Leu-Allile

Si sciolgono 10 mmoli di Boc-Leu-OH in 20 mL di DMF, si aggiungono 20 mmoli di NaHCO₃ e si lascia reagire a RT per 1h. Si aggiungono 15 mmoli di allilbromuro e la miscela viene lasciata in agitazione a RT overnight.

Si evapora la DMF, si riprende con 90 mL di Et₂O e si effettuano lavaggi con H₂O e brine. La fase organica viene anidrificata ed evaporata a dare un olio trasparente con buone rese.

Reazione di cicloaddizione

Si aggiungono 0,07 mL di piridina ad una sospensione di 18,30 mmoli di N-clorosuccinimide in 22 mL di CHCl₃ anidro. Si solubilizzano 14 mmoli di

ossima nella minima quantità di CHCl_3 anidro e si aggiungono alla sospensione preparata in precedenza lasciando reagire per 30 minuti a RT. A scomparsa dell'*N*-clorosuccinimide si aggiungono 2,7 mL di TEA e 18,30 mmoli di Boc-Leu-Allile lasciando la miscela di reazione in agitazione a RT overnight. Successivamente si evapora il solvente, si riprende con AcOEt e si effettuano lavaggi con acido citrico 10%, NaHCO_3 5% e brine.

Il grezzo di reazione viene purificato in colonna cromatografica utilizzando una miscela eluente AcOEt/EtPt in rapporto 2:5.

Rimozione del Boc e ripristino della funzionalità aldeidica

Il Boc e i gruppi metossilici vengono rimossi in un unico step con TFA acquoso 90% per 50 minuti. Dopo evaporazione, il residuo viene triturato con etere etilico più volte e separato per centrifugazione.

La sola rimozione del Boc avviene con la stessa procedura utilizzando solo TFA.

Reazione di Wittig

2 mmoli dell'aldeide, precedentemente trattata con TFA acquoso, vengono solubilizzate in 10 mL di THF anidro, si aggiungono 1,5 eq. di [(etossicarbonil)metiliden]trifenilfosforano e si lascia reagire a Rfx a 85°C overnight. Si evapora successivamente il THF, si riprende in AcOEt e si effettuano alcuni lavaggi con H_2O e brine.

Condensazione con aminoacidi Boc-protetti ed Hmb, ac. α -naftoico e β -naftoico:

Ad 1 mmole di componente carbossilica sciolta in 10 mL di DMF vengono aggiunte 1,1 mmoli di HOBT, 1,1 mmoli di WSC ed 1,1 mmoli di componente amminica. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione per 1 h a 0°C ed overnight a temperatura ambiente. Si evapora la DMF, si riprende il residuo con AcOEt e si lava successivamente con acido citrico 10%, NaHCO_3 5% e più volte con brine. La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata ed evaporata.

Analisi ¹H-NMR di alcuni derivati tripeptidici isossazolin vinil esterei:

Composto (1):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.90-0.95 (m 18H); 1.27-1.34 (t 3H); 1.42 (s 9H); 1.61-1.64 (m 6H); 1.83 (m 3H); 2.95-3.18 (dd 2H); 3.9 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.53 (m 3H); 6.01 (d, J=7,2 Hz, 1H); 6.30 (d, J=7,2 Hz, 1H); 6.50 (d 1H); 7.55 (m 1H).

Composto (7):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.81-0.98 (m 12H); 1.19-1.26 (t 3H); 1.59-1.74 (m 3H); 1.83 (m 1H); 2.94-3.17 (dd 2H); 3.04-3.08 (m 2H); 3.43 (s 2H); 3.8 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.83 (m 3H); 5.22 (bs 1H); 6.01 (d, J=8 Hz, 1H); 6.13 (d, J=8 Hz, 1H); 8.91 (m 1H).

Composto (10): ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.81-0.98 (m 12H); 1.19-1.26 (t 3H); 1.59-1.74 (m 3H); 1.83 (m 1H); 2.94-3.17 (dd 2H); 3.04-3.08 (m 2H); 3.43 (s 2H); 3.8 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.83 (m 3H); 5.22 (bs 1H); 6.01 (d, J=8 Hz, 1H); 6.13 (d, J=8 Hz, 1H); 7.58 (m 3H); 7.87 (m 4H); 8.91 (m 1H).

2) Serie etil-estere dell'acido trans-trans muconico

Sintesi in fase solida

Le sequenze tripeptidiche funzionalizzate all'N-terminale sono state preparate in fase solida, utilizzando un supporto costituito da resina rink-amidica protetta sulla funzionalità aminica con il gruppo Fmoc, secondo la procedura riportata di seguito.

5 gr di resina funzionalizzata 0.6 meq/gr vengono sospesi in 10 ml di DMF sotto blanda agitazione, a cui si aggiungono 5 mL di piperidina 20% in DMF lasciando reagire per 2 h. Si filtra la resina, lavando consecutivamente due volte con 10 mL di DMF, due volte con 10 mL di EtOH e due volte con 10 mL di etere etilico. La resina viene risospesa in 10 mL di DMF, a cui si aggiungono 12 meq di Fmoc-Lys(Boc)-OH corrispondenti ad un eccesso di quattro volte la funzionalizzazione della

resina, con lo stesso eccesso vengono aggiunti 12 meq di WSC e 12 meq di HOBt, si lascia reagire per 4 h sotto blanda agitazione. Si tratta la resina come descritto in precedenza, eliminando con i lavaggi in successione di DMF, EtOH ed etere etilico i reagenti in eccesso; si tratta con 10 mL di piperidina al 20% in DMF per 2 h allo scopo di rimuovere il gruppo protettore Fmoc.

Si tratta la resina, come descritto in precedenza, e la si divide in due aliquote uguali; entrambe le aliquote vengono sospese in 5 mL di DMF, alle quali vengono aggiunti 6 meq di Fmoc-Leu-OH, 6 meq di WSC e 6 meq di HOBt alla prima aliquota. Nella seconda vengono aggiunti 6 meq di Fmoc-Phe-OH, sempre in presenza degli stessi equivalenti di agenti di accoppiamento. Si lascia reagire per 4 h, entrambe le aliquote vengono trattate come già descritto e messe a reagire con 5 mL di piperidina al 20% in DMF per 2 h. Entrambe le aliquote vengono ulteriormente divise in due quantità uguali, sospese in 5 mL di DMF e sottoposte alla condensazione del residuo aminoacidico N-terminale. La condensazione avviene con 3 meq di Fmoc-Ser-OH per la prima aliquota, 3 meq di Fmoc-Leu-OH per la seconda, 3 meq di Fmoc-Ser-OH e 3 meq di Fmoc-Leu-OH sempre in presenza di una quantità equivalente degli agenti condensanti WSC/HOBt. Le quattro aliquote si lasciano reagire per 6 h ed infine sono trattate come in precedenza. Si trattano le resine e si rimuove lo Fmoc con 3 mL di piperidina al 20% come già descritto. L'ultimo step sintetico in fase solida prevede l'ulteriore suddivisione in due aliquote uguali delle quattro resine recanti le quattro diverse sequenze tripeptidiche che vengono sospese in 3 mL di DMF e sottoposte alla funzionalizzazione N-terminale per acilazione con 1.5 meq di ac. 3-idrossi-2-metil benzoico o con 1.5 meq di ac. p-nitro benzoico sempre in presenza di quantità equivalenti di agenti condensanti. Le otto aliquote di supporto solido in cui sono state assemblate le sequenze volute vengono trattate come descritto in precedenza e tutte sottoposte a trattamento acido per TFA 2 mL in presenza di 0.1 mL di H₂O e 0.1 mL di trietilsilano (Et₃Si) per 2 h. Alla fine le soluzioni contenenti gli intermedi voluti vengono separate per filtrazione dal supporto solido. Dopo evaporazione mediante pompa a vuoto, le

sequenze tripeptidiche vengono precipitate, trattando con etere etilico, isolate per centrifugazione e conservate sotto vuoto.

Preparazione del mono etil estere dell'ac. *trans,trans*-muconico

A 2 mmol di acido *trans,trans*-muconico, sciolti in 5 mL di EtOH assoluto, vengono aggiunti goccia a goccia 5 mmol di cloruro di tionile (SOCl₂) a 0°C. Si lascia reagire overnight, si evapora il solvente, si scioglie in 50 mL di AcOEt e si effettuano 2 lavaggi con 10 mL di H₂O, si secca con MgSO₄ anidro, si filtra, si concentra. Si riprende con 15 mL di EtOH assoluto e si aggiungono 2,2 mmol di NaOH 1 N corrispondenti a 2,2 mL di soluzione. Si concentra al rotavapor, si tratta con 10 mL di ac. citrico al 10% e si estrae per 2 volte con 20 mL di AcOEt. Le fasi organiche vengono riunite e trattate 3 volte con 10 mL di brine. Si secca la fase organica con MgSO₄ anidro, si filtra e si concentra. Il mono estere dell'acido *trans,trans*-muconico viene isolato per centrifugazione dopo aver precipitato con etere etilico.

Condensazione dell'etil estere dell'acido *trans,trans*-muconico

0.2 meq di etil estere dell'acido *trans,trans*-muconico vengono sciolti in 2 mL di DMF, alla soluzione vengono aggiunti 0.2 meq di WSC e 0.2 meq di HOBt sotto agitazione a temperatura ambiente. Si aggiunge quindi una soluzione contenente la sequenza tripeptidica (0.2 meq), 0.2 meq di N-metil-morfolina in 2 mL di DMF. Si lascia reagire overnight, quindi si evapora il solvente in pompa a vuoto, si riprende con 20 mL di AcOEt e si separa in imbuto separatore, trattando successivamente con soluzioni di ac. citrico al 10%, NaHCO₃ al 5% e brine. Si secca la soluzione organica con MgSO₄ anidro, si filtra, si concentra e si precipita, trattando con etere etilico e recuperando il prodotto per centrifugazione. I composti sono stati analizzati in HPLC analitico e spettrometria di massa e, infine, purificati mediante RP-HPLC preparativo. Questa procedura è stata applicata per tutti gli analoghi **1-8**.

¹H NMR dei derivati più significativi

Composto (2):

¹H NMR (DMSO): 7.5-7.2 (m, 6H); 7.0 (d, 1H, J=4Hz); 6.09 (bs, 1H); 5.92 (bs, 1H); 5.74 (bs, 1H); 5.67 (d, 1H, J=15.8 Hz); 5.46 (d, 1H, J=15.8 Hz); 4.94 (t, 1H, J=7 Hz); 4.66 (m, 2H); 4.17 (q, 2H, J=6.8 Hz); 3.19 (t, 2H, J=7 Hz); 2.35 (m, 1H); 2.26 (s, 3H); 2.10 (m, 1H); 1.89-1.67 (m, 4H); 1.57-1.45 (m, 4H); 1.27 (t, 3H, J=6.8 Hz); 1.07 (m, 2H); 0.9 (m, 12H).

Composto (5):

¹H NMR (DMSO): 7.47-7.29 (m, 4H); 7.22-7.11 (m, 5H); 7.0 (d, 1H, J=4Hz); 5.74-5.62 (m, 2H); 5.19 (t, 1H, J=6.8Hz); 4.42 (m, 1H); 4.29 (m, 1H); 4.18 (q, 2H, J=7Hz); 3.30 (m, 1H); 3.19 (t, 2H, J=6.6 Hz); 2.85 (m, 1H); 2.31 (m, 1H); 2.26 (s, 3H); 1.85 (m, 2H); 1.68 (m, 1H); 1.49 (m, 1H); 1.36-1.26 (m, 5H); 1.06 (m, 2H); 0.90 (d, 6H, J=8Hz).

Composto (8):

¹H NMR (DMSO): 8.33-8.27 (m, 2H); 8.14-8.09 (m, 2H); 7.58 (d, 1H, J=16.2 Hz); 7.40 (d, 1H, J=16.2 Hz); 7.22-7.11 (m, 5H); 5.72 (m, 2H); 5.18 (t, 1H, J=7.2 Hz); 4.55-4.40 (m, 2H); 4.20-4.13 (m, 3H); 3.97 (m, 1H); 3.33 (m, 1H); 3.24-3.09 (m, 3H); 1.66 (m, 2H); 1.32-1.25 (m, 5H); 1.01 (m, 2H).

3) Derivati dipeptidici naftochinonici:

Preparazione di Boc-etilendiammina

A 10 mmoli di etilendiammina sciolte in 20 mL di t-ButOH/H₂O (2:1) vengono aggiunte 7 mmoli di (Boc)₂O e si lascia reagire per 2 ore sotto agitazione a RT. Si aggiungono 20 mL di H₂O e si estrae per 2 volte con 10 mL di n-pentano in imbuto separatore. Si concentra la fase acquosa e si estrae con 50 mL di AcOEt. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata .

Condensazione con Fmoc-aminoacidi, ac. 2-metil-3-idrossibenzoico (HMB) o ac. p-nitrobenzoico (Np).

A 1 mmole di componente carbossilica sciolta in 10 mL di DMF vengono aggiunte 1,1 mmoli di HOBT, 1,1 mmoli di WSC ed 1,1 mmoli di componente amminica. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione per 1 h a 0°C ed overnight, a temperatura ambiente. Si evapora la DMF, si riprende il residuo con AcOEt e si lava successivamente con acido citrico 10%, NaHCO₃ 5% e più volte con brine. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata.

Rimozione dello Fmoc

Lo Fmoc viene rimosso con soluzione di piperidina in DMF 20%. Dopo un'ora di trattamento il solvente viene evaporato e si procede con precipitazione tramite utilizzo di etere etilico. Il precipitato viene quindi separato tramite centrifugazione e raccolto.

Rimozione del Boc

Il Boc viene rimosso con TFA acquoso 90% per 50 min (1mL di TFA per mmole di composto protetto). Dopo evaporazione, il residuo viene triturato con etere etilico, più volte, e separato per centrifugazione.

Condensazione con funzionalità naftochinonica

Si solubilizzano 0,3 mmol di ammina in circa 15 mL EtOH 95% e si desalifica con NMM (N-metil-morfolina) in modo tale da eliminare l'eventuale presenza di TFA nella soluzione. A pH basico si aggiungono 0,6 mmol di 2,3-dicloronaftochinone e si lascia reagire a riflusso per tre di a 115°C. Il terzo giorno si evapora il solvente e si precipita con etere etilico per poi isolare tramite centrifugazione il solido.

Analisi ¹H-NMR di alcuni derivati dipeptidici naftochinonici:

Composto (3):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.90-0.95 (m 18H); 1.27-1.34 (t 3H); 1.42 (s 9H); 1.61-1.64 (m 6H); 1.83 (m 3H); 2.95-3.18 (dd 2H); 3.9 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H);

4.26 (d 2H); 4.53 (m 3H); 6.01 (d, J=7,2 Hz, 1H); 6.30 (d, J=7,2 Hz, 1H); 6.50 (d 1H); 7.55 (m 1H).

Composto (4):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.81-0.98 (m 12H); 1.19-1.26 (t 3H); 1.59-1.74 (m 3H); 1.83 (m 1H); 2.94-3.17 (dd 2H); 3.04-3.08 (m 2H); 3.43 (s 2H); 3.8 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.83 (m 3H); 5.22 (bs 1H); 6.01 (d, J=8 Hz, 1H); 6.13 (d, J=8 Hz, 1H); 8.91 (m 1H).

Composto (5):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.81-0.98 (m 12H); 1.19-1.26 (t 3H); 1.59-1.74 (m 3H); 1.83 (m 1H); 2.94-3.17 (dd 2H); 3.04-3.08 (m 2H); 3.43 (s 2H); 3.8 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.83 (m 3H); 5.22 (bs 1H); 6.01 (d, J=8 Hz, 1H); 6.13 (d, J=8 Hz, 1H); 7.58 (m 3H); 7.87 (m4H); 8.91 (m 1H).

Composto (6):

¹H NMR (CDCl₃): δ 0.81-0.98 (m 12H); 1.19-1.26 (t 3H); 1.59-1.74 (m 3H); 1.83 (m 1H); 2.94-3.17 (dd 2H); 3.04-3.08 (m 2H); 3.43 (s 2H); 3.8 (m 1H); 4.19-4.23 (q 2H); 4.26 (d 2H); 4.83 (m 3H); 5.22 (bs 1H); 6.01 (d, J=8 Hz, 1H); 6.13 (d, J=8 Hz, 1H); 7.58 (m 3H); 7.87 (m4H); 8.91 (m 1H).

4) Derivati aminoacidici naftochinonici con linker etilendiaminico;

Preparazione di Boc-etilendiammina

La procedura di preparazione della Boc-etilendiammina è la stessa riportata nel capitolo precedente (Serie Derivati Dipeptidici Naftochinonici)

Condensazione con Fmoc-aminoacidi.

Si solubilizzano 0,9 mmol di componente carbossilica in 10 mL di DMF a cui vengono aggiunte 1 mmol di HOBt e 1 mmol di WSC. Successivamente si aggiunge 1 mmol di componente amminica: la Boc-etilendiammina. La

miscela di reazione viene messa sotto agitazione overnight, a temperatura ambiente. Si evapora la DMF, si riprende il residuo con AcOEt e si eseguono i lavaggi in imbuto separatore: il primo con acido citrico 10%, e successivamente due volte con brine. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata.

Rimozione dello Fmoc

Lo Fmoc viene rimosso con soluzione di piperidina in DMF 20%. Dopo un'ora di trattamento il solvente viene evaporato e si procede con precipitazione tramite utilizzo di etere etilico. Il precipitato viene quindi separato tramite centrifugazione e raccolto.

Condensazione con acidi in posizione N-terminale.

Si solubilizzano 0,6 mmol di componente acida in 5 mL di DMF a cui vengono aggiunte 0,6 mmol di HOBt e 0,6 mmol di WSC. Successivamente si aggiungono 0,3 mmol di componente amminica. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione overnight, a temperatura ambiente. Si evapora la DMF, si solubilizza il residuo in AcOEt e si eseguono i lavaggi in imbuto separatore: il primo con acido citrico 10%, il secondo con NaHCO₃ 5% e successivamente due volte con brine. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata.

Rimozione del Boc

Il Boc viene rimosso con TFA acquoso 90% per 30 min (1mL di TFA per mmole di composto protetto). Dopo evaporazione, il residuo viene precipitato con etere etilico e separato per centrifugazione.

Condensazione con funzionalità naftochinonica

Si solubilizzano 0,3 mmol di ammina in circa 15 mL EtOH 95% e si desalifica con NMM (N-metil-morfolina) in modo tale da eliminare l'eventuale presenza di TFA nella soluzione. A pH basico si aggiungono 0,6 mmol di 2,3-dicloronaftochinone e si lascia reagire a riflusso per tre dì a 115°C. Il terzo giorno si evapora il solvente e si precipita con etere etilico

per poi isolare tramite centrifugazione il solido.

Analisi 1H-NMR di alcuni derivati naftochinonici:

Composto 4:

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.01 (d 6H); 1.79 (m 2H); 1.83 (m 1H); 2.0 (m 1H); 2.91 (m 2H); 3.46 (m 2H); 4.53 (m 1H); 7.42 (bs 1H); 7.46 (m 1H); 7.55 (m 1H); 7.73 (m 3H); 7.76 (m 1H); 7.88 (m 1H); 8.01 (m 4H); 9.19 (bs 1H).

Composto 6:

^1H NMR (CDCl_3): δ 2.0 (m 1H); 2.91 (m 2H); 2.72 (m 2H) ; 3.46 (m 2H); 6.0 (m 2H); 4.76 (m 1H); 7.73 (m 2H); 8.0 (m 4H) ; 8.21 (d 2H); 8.37 (d 2H).

Composto 12:

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.01 (d 6H); 1.79 (m 2H); 1.83 (m 1H); 2.0 (m 1H); 2.91 (m 2H); 3.46 (m 2H); 4.53 (m 1H); 7.42 (bs 1H); 7.46 (m 1H); 7.55 (m 1H); 7.73 (m 3H); 7.76 (m 1H); 7.88 (m 1H); 8.01 (m 4H); 9.19 (bs 1H).

Composto 13:

^1H NMR (CDCl_3): δ 2.0 (m 1H); 2.91 (m 2H); 2.72 (m 2H); 3.46 (m 2H); 6.0 (m 2H); 4.76 (m 1H); 7.73 (m 2H); 8.0 (m 4H); 8.37 (d 2H); 8.21 (d 2H).

5) Derivati aminoacidici naftochinonici con linker butilendiaminico

Preparazione di Boc-butilendiamina

A 50 mmoli di butilendiamina sciolte in 105 mL di t-ButOH/H₂O (2:1) vengono aggiunte 33,3 mmoli di (Boc)₂O in modo tale da avere come rapporto di equivalenti: 1,5 eq di butilendiamina per 1 eq di Boc₂O. Si lascia reagire per circa 2 ore sotto agitazione a RT. Si aggiungono 80 mL di H₂O e si estrae per 2 volte con 40 mL di n-pentano in imbuto separatore. Questo procedimento permette di rimuovere il Boc₂O che non ha reagito. Si concentra la fase acquosa e si estrae con 200 mL di AcOEt. La fase organica viene quindi anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata.

Tutti gli altri step sintetici sono analoghi alla serie precedente.

Analisi $^1\text{H-NMR}$ di alcuni derivati naftochinonici con linker butilendiaminico:

Composto 2:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.51 (m 2H) ; δ 1.58 (m 2H); δ 3.01 (m 2H); 3.19 (t 2H); 3.29 (t 2H); 4.85 (m 1H) ; 7.12 (m 5H); 7.41 (m 4H); 7.89 (bs 3H); 8.13 (d 2H); 8.32 (d 2H).

Composto 7:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.46 (m 2H) ; δ 1.55 (m 2H); 2.54 (s 1H) ; 2.97 (m 2H); 3.12 (m 2H); 4.06 (m 2H); 4.50 (m 1H); 7.76 (m 5H); 7.73 (m 2H); 7.92 (m 2H); 8.07 (bs 3H).

Composto 10:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ : 1.03 (d 6H) ; 1.55 (m 4H); 1.76 (m 2H); 1.83 (m 1H); 2.02 (bs 1H); 2.65 (m 2H) ; 3.20 (m 2H); 4.43 (m 1H); 7.75 (m 2H); 8.02 (m 4H); 8.21 (d 2H) ; 8.37 (d 2H).

Composto 15:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ : 1.57 (m 4H) ; 2.05 (bs 1H); 2.65 (d 2H) ; 2.73 (m 2H); 3.24 (m 2H); 4.63 (m 1H); 6.03 (bs 2H); 7.49 (m 3H); 7.76 (m 2H); 7.96 (d 2H); 8.03 (m 4H)

6) Derivati aminoacidici naftochinonici con linker cicloesildiaminico;

Preparazione di Boc-cicloesildiamina

A 50 mmoli di cicloesildiamina sciolte in 105 mL di t-ButOH/ H_2O (2:1) vengono aggiunte 33,3 mmoli di $(\text{Boc})_2\text{O}$ in modo tale da avere come rapporto di equivalenti: 1,5 eq di cicloesildiamina per 1 eq di Boc_2O . Si lascia reagire per circa 2 ore sotto agitazione a RT. Si

aggiungno 80 mL di H₂O e si estrae per 2 volte con 40 mL di n-pentano in imbuto separatore. Questo procedimento permette di rimuovere il Boc₂O che non ha reagito. Si concentra la fase acquosa e si estrae con 200 mL di AcOEt. La fase organica viene quindi anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata.

Tutti gli altri step sintetici sono analoghi alla serie precedente.

Analisi ¹H-NMR di alcuni derivati naftochinonici con liner cicloesildiaminico:

Composto 4:

¹H NMR (CDCl₃), δ: 1.01 (d 6H); 1.12 (m 4H); 1.60 (m 4H); 1.79 (m 2H); 1.83 (m 1H); 2.00 (bs 1H); 2.52 (m 2H); 4.53 (m 1H); 7.42 (m 1H); 7.46 (m 1H); 7.55 (m 1H); 7.73 (m 3H); 7.76 (m 1H); 7.88 (d 1H); 8.00 (m 4H); 9.19 (d 1H).

Composto 7:

¹H NMR (CDCl₃), δ: 1.12 (m 4H); 1.60 (m 4H); 2.00 (bs 2H); 2.52 (m 2H); 3.95 (m 1H); 4.20 (m 1H); 4.62 (m 1H); 7.44 (m 2H); 7.51 (m 1H); 7.73 (m 2H); 7.95 (m 2H); 8.00 (m 4H).

Test di attività dei proteasomi

Questo tipo di esperimento si avvale di substrati fluorogenici specifici per valutare e quantificare le diverse attività del proteasoma. Il substrato che permette di evidenziare l'attività chimotriptica, dovuta alla subunità β5/β5i, è formato dalla sequenza N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (SIGMA); per evidenziare l'attività triptica, della subunità β2/β2i, si utilizza il substrato Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Bachem) mentre l'attività post-acidica viene valutata mediante il substrato Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-metilcumarina (Bachem). Per questo tipo di test si utilizzano piastre da 96 pozzetti; in ogni pozzetto si piastrano

20 μL di proteasoma e 40 μL di substrato 100 μM diluito in buffer per l'attività dei proteasomi (Tris-HCl pH 7.4, 50 mM, MgCl_2 5 mM, EDTA 500 μM , DTT 1 mM, ATP 2 mM). Come bianco si piastrano 20 μL di buffer e 40 μL di substrato. La piastra è lasciata a 37°C per 30 minuti in modo tale che il proteasoma svolga le sue attività tagliando i substrati. Quando il substrato viene tagliato aumenta la fluorescenza emessa dalla coda 7-amido-4-metilcumarina (AMC). La fluorescenza viene rilevata da un fluorimetro che trasforma il segnale luminoso in unità arbitrarie di fluorescenza. Maggiore è il dato registrato maggiore è l'attività mostrata dal proteasoma.

Test di inibizione enzimatica

A 25 μL della soluzione del proteasoma purificato, vengono aggiunti 25 μL di una soluzione a concentrazioni diverse di inibitore (0.1 μM , 1 μM e 10 μM concentrazione finale nel pozzetto di saggio), si lascia incubare per 30 minuti a 37°C e si aggiungono 50 μL di substrato (100 μM per quanto riguarda i substrati dell'attività triptica e chimotriptica, 200 μM per il substrato della post-acidica). Si lascia a 37°C per 30, 60, 90 e 120 minuti, ad ogni intervallo di tempo si legge la fluorescenza al fluorimetro. Il non inibito di riferimento si prepara e viene saggiato con la stessa procedura sostituendo i 25 μL di soluzione di inibitore con un ugual volume di tampone.

BIBLIOGRAFIA

1. Rock KL, Goldberg AL. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 739-79.
2. Glickman MH, Ciechanover A. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428
3. Ciechanover A. *EMBO Journal* 1998; 17: 7151-60.
4. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdwl JW, Bennink JR. *J Exp Med* 2001; 193: 1319-26.
5. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, et al. *Nat StructBiol*2000; 7: 1062-7.
6. Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL. *Mol Cell* 1999; 4: 395-402.
7. Kisselev AF, et al. *Chemistry & Biology* 2001; 8: 739-758.
8. Marastoni M, Baldisserotto A, Cellini S, Gavioli R, Tomatis R. *J MedChem*2005; 48: 5038-5042.
9. Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *BioorgMedChemLett*2006; 16: 3125-3130.
10. Marastoni M, Baldisserotto A, Trapella C, Gavioli R, Tomatis R. *Eur J MedChem*2006; 41: 978-984.
11. Baldisserotto A, Marastoni M, Trapella C, Gavioli R, Ferretti V, Pretto L, Tomatis R. *EurJ MedChem*2007; 42: 586-592.
12. Marastoni M; Scotti A. C, Trapella C, Ferretti V, Sforza F, Gavioli R. *Journal of Peptide Science*, 2014 Feb
13. Das U, Pati HN, Sakagami H, Hashimoto K, Kawase M, Balzarini J, De Clercq E, Dimmock JR. *J Med Chem* 2011; 54(9):3445-9.

14. Rachel Isaksson Vogell¹, Kathleen Coughlin¹, Alessandra Scotti, Yoshie Iizuka¹ RaviAnchoori, Richard BS Roden, Mauro Marastoni and Martina Bazzaro, *Molecular Cancer Research*, 2014
15. Bazzaro M, Anchoori RK, Mudiam MK, Issaenko O, Kumar S, Karanam B, Lin Z, Isaksson Vogel R, Gavioli R, Destro F, Ferretti V, Roden RB, Khan SR. *J Med Chem*. 2011; 54(2):449-56
16. Franceschini C, Trapella C, Calia R, Scotti A, Sforza F, Gavioli R, Marastoni M. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012 Aug
17. Dipeptides as 20S proteasome inhibitors, Alessandra Scotti, Claudio Trapella, Valeria Ferretti, Eleonora Gallerani, Riccardo Gavioli, Mauro Marastoni, *Submitted to J Enzyme Inhib Med Chem*.
18. Ahn JH et al. *Bioorg Med Chem*2002; 12: 1941.
19. Urbanek RA et al. *J Med Chem* 2001; 44: 1777.
20. Brun MP et al. *Bioorg Med Chem*2005; 13: 4871
21. Harshani RL et al. *Bioorg Med Chem*2010; 18: 5576.
22. Xu K et al. *Bioorg Med ChemLett*2012; 22: 2772.
23. Ge Y et al. *J Med Chem* 2012; 55: 1978.