



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
“SCIENZE FARMACEUTICHE”

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

**SVILUPPO DI POSSIBILI NUOVI ANTAGONISTI
DEL RECETTORE P2Y₁₂**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottoranda

Dott. Crepaldi Pamela

Tutore

Prof. Simoni Daniele

Anni 2007/2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
Caratteri generali	pag. 1
L'emostasi	pag. 4
La patologia	pag. 8
I farmaci	pag. 11
I. Inibitori della ciclossigenasi-1	pag. 13
II. Antagonista del complesso glicoproteico IIb/IIIa	pag. 14
III. Inibitori della fosfodiesterasi	pag. 15
IV. Inibitori dei recettori del TXA ₂	pag. 17
V. Inibitori del recettore della trombina PAR-1	pag. 18
VI. Inibitori del recettore purinergico P2Y ₁₂	pag. 19
a. I recettori purinergici	pag. 19
b. I farmaci	pag. 21
• Tieno tetraidropiridine	pag. 22
• ATP-congeneri	pag. 30
• Derivati antrachinonici	pag. 32
SCOPO DELLA TESI	pag. 34
SINTESI	pag. 38
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 60
PARTE SPERIMENTALE	pag. 70
BIBLIOGRAFIA	pag. 161

INTRODUZIONE

Caratteri generali:

I disordini cardiovascolari e cerebrovascolari sono la principale causa di morte nel mondo. La formazione di aggregati piastrinici è un importante fattore patogenetico in molti disordini cardiovascolari. L'improvvisa occlusione di un vaso arterioso per formazione di un tappo trombotico è l'evento cruciale che induce una carenza di ossigeno che va ad alterare la funzionalità di organi come il cuore ed il cervello. Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi; in condizioni di normalità le piastrine si muovono liberamente nella corrente sanguigna e non aderiscono l'una all'altra, ma ci possono essere molteplici fattori che influenzano nettamente il loro comportamento, come ad esempio determinati polimorfismi genetici, alcuni stati patologici dell'organismo e lo stesso stile di vita del soggetto in esame.

In caso di iperattività piastrinica si verifica una serie di rapide reazioni a catena, che vanno a stimolare il processo di coagulazione del sangue e la produzione di sostanze che inducono l'attivazione piastrinica, un processo estremamente complesso che coinvolge molteplici recettori e ligandi.

Sulla base di questi dati sono state testate numerose classi di farmaci antiaggreganti come: i mimetici del metabolismo dell'Acido Arachidonico (Aspirina), gli antagonisti del recettore dell'ADP P2Y₁₂ (Ticlopidina, Clopidogrel), gli antagonisti della glicoproteina IIb/IIIa (Abciximab, Eptifibatide, Tirofiban), gli inibitori della fosfodiesterasi (Dipiridamolo, Indobufene) e gli antagonisti del recettore TP del TXA₂ (Picotamide).

L'era delle terapia antiaggregante piastrinica ha rivoluzionato il trattamento delle malattie cardiovascolari, principale causa di morte e morbilità nei paesi industrializzati ed ancora oggi la ricerca in questo campo prosegue. Sono, infatti, in fase di studio clinico altre molecole che probabilmente verranno emesse sul mercato nei prossimi anni, una volta dimostrata la loro efficacia, tollerabilità e sicurezza.

Il sangue è classificato come tessuto connettivo; sia perché è formato da elementi corpuscolati dispersi in una sostanza intercellulare amorfa, il plasma, e sia perché mette in relazione le diverse parti del corpo.

Esso ha molteplici funzioni: dalla distribuzione di fattori nutritivi in tutte le cellule del corpo all'eliminazione di sostanze di scarto, dal trasporto di ossigeno e anidride carbonica e di cellule fondamentali per la difesa dell'organismo, alla regolazione della temperatura corporea, del pH e dell'osmolarità del fluido extracellulare.

Quando si arricchisce di ossigeno nei polmoni e scorre nelle arterie, il sangue è di colore rosso vivo, mentre diventa rosso bluastrò quando ha ceduto l'ossigeno ai tessuti per nutrirlì e torna ai polmoni attraverso i capillari e le vene. Il flusso continuo del sangue è prodotto dall'attività di pompaggio effettuata dal cuore.

Gli elementi "figurati" presenti nel sangue sono: i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine.

I globuli rossi o eritrociti sono delle cellule che hanno la forma di disco biconcavo con un diametro di circa 8 μm ed uno spessore massimo di circa 2 μm , la funzione principale dell'eritrocita è quella di trasportare ossigeno ed anidride carbonica nel sangue, esse sono anucleate e prive di qualsiasi organello, questo aumenta la capacità di trasportare i gas. Contengono emoglobina, una proteina coniugata contenente ferro, la quale conferisce loro una colorazione rosso pallido ed è in grado di legarsi e dissociarsi molto rapidamente con l'ossigeno e l'anidride carbonica. L'eritropoiesi inizia da cellule staminali totipotenti ed è confinata, nell'adulto, nel midollo rosso di alcune ossa piatte come: omero, femore, coste, scapole, sterno, cranio, vertebre e bacino. La vita di un eritrocita è mediamente di 4 mesi, trascorsi i quali viene rimosso dal sangue e distrutto dai macrofagi di milza, fegato e midollo. Il sangue umano normalmente contiene approssimativamente 5 milioni di globuli rossi per microlitro di sangue intero. Inoltre è importante ricordare che sulla superficie della membrana plasmatica degli eritrociti sono presenti degli antigeni in grado di riconoscere specifici anticorpi circolanti nel plasma e questi antigeni sono responsabili della differenziazione tra i vari gruppi sanguigni.

I globuli bianchi o leucociti comprendono tre tipi di cellule: i granulociti, dotati di nuclei multilobati, i linfociti e i monociti, dotati di nuclei tondeggianti. I primi includono i neutrofili, i quali costituiscono la prima linea di difesa e sono capaci di ingerire e distruggere i batteri, gli eosinofili, che aumentano di dimensioni e si attivano in presenza di alcune infezioni e allergie, e i basofili, che si trovano principalmente al di fuori del sangue e secernono un anticoagulante chiamato eparina e una sostanza che stimola la reazione infiammatoria, nota come istamina. I linfociti svolgono un ruolo fondamentale nella produzione degli anticorpi e nell'immunità cellulare, mentre i monociti ingeriscono le sostanze estranee inglobandole per fagocitosi e promuovendo l'attività anticorpale; entrambi sono costituenti importanti del sistema immunitario. La formazione dei leucociti inizia nel midollo osseo con una cellula staminale totipotente, seguendo poi vie differenti per la maturazione.

Ed infine le piastrine, elemento figurato di nostro maggior interesse, chiamate anche trombociti, sono dei frammenti cellulari che originano dai megacariociti presenti nel midollo osseo e originati a loro volta da una cellula staminale totipotente. Questa cellula subisce una maturazione per endomitosi (divisione nucleare, ma non citoplasmatica) dando origine al megacarioblasto e successivamente al megacariocita da cui si formano da 2.000 a 8.000 piastrine in 3-12 ore. La maggior parte dei megacariociti resta nel midollo osseo e libera le piastrine nel sangue circolante, alcuni invece possono entrare nel sangue e farsi trasportare in altri organi, particolarmente nel polmone, ove rimangono e producono trombociti. Le piastrine appaiono come piccoli corpuscoli sferici, ovali o allungati, delimitati da membrana, anucleati e con un diametro di 2-4 μm , quelle più grandi sono più giovani e quindi metabolicamente e funzionalmente più attive, invecchiando, subiscono un processo di frammentazione e perciò risultano di dimensioni inferiori. Esse sono presenti nel sangue in un numero variabile da 150.000 a 350.000 per microlitro e hanno una vita media di circa 10 giorni, se non vengono consumate nel processo di coagulazione, vanno incontro ad una distruzione ad opera dei macrofagi del fegato e della milza. Le piastrine contengono due specifici tipi di granuli, quelli α che esprimono sulla loro membrana la molecola di adesione P-selectina e contengono

fibrinogeno, fibronectina, il fattore V e vWF, il fattore piastrinico 4, il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) e il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β); gli altri granuli sono i corpi densi o granuli δ che contengono nucleotidi dell'adenina (ADP e ATP), ioni calcio, istamina, serotonina ed epinefrina.

L'emostasi:

Le piastrine hanno diverse funzioni:

- Emostasi: esse sono dotate della capacità di aderire ai margini dei vasi e di aggregarsi formando il cosiddetto trombo bianco piastrinico; facilitano inoltre la formazione di fibrina liberando importanti fattori della coagulazione e partecipano alla retrazione del coagulo.
- Infiammazione: oltre a svolgere un ruolo nell'emostasi, le piastrine liberano anche sostanze biologicamente attive che hanno un ruolo nella risposta infiammatoria. Ammine vasoattive, quali la serotonina e l'istamina, possono contribuire ad iniziare la risposta infiammatoria; inoltre i neutrofilo e i monociti producono sostanze che attivano le piastrine, promuovendone l'aggregazione e inducendo la liberazione di nuove sostanze vasoattive.
- Fagocitosi: le piastrine fagocitano batteri e piccole particelle e legano le endotossine collaborando alla detossificazione del plasma. Il materiale estraneo di piccole dimensioni è fagocitato attraverso il sistema di canali esistente sulla membrana.

La funzione più importante delle piastrine è nell'emostasi, cioè il meccanismo che minimizza o previene la perdita di sangue in seguito ad un danno endoteliale, essa è caratterizzata da diverse fasi:

- Fase vascolare: subito dopo la lesione si ha una vasocostrizione locale grazie ad un fattore che è l'endotelina e la riduzione del flusso ematico,

- Fase piastrinica: con la formazione del “trombo bianco”. Questa fase avviene entro pochi minuti dalla lesione e, insieme alla fase vascolare, costituisce il processo noto come emostasi primaria, che in genere è sufficiente a riparare le lesioni capillari.
- Fase coagulativa: nel caso di lesioni più profonde l'emostasi primaria non è sufficiente a riparare il danno, si ha perciò la trasformazione della protrombina in trombina, la quale converte il fibrinogeno in fibrina, formando il coagulo o “trombo rosso”.
- Fase fibrinolitica: infine c'è la retrazione del coagulo, grazie ad una proteina contrattile, la trombostenina. Dopo che l'emorragia è stata arrestata, il coagulo viene gradualmente dissolto mediante la degradazione della fibrina in frammenti solubili ad opera dell'enzima plasmina.

La fase dell'emostasi che ci interessa maggiormente è quella piastrinica.

In stato di quiescenza, l'endotelio è in grado di assicurare la fluidità del sangue mediante un complesso meccanismo anticoagulante, dato da un equilibrio tra PGI_2 e TXA_2 , mentre, in seguito ad un danno vascolare, le piastrine entrano in contatto con i componenti della matrice extracellulare, questi includono collagene, proteoglicani, fibronectina, fattore di von Willebrand (vWF) e altre glicoproteine. La risposta delle piastrine a questo stimolo può essere suddivisa in varie fasi: adesione e attivazione, cambiamento morfologico, secrezione dei granuli, aggregazione.

Il processo di adesione, come pure l'aggregazione piastrinica, dipende dalla presenza di molecole di adesione e recettori che si trovano sulla superficie delle piastrine e che, per la maggior parte, appartengono alla superfamiglia delle integrine, le quali sono composte da due catene peptidiche, alfa e beta. L'adesione alla matrice extracellulare può verificarsi attraverso i recettori piastrinici per il collagene (GPIa/IIa-GPVI) e il legame con la fibronectina (GPIc/IIa) e la laminina (VLA-6), l'adesione delle piastrine al sottoendotelio è consolidato dal vWF che si lega con una parte specifica della sua molecola al collagene e con un altro sito al complesso GPIb/IX, esso gioca un ruolo prioritario in quanto è il solo meccanismo conosciuto capace di stabilizzare l'iniziale adesione piastrinica contro le forze del flusso

sanguigno che tenderebbero a separarle. L'esposizione del complesso glicoproteico GPIIb/IIIa, dopo modificazione conformazionale, è l'evento finale comune dell'attivazione piastrinica e costituisce la premessa essenziale per il processo di aggregazione, esso permette il legame del fibrinogeno, molecola dotata di struttura bipolare che si attacca a due piastrine adiacenti provocandone l'aggregazione; inoltre l'attivazione comporta il cambiamento morfologico e il rilascio di fattori dai granuli piastrinici, come l'adenosin difosfato (ADP), la serotonina, il calcio e altri fattori importanti per la successiva cascata coagulativa (Fattore IV, Fattore V, Fattore XIII) o la produzione di sostanze quale l'eicosanoide trombossano A₂ (TXA₂). L'insieme di questi fattori favoriscono il reclutamento di altre piastrine sopra il primo strato, in modo da formare il tappo piastrinico primario, che risulta reversibile fino a quando, con l'attivazione della cascata della coagulazione, viene prodotta trombina.

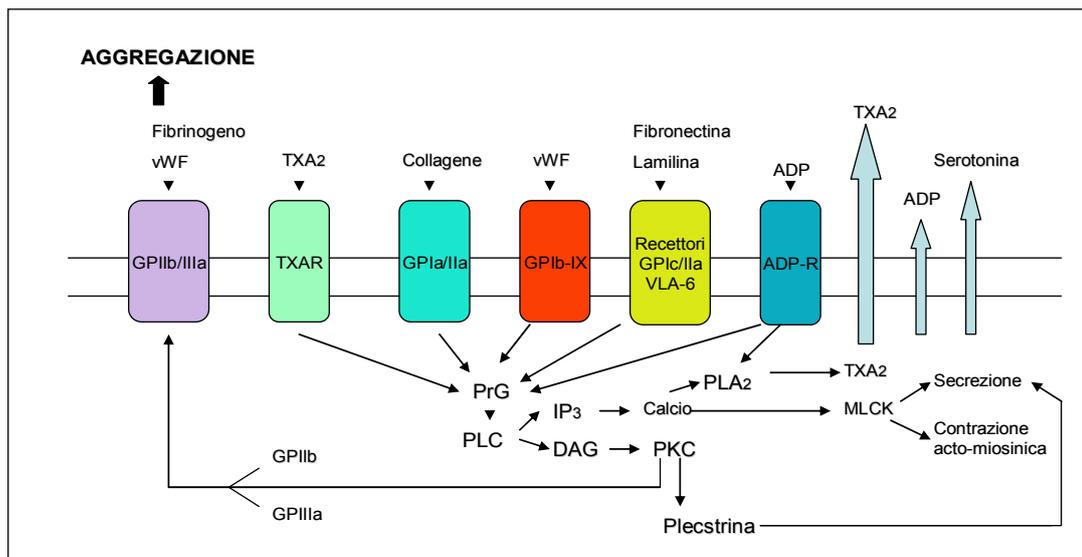


Figura 1

Come si vede nella figura, l'interazione coi recettori comporta una serie di eventi biochimici intracellulari che vanno sotto il nome di trasduzione del segnale, esso ha come scopo finale quello di provocare l'aggregazione piastrinica. Tra i meccanismi più importanti per la trasduzione del segnale vanno ricordate l'attivazione di alcune

fosfolipasi (PL): la PLA₂ dalla quale si ottiene l'acido arachidonico e nei successivi step le prostaglandine e il trombossano, potente vasocostrittore e attivatore dell'aggregazione, la PLA₂ viene stimolata sia dall'accoppiamento dell'ADP con i suoi recettori purinergici sia dall'aumento delle concentrazioni di calcio intracellulari; i recettori della laminina, fibronectina, collagene e vWF vanno ad attivare la PLC con la formazione di diacilglicerolo (DAG), il quale attiva la PKC e inositolo trifosfato (IP₃) che invece induce il rilascio di Ca²⁺ a livello intracellulare. Il rilascio di calcio attiva la Myosin light chain kinase (MLCK) che può così fosforilare le catene leggere della miosina, interagendo con l'actina e provocare la modificazione morfologica delle piastrine, consolidare il tappo e liberare le sostanze contenute nei granuli. Parallelamente, la PKC fosforila ed attiva una proteina di 47 KDa, la plecstrina, che anch'essa induce il rilascio dei granuli, inoltre questo enzima favorisce l'esposizione del complesso glicoproteico GPIIb/IIIa in forma attiva.

Se lo stimolo è limitato l'aggregazione è reversibile, se invece è di maggiore entità si ha una notevole produzione di trombossano e la liberazione di ADP, i quali innescano una reazione autocatalitica che induce l'amplificazione dell'aggregazione piastrinica.

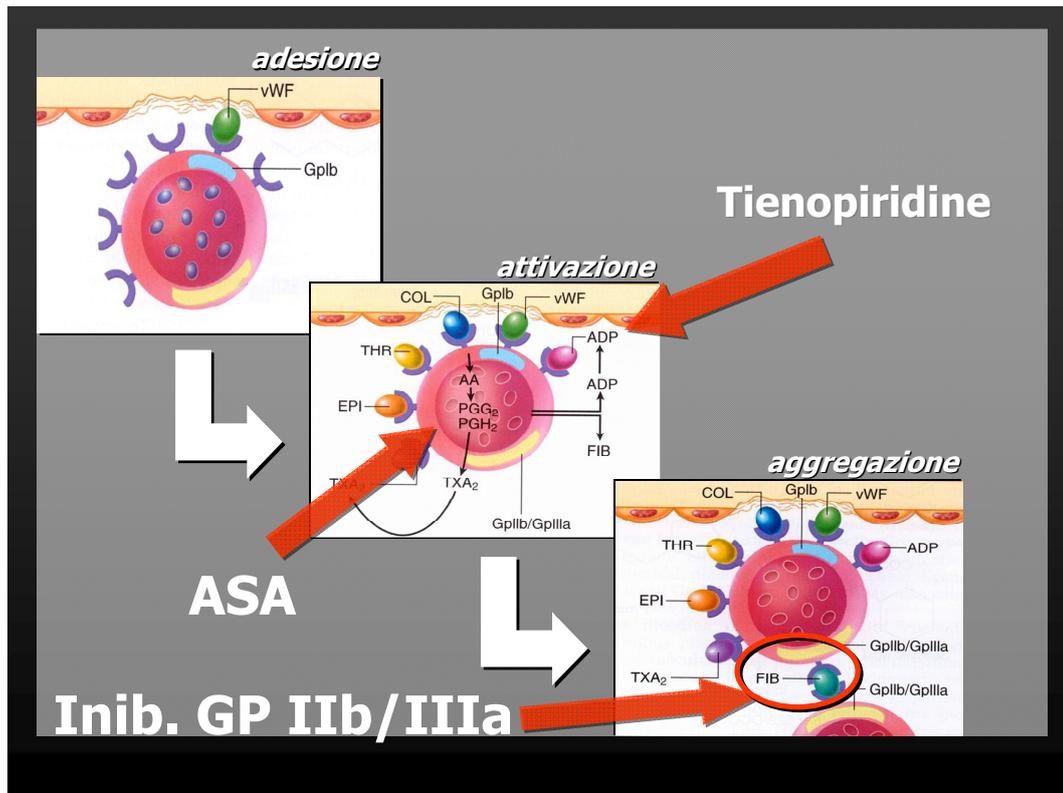


Figura 2

Un altro importante ruolo delle piastrine è nell'infiammazione: vengono rilasciate sostanze biologicamente attive, quali ammine vasoattive, come la serotonina e l'istamina, che possono contribuire ad iniziare la risposta infiammatoria; inoltre i neutrofili e i monociti producono sostanze che attivano le piastrine, promuovendone l'aggregazione e inducendo la liberazione di nuove sostanze vasoattive.

La patologia:

Come abbiamo già visto, la principale funzione fisiologica delle piastrine in condizioni di normalità è l'emostasi, ma sottoposte a condizioni fisiopatologiche le piastrine possono provocare trombosi, processo patologico in cui un aggregato piastrinico e/o un coagulo di fibrina occlude un vaso sanguigno.

Tre fattori principali predispongono alla formazione del trombo, la cosiddetta triade di Virchow:

- *danno endoteliale*, che è il fattore principale e può da solo causare trombosi, specialmente a livello del cuore e nella circolazione arteriosa, per esempio dove si è verificato un infarto del miocardio o valvuliti, sulla superficie di una placca aterosclerotica ulcerata o in vasi danneggiati da traumi o infiammazioni;
- *alterazione del flusso sanguigno*, la turbolenza contribuisce alla trombosi arteriosa e cardiaca causando danno o disfunzione endoteliale, formando correnti che vanno in senso contrario al flusso sanguigno e stasi, principale fattore di trombi venosi.
- *ipercoagulabilità*: contribuisce meno frequentemente allo stato trombotico, ma è comunque un fattore importante, può essere classificata in primitiva o genetica e secondaria o acquisita.

Un trombo arterioso è costituito dal cosiddetto “trombo bianco” formato soprattutto da piastrine e leucociti in una rete di fibrina. E’ generalmente associato all’aterosclerosi ed il suo principale effetto è quello di interrompere il flusso sanguigno, provocando ischemia o morte del tessuto a valle. Il trombo venoso invece è costituito dal “trombo rosso” di composizione simile ad un coagulo sanguigno, che staccandosi totalmente o in parte dalla parete può formare un embolo, causando morte o danni rilevanti.

La composizione, la velocità di crescita e la modalità di organizzazione del trombo variano in funzione dell’intensità e della durata dello stimolo trombogenico. Il deficit di fattori trombotici e fibrinolitici può influenzare la crescita e l’estensione del trombo; in generale tanto più intenso è lo stimolo, tanto più rapida è la crescita del trombo stesso e tanto maggiore è la componente di fibrina e globuli rossi, che può causare rapidamente l’occlusione completa del vaso in pochi minuti. Più frequentemente però lo stimolo trombogenico non è così intenso da sopraffare questi fattori e la deposizione delle piastrine e quindi la crescita del “trombo bianco” è progressiva negli anni.

Le malattie cardiovascolari rappresentano ancor oggi la principale causa di morte nel nostro Paese e chi sopravvive ad un attacco cardiaco generalmente diventa un malato cronico.

Le malattie tromboemboliche e trombotiche sono molto frequenti e determinano gravi conseguenze tra cui l'infarto del miocardio, l'infarto cerebrale o ictus, trombosi venose profonde ed embolia polmonare. I farmaci principalmente utilizzati per la prevenzione del trombo rosso sono gli anticoagulanti orali (warfarin) e iniettabili (eparina), mentre il nostro interesse si porrà sui farmaci comunemente utilizzati per i "trombi bianchi", ovvero sugli antiaggreganti piastrinici.

L'attivazione piastrinica può essere correlata a molteplici fattori di rischio¹, divisi in non modificabili e potenzialmente controllabili:

1. Polimorfismo genetico: modificazioni a livello dei geni, i quali possono venir ereditati dalla prole e questo comporta una maggiore predisposizione, ma anche la possibilità di attuare delle misure preventive.
2. Stati patologici: *malattie cardiovascolari* le quali possono venir distinte in croniche (angina pectoris) e in acute (MI), l'*ipertensione* è associata a iperaggregazione e aumentati livelli di TXA₂ nel sangue, nelle urine e nei tessuti. Un'altra malattia da tenere in considerazione è l'*iperlipidemia*, infatti si è notato che negli individui con elevati livelli di fibrinogeno, trigliceridi e LDL, l'insorgenza delle malattie cardiovascolari è superiore; il *diabete mellito* sia di tipo I, giovanile, che di tipo II, senile, viene riconosciuto anch'esso come uno dei più importanti fattori scatenanti; recenti evidenze hanno dimostrato che, accanto ai tradizionali fattori di rischio, altri eventi contribuiscono ad aumentare il rischio di MCV (malattie cardiovascolari), tra questi un livello elevato di *omocisteina*, un aminoacido normalmente presente nel nostro organismo, esso danneggia l'endotelio dei vasi, ossida il colesterolo LDL, favorendo così la formazione della placca aterosclerotica, si può agire somministrando acido folico e vitamine B6 e B12.
3. Stile di vita: l'*età* e il *Sesso*, il rischio di malattie cardiovascolari è maggiore per l'uomo rispetto alla donna nella fascia di età precedente alla menopausa,

4. con l'aumentare dell'età il rischio cresce e dopo la menopausa il rischio tra i due sessi diventa molto simile. La causa dell'aumentata incidenza di malattie cardiovascolari con l'età dipende dalla concomitanza di diversi fattori di rischio, quali l'ipertensione, le dislipidemie e il diabete. Generalmente poi viene consigliato, soprattutto nelle persone a rischio, di svolgere un'*attività fisica* regolarmente, di tenere sotto controllo il peso corporeo, infatti *sovrappeso* e *obesità* sono fattori molto importanti e di seguire una dieta varia e bilanciata (si è visto che nei paesi del Nord Europa consumando molti acidi grassi omega-3 l'incidenza delle malattie cardiovascolari è molto ridotta), altri accorgimenti fondamentali sono quelli di moderare l'uso di sostanze alcoliche ed eliminare il fumo.

I farmaci:

Tutti questi fattori inducono la comparsa di malattie cardiovascolari, l'attivazione piastrinica è la maggiore responsabile della comparsa di queste problematiche, quindi la sua inibizione si è vista essere la miglior strategia per prevenire le trombosi arteriose, anche se spesso sono associate ad effetti collaterali, come l'aumento delle emorragie. Un ideale agente antiplastrinico dovrebbe andare a bloccare in maniera selettiva i meccanismi trombogeni senza interferire con la normale funzione piastrinica, purtroppo nessun farmaco presente sul mercato si attiene a queste indicazioni. I farmaci attualmente utilizzati sono generalmente ben tollerati, ma possono presentare una limitata efficacia, effetti collaterali e fenomeni di "resistenza", per questo motivo la ricerca continua a sviluppare nuovi e più efficaci farmaci antiplastrinici e antitrombotici.

Sulla superficie endoteliale delle piastrine sono presenti numerosi recettori fondamentali per gli stimoli fisiologici. Questo ha permesso lo sviluppo di diversi farmaci immessi sul commercio aventi vari meccanismi d'azione. In particolar modo si possono avere:

- I. inibitori della ciclossigenasi-1
- II. inibitori del complesso glicoproteico IIb/IIIa

- III. inibitori della fosfodiesterasi,
- IV. inibitori dei recettori del TXA₂.
- V. inibitori del recettore della trombina PAR-1
- VI. inibitori dei recettori purinergici P2Y₁₂ dell'ADP.

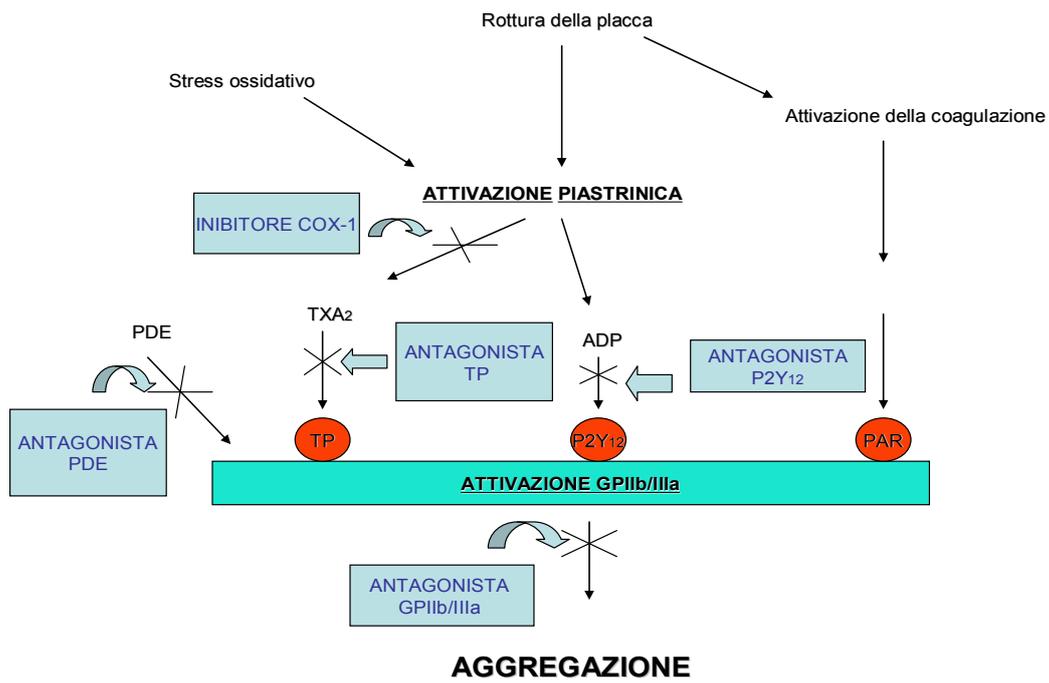
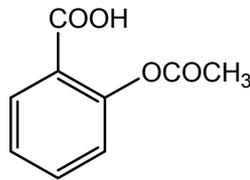


Figura 3

I. INIBITORI DELLA CICLOSSIGENASI-1



Acido acetil salicilico (ASA)

Il farmaco più conosciuto, meglio documentato, più tollerato ed economico è l'Aspirina o meglio Cardioaspirina a basse dosi. L'acido acetilsalicilico, scoperto essere un buon antiaggregante negli anni '60, è attualmente considerato il farmaco di riferimento e di scelta nel trattamento dei pazienti con malattie tromboemboliche, è raccomandato nella fase acuta dell'infarto del miocardio e nella prevenzione secondaria di numerosi eventi cardiaci e cerebrovascolari, e ciò sulla base di rapporti beneficio/rischio e beneficio/costo nettamente favorevoli rispetto agli altri antiaggreganti.

L'azione antiaggregante dell'acido acetilsalicilico si manifesta per inibizione specifica dell'attività ciclo-ossigenasica delle piastrine, attraverso l'acetilazione della serina-530 della Ciclossigenasi (COX-1) ².

Questo è un enzima bifunzionale che ha sia attività ciclossigenasica, converte l'arachidonato in PGG₂, che perossidasi, converte PGG₂ in PGH₂, precursore di molte altre prostaglandine e trombossani. Sono stati identificati in particolare due suoi isoenzimi, la COX-1 che è ampiamente distribuita, sempre presente e svolge funzione di citoprotezione gastrica e la COX-2 che invece è inducibile al momento da stimoli esterni prevalentemente nelle cellule infiammatorie e immunologiche.

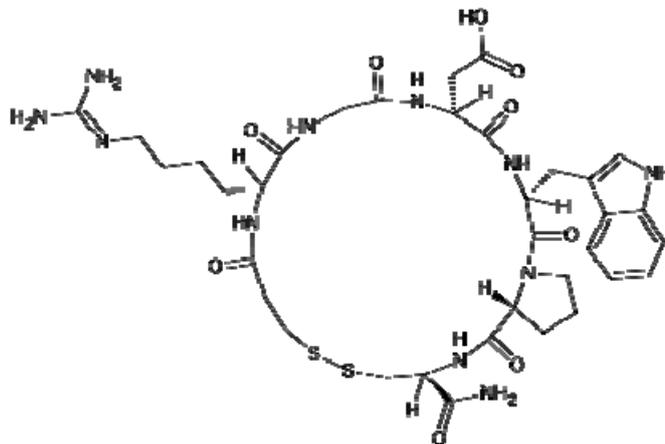
Nelle piastrine questo effetto inibitorio ha come risultato finale la ridotta produzione di prostaglandine ed in particolar modo del trombossano A₂, che è un forte agonista piastrinico. Questa inibizione è irreversibile per cui l'aggregazione piastrinica

trombossano A₂-dipendente può essere ripristinata solo dalla sintesi di nuove piastrine.

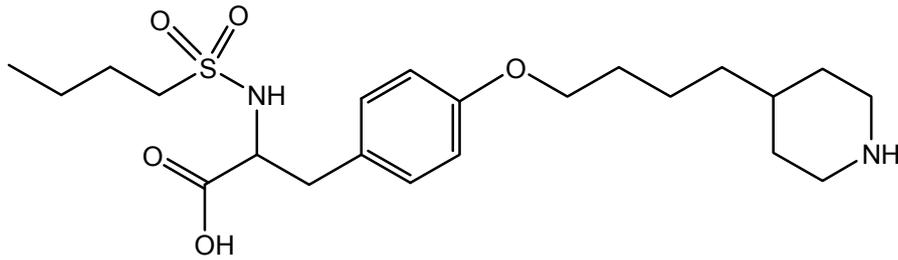
II. ANTAGONISTI DEL COMPLESSO GLICOPROTEICO I**b**/III**a**

I tre farmaci che appartengono a questa categoria (Eptifibatide, Tirofiban, Abciximab) hanno delle caratteristiche in comune: vengono utilizzati per via endovenosa e l'uso è generalmente ospedaliero da parte di medici specialisti e con l'assistenza di personale infermieristico, la somministrazione viene sempre associata ad acido acetilsalicilico per via orale ed infusioni di eparina non frazionata.

Essi vanno ad inibire reversibilmente il recettore glicoproteico I**b**/III**a**; tale complesso svolge un ruolo fondamentale nel legame col fibrinogeno, il fattore di von Willebrand, la fibronectina e la vitronectina, la sua attivazione rappresenta la via finale comune per l'aggregazione piastrinica.



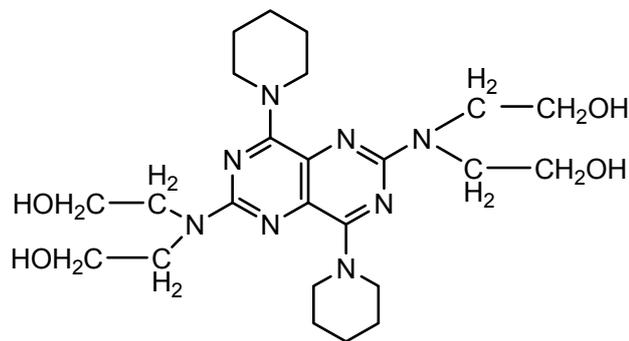
Eptifibatide



Tirofiban

L'Eptifibatide è un eptapeptide ciclico sintetico contenente sei aminoacidi, mentre il Tirofiban è un peptidomimetico, entrambi inibitori dell'aggregazione piastrinica e appartenenti alla classe degli RGD (Arg-Gly-Asp) mimetici. L' Abciximab è il frammento Fab dell'anticorpo monoclonale chimerico IgG1 prodotto da una linea cellulare ricombinante in coltura a perfusione continua. Esso inibisce l'aggregazione piastrinica prevenendo l'attivazione dei recettori GPIIb/IIIa presenti sulle piastrine attivate, inoltre si lega al recettore della vitronectina sulle cellule endoteliali, esso è responsabile delle proprietà pro-coagulanti delle piastrine e delle proprietà proliferative delle cellule endoteliali e muscolari lisce della parete vasale.

III. INIBITORI DELLA FOSFODIESTERASI

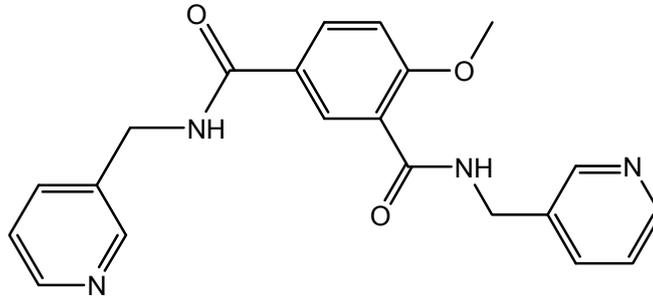


Dipiridamolo

Il Dipyridamolo è un composto pirimidopirimidinico con proprietà coronarodilatanti. Viene indicato in caso di insufficienza coronarica, angina, coronaropatie, profilassi dell'infarto, patologie a livello cardiaco, cerebrale e renale da aumentata aggregabilità piastrinica. E' caratterizzato da un sinergismo di diversi meccanismi d'azione, tutti incentrati sull'aumento dei livelli di AMP ciclico intrapiastrinico. Innanzitutto è un potente inibitore della fosfodiesterasi (PDE), enzima responsabile della rapida conversione dell'AMP ciclico in AMP. Il Dipyridamolo è anche capace di indurre la liberazione di prostaciclina vasodilatatrice (PGI₂) dalle cellule endoteliali e di potenziarne gli effetti; più recentemente è stato dimostrato che il Dipyridamolo inibisce la captazione di adenosina, inibitore fisiologico della funzione piastrinica, da parte di varie cellule ematiche. L'adenosina così accumulata a livello dei recettori della membrana piastrinica stimolerebbe quindi l'enzima adenilciclasi con conseguente aumento dei livelli di AMP ciclico. I farmaci antiaggreganti piastrinici se utilizzati da soli possono avere una efficacia limitata, per questo spesso più molecole con meccanismi d'azione differenti, vengono combinati tra di loro in modo da potenziarne l'efficacia preventiva.

Da gennaio 2008 è stato lanciato sul mercato italiano un farmaco, associazione tra dipyridamolo e acido acetilsalicilico a rilascio modificato (**AGGRENOX**), indicato nella prevenzione dell'ictus in pazienti con precedenti attacchi ischemici transitori o ictus ischemico completo dovuto a trombosi. Questo farmaco ha il vantaggio di avere un sinergismo di meccanismi d'azione: inibizione delle ciclossigenasi, inibizione delle fosfodiesterasi, inibizione della captazione di adenosina, stimolazione della biosintesi e rilascio di prostaciclina.

IV. INIBITORI DEI RECETTORI DEL TXA₂

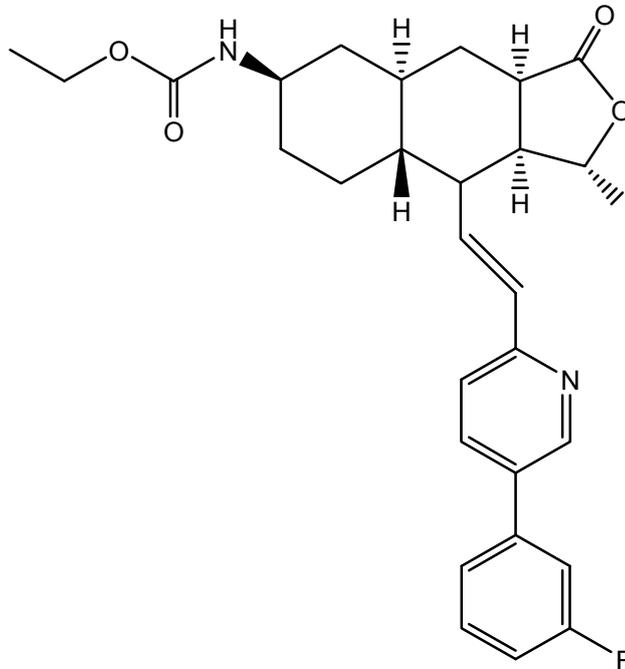


Picotamide

La Picotamide monoidrata in commercio dall'87, presenta un profilo farmacologico caratterizzato da attività antiaggregante piastrinica e fibrinolitica, il suo impiego prevalente è nei disturbi tromboembolici in cui è indicata un'inibizione della reattività piastrinica e un'attivazione del potenziale fibrinolitico, ad esempio nell'infarto del miocardio, nelle trombosi venose e arteriose, nei disturbi cerebrovascolari, nelle embolie polmonari e negli stati aterosclerotici.

La Picotamide è un farmaco antiaggregante ed interviene sulla funzionalità piastrinica attraverso due meccanismi d'azione, infatti va ad inibire sia la trombassano-sintetasi, enzima in grado di convertire la PGH₂ in TXA₂, che ad antagonizzare i recettori TP piastrinici.

V. INIBITORI DEL RECETTORE DELLA TROMBINA PAR-1



SCH-530348

Questa è una nuova molecola in fase di studio per la prevenzione di eventi aterotrombotici in pazienti con ACS (sindrome coronarica acuta) e infarto. Viene somministrata per via orale e agisce inibendo il recettore della trombina PAR-1, il quale è associato a proteine Gi, inibendo così l'attivazione indotta dalla trombina e la conseguente formazione del trombo.

VI. INIBITORI DEL RECETTORE PURINERGICO P2Y₁₂

I RECETTORI PURINERGICI

I recettori purinergici sono recettori che hanno come ligandi nucleotidi e nucleosidi di tipo purinico e pirimidinico. Essi sono divisi in due vasti sottogruppi denominati P1 e P2.

I recettori P1 sono classificati in 4 sottotipi: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, sulla base della loro diversa struttura molecolare; essi si differenziano anche nella distribuzione tissutale e profilo farmacologico. Sono recettori accoppiati alle proteine G il cui ligando naturale è l'adenosina. L'interazione dell'adenosina si traduce nell'attivazione di particolari proteine G con conseguente aumento o diminuzione dei livelli di AMP ciclico e, in qualche caso, aumento di inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃)³.

Più complessa è la situazione per i recettori P2. Essi infatti sono classificati in due principali gruppi: recettori P2X, di cui si conoscono 7 sottotipi (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) e sono tutti recettori a canale permeabili a sodio, potassio e calcio, e recettori P2Y, di cui si conoscono diversi sottotipi (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) e sono recettori accoppiati alle proteine G. Questi sottotipi recettoriali presentano diversi meccanismi di trasduzione. I recettori P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ provocano stimolazione della fosfolipasi C con formazione di inositolo trifosfato, il recettore P2Y₁₁ provoca stimolazione della fosfolipasi C e dell'adenilato ciclasi con conseguente aumento di inositolo trifosfato e di AMP ciclico, i recettori P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ provocano inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione dell'AMP ciclico⁴.

Classe recettoriale	P1	P2
Ligando endogeno	adenosina	ATP, ADP, di nucleotidi adeninici, UTP
Sistema effettore	Proteina G	Proteina G Canale ionico
Sottogruppo	---	P2X , P2Y
Sottotipi	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} e A ₃ ,	P2X ₁₋₇ , P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁₋₁₄

Tabella 1. Suddivisione dei recettori per le purine in P1 e P2.

I sottotipi recettoriali P2Y hanno le tipiche caratteristiche dei recettori accoppiati alle proteine G; i G-protein coupled receptors (GPCRs) costituiscono una famiglia molto vasta di proteine integrali di membrana, caratterizzate da una struttura a sette eliche transmembrana, con tre loops extracellulari e tre loops intracellulari; essi mediano una grande varietà di processi fisiologici.

Sulla superficie delle piastrine possiamo trovare tre tipi di recettori purinergici P2X₁, che ha come agonista l'ATP ed è responsabile dell'entrata del calcio e della modificazione conformazionale delle piastrine, P2Y₁ e P2Y₁₂, che invece vengono attivati dall'ADP ed hanno un importante ruolo nella trombosi.

P2Y₁ è associato ad una proteina G_q, quindi alla PLC, mentre P2Y₁₂ ad una proteina G_i ed è il recettore su cui vanno ad agire le Tieno tetraidropiridine. La co-attivazione di entrambi i recettori P2Y è importante per l'aggregazione indotta da ADP. Tutti e tre questi recettori sono in grado di inviare segnali di attivazione piastrinica, ovvero promuovono una serie di meccanismi intracellulari che portano poi le piastrine a cambiare conformazione ed aggregarsi tra loro, formando quindi in condizioni fisiologiche il tappo piastrinico ed in condizioni patologiche il trombo.

In particolare il recettore P2Y₁₂, un recettore costituito da 342 aminoacidi⁵ e con una distribuzione tissutale ristretta (al contrario degli altri sottotipi che sono pressoché ubiquitari) ad alcune zone del cervello, alla muscolatura liscia dei vasi e

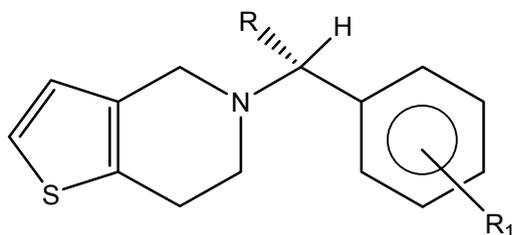
alle piastrine ^{5,6,7}, è fortemente coinvolto nella regolazione dell'omeostasi e in fenomeni trombotici. Esso esercita la propria azione, attivando una proteina presente sulla parte interna della membrana piastrinica, la proteina G inibitoria (G_i), che a sua volta inibisce un'altra proteina, l'adenilato ciclasi, con conseguente diminuzione della concentrazione intrapiastrinica di adenosin-monofosfato-ciclico (AMPc); i livelli di AMPc sono inversamente correlati con lo stato di attivazione piastrinica e dunque una sua diminuzione contribuisce ad attivare le piastrine. L'ADP rappresenta l'agonista fisiologico mentre l'ATP rappresenta l'antagonista di tale recettore; quindi ADP induce aggregazione piastrinica tramite inibizione dell'adenilato ciclasi, via G_i . Conseguentemente il legame con l'antagonista ATP provoca inibizione dell'aggregazione tramite aumento di AC via G_s ⁸. Da questo meccanismo risulta che il recettore $P2Y_{12}$ può essere un potenziale target per la progettazione di farmaci antitrombotici.

I FARMACI

Gli inibitori del recettore $P2Y_{12}$ sono molecole con diversa struttura. Sono i farmaci più innovativi verso i quali la ricerca sta rivolgendo l'attenzione; sono definiti come i nuovi antiaggreganti piastrinici in grado di impedire il legame tra ADP e $P2Y_{12}$ e conseguentemente ridurre l'attivazione piastrinica.

Le prime strutture sono delle Tieno tetraidro piridine (tra cui Clopidogrel, Prasugrel e Ticlopidina) continuando con derivati dell'ATP (tra cui Cangrelor e AZD6140) fino al composto di ultimissima generazione a base antrachinonica, sviluppato a partire dal reactive blue.

a. Tieno tetraidropiridine:



Ticlopidina: R= H, R₁= Cl

Clopidogrel: R= CO₂ CH₃, R₁= Cl

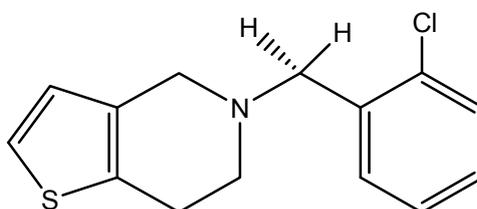
Prasugrel: R= CO-ciclopropile, R₁= F

Le Tieno tetraidropiridine (Ticlopidina, Clopidogrel e Prasugrel) agiscono inibendo selettivamente il legame dell'adenosina-difosfato (ADP) al suo recettore piastrinico P2Y₁₂ impedendo l'attivazione del complesso GPIIb/IIIa mediata dall'ADP e di conseguenza provocando inibizione dell'aggregazione piastrinica.

Le Tieno tetraidropiridine, attraverso una proteina G_s stimolatoria, provocano attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) che gioca un ruolo importante come "secondo messaggero" nella regolazione di molte funzioni cellulari, con conseguente aumento di AMP ciclico al quale si accompagna una inibizione della mobilizzazione del calcio e dell'aggregazione piastrinica.

Le Tieno tetraidropiridine sono profarmaci e necessitano pertanto di attivazione in vivo^{9,10,11}.

- **Ticlopidina**



La Ticlopidina è un antiaggregante che, come l'ASA (Acido acetil salicilico), può vantare di un'adeguata documentazione clinica di efficacia; l'ASA è attualmente considerato l'antiaggregante di riferimento e di scelta nel trattamento dei pazienti con malattia tromboembolica, mentre la Ticlopidina è considerata alternativa o complementare all'ASA in determinate condizioni patologiche.

La Ticlopidina è indicata nella prevenzione secondaria di eventi ischemici occlusivi cerebro e cardiovascolari in pazienti a rischio trombotico. In pazienti con pregresso infarto miocardico e con pregressi attacchi ischemici transitori l'uso della Ticlopidina dovrebbe essere riservato a quei pazienti in cui l'acido acetilsalicilico è risultato inefficace o non ben tollerato; è inoltre indicata nella prevenzione della riocclusione dei by-pass aortocoronarici, nella circolazione extra-corporea, nella emodialisi e nella trombosi della vena centrale della retina.

Dal punto di vista farmacocinetico, dopo somministrazione di una dose unica di Ticlopidina per via orale (250 o 500 mg) la massima concentrazione plasmatica del principio attivo è raggiunta alla seconda ora ed il farmaco viene quasi completamente eliminato dal torrente circolatorio otto ore dopo la somministrazione. Alle dosi terapeutiche l'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta dalla Ticlopidina diviene significativa dopo 24-48 ore dall'inizio del trattamento; l'effetto massimo viene raggiunto in 4-7 giorni e scompare 7-10 giorni dopo la sospensione della terapia. Si è visto che con dosi superiori a 500 mg/die non si ha una maggiore attività antiaggregante.

Come si è già detto precedentemente la Ticlopidina non è attiva come tale e il suo metabolita attivo viene liberato solamente dopo metabolismo epatico, grazie al

citocromo P450, prevalentemente l'isoenzima CYP3A4. Il metabolita attivo va ad agire sul recettore P2Y₁₂ inibendolo in maniera selettiva ed irreversibile, rendendo così incapaci le piastrine di andar incontro ad aggregazione per la restante parte della loro vita. I metaboliti poi vengono escreti prevalentemente per via biliare (70%) e per via renale (30%).

È noto fin dalla prima commercializzazione del medicinale in Europa nel 1978, che la terapia con Ticlopidina è frequentemente gravata dal verificarsi di reazioni avverse di tipo ematologico: sono stati descritti casi di anemia aplastica, agranulocitosi, pancitopenia, ma soprattutto questo antiaggregante può provocare neutropenia, un evento che può essere anche letale in quanto si associa ad un aumentato rischio di gravi infezioni. La neutropenia di solito si manifesta nei mesi iniziali della terapia, mentre è infrequente nelle prime due - tre settimane di trattamento, generalmente è reversibile e si risolve interrompendo la somministrazione del farmaco.

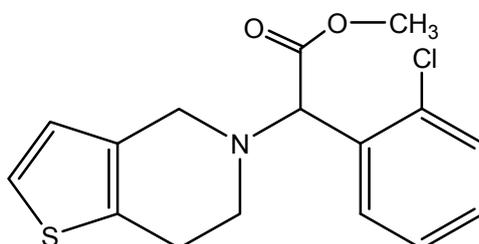
Un altro grave evento indesiderato della Ticlopidina, talora letale, è la porpora trombotica trombocitopenica (PTT) una sindrome caratterizzata da trombocitopenia, anemia emolitica, modificazioni neurologiche, insufficienza renale progressiva e febbre.

Dati questi eventi ematologici potenzialmente gravi, si consiglia di riservare la Ticlopidina alla prevenzione della riuclusione di stent coronarici, valutandone il rischio-beneficio, e ai casi in cui l'ASA risulti realmente controindicato, a causa della comparsa di questi effetti avversi gravi, l'impiego di questo medicinale è stato progressivamente limitato nel tempo in numerosi Paesi.

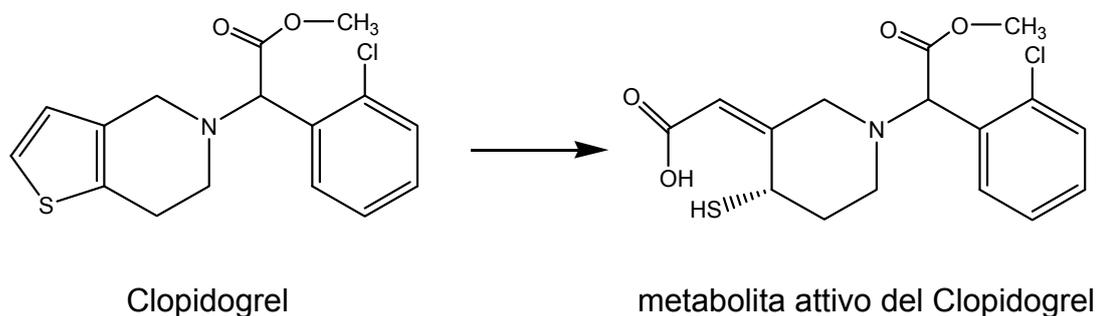
Altri effetti collaterali che possono incorrere sono disturbi gastrointestinali, soprattutto diarrea, nausea, dispepsia, rash cutaneo, prurito ed orticaria, vertigini.

Questo farmaco è controindicato in gravidanza ed allattamento, in pazienti che fanno uso di antinfiammatori non steroidei, anticoagulanti.

- **Clopidogrel (PLAVIX®)**



Clopidogrel è una Tieno tetraidropiridina di seconda generazione ed agisce con lo stesso meccanismo della Ticlopidina; esso differisce da quest'ultima solamente per la presenza di un gruppo carbossimetilico. E' un farmaco relativamente recente, la sua prima Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) è stata nel 1997 negli USA e nel 1998 in Europa. Clopidogrel è indicato nella prevenzione di eventi di origine aterotrombotica in pazienti affetti da infarto al miocardio, ictus ischemico o arteriopatia, pazienti affetti da sindrome coronarica: angina instabile, pazienti sottoposti a posizionamento di stent in seguito a intervento coronarico percutaneo, in associazione con acido acetilsalicilico (ASA). Un'inibizione significativa dell'aggregazione si raggiunge dopo 2-3 giorni di trattamento con 75 mg/die, mentre si impiegano 4-7 giorni per raggiungere l'inibizione massimale e scomparire 7-10 giorni dopo la sospensione della terapia. Dosi superiori a 75 mg/die non aumentano l'effetto antiaggregante. Dopo l'ingestione, il Clopidogrel subisce un metabolismo di primo passaggio epatico, la maggior parte (85%) della molecola viene metabolizzata dalle esterasi le quali producono un derivato carbossilico acido che risulta inattivo, il picco plasmatico di questo metabolita si ha dopo circa un'ora dall'assunzione, il 15 % rimanente, viene ossidato ottenendo così la forma attiva grazie agli isoenzimi 2B6 e 3A4 del citocromo P-450.



I risultati ottenuti con gli studi clinici sembravano suggerire che il Clopidogrel potesse sostituire la Ticlopidina in tutti i casi in cui l'ASA appariva realmente controindicato. In realtà, come per tutti i nuovi farmaci, una valutazione più esauriente del profilo di sicurezza del Clopidogrel è possibile solo attraverso un'attenta sorveglianza post-marketing, quando il farmaco è utilizzato nella pratica clinica reale su ampie popolazioni. Dopo la commercializzazione del farmaco, sono comparse in letteratura segnalazioni di nefropatia membranosa, artrite acuta, broncospasmo, angioedema e reazioni anafilattoidi, casi non osservati durante la sperimentazione clinica. Dato che il Clopidogrel agisce con il medesimo meccanismo d'azione della Ticlopidina, si è particolarmente soffermati sulla possibile comparsa di PTT (porpora trombotica trombocitopenia) e si è visto che può manifestarsi. Infatti, sulla prestigiosa rivista *The New England Journal Medicine* (Bennet CL et al, *N Engl J Med* 2000; 342: 1773-1777), è comparso un allarmante report su un grave, anche se raro, effetto indesiderato causato dal Clopidogrel: insorgenza di porpora trombotica trombocitopenica dopo solo 14 giorni dall'assunzione del farmaco. Gli 11 soggetti che hanno manifestato questa grave reazione avversa sono stati sottoposti a plasmateresi, ma un paziente è morto. Negli studi di fase III, preliminari all'entrata in commercio del Clopidogrel, non erano mai stati segnalati effetti indesiderati gravi con questo antiaggregante piastrinico. Dopo il report del *New England Journal Medicine* sono emersi altri casi di porpora trombotica trombocitopenica. Altri effetti collaterali sono: emorragie (GI e intracraniche), nausea, vomito, diarrea,

stipsi, ulcere, cefalea, vertigini, rush, prurito, neutropenia, allucinazioni, disordini epatici e biliari.

Così come per altri farmaci antiaggreganti piastrinici, Clopidogrel deve essere usato con cautela nei pazienti che possono essere a rischio di aumentato sanguinamento in seguito a trauma, chirurgia o altre condizioni patologiche e nei pazienti in trattamento con ASA, farmaci antinfiammatori non steroidei compresi gli inibitori della COX-2, eparina o inibitori della glicoproteina IIb/IIIa. I pazienti devono essere accuratamente seguiti per individuare ogni segno di sanguinamento, inoltre è controindicato nei pazienti con insufficienza epatica grave.

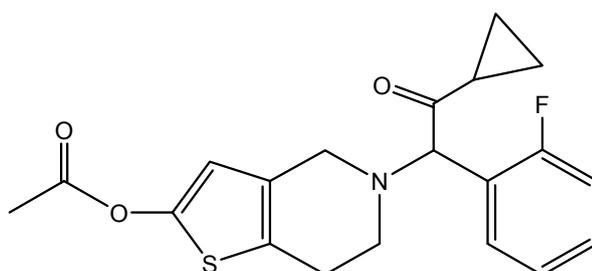
E' preferibile non usare Clopidogrel durante la gravidanza, inoltre hanno dimostrato che esso e/o i suoi metaboliti vengono escreti nel latte.

La sicurezza, efficacia e tollerabilità di Clopidogrel è stata valutata in più di 42.000 pazienti attraverso una serie di studi clinici, quali CAPRIE, CURE, CLARITY e COMMIT. In questi studi sono stati fatti dei confronti tra più farmaci, placebo e associazioni tra questi (es. CAPRIE: confronto tra Clopidogrel e Aspirina, CURE placebo+ ASA vs Clopidogrel+ASA).

Uno studio pubblicato sul *The New England Journal of Medicine* ha riscontrato che l'antiaggregante piastrinico Clopidogrel (Plavix), quando somministrato assieme all'Aspirina (Acido AcetilSalicilico), non è più efficace rispetto alla sola Aspirina nel ridurre l'incidenza di infarto miocardico, ictus o morte per cause cardiovascolari. Nello studio CHARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance), 15.603 pazienti con malattia cardiovascolare o multipli fattori di rischio per gli eventi cardiovascolari, sono stati assegnati in modo casuale a ricevere Clopidogrel 75mg/die in combinazione con Aspirina a basso dosaggio (75-162mg/die) oppure solamente Aspirina a basso dosaggio. I pazienti sono stati seguiti in media per 28 mesi. Tra i 7.802 pazienti che hanno ricevuto Clopidogrel ed Aspirina, il 6.8% (n = 534) è andato incontro ad infarto miocardico, ictus o morte per cause cardiovascolari, contro il 7.3% (573 di 7.801) di coloro che hanno assunto la sola Aspirina. La differenza in favore del Clopidogrel non è risultata statisticamente significativa. Nello studio CHARISMA, il 4.4% (n = 346) dei pazienti che hanno assunto la combinazione Clopidogrel ed

Aspirina hanno presentato episodi emorragici, riportati come sanguinamento fatale, sanguinamento moderato, sanguinamento grave o emorragia intracranica. Di contro, il 3.2% dei pazienti che hanno assunto la sola Aspirina ha manifestato uno di questi episodi emorragici. Pertanto, i pazienti che hanno assunto l'associazione Clopidogrel ed Aspirina hanno presentato un rischio maggiore dell'1.2%. I Ricercatori dello studio CHARISMA hanno concluso che *...la combinazione di Clopidogrel ed Aspirina non è risultata significativamente più efficace della sola Aspirina nel ridurre l'incidenza di infarto miocardico, ictus o morte per cause cardiovascolari tra i pazienti con malattia cardiovascolare stabile o con diversi fattori di rischio cardiovascolare.*

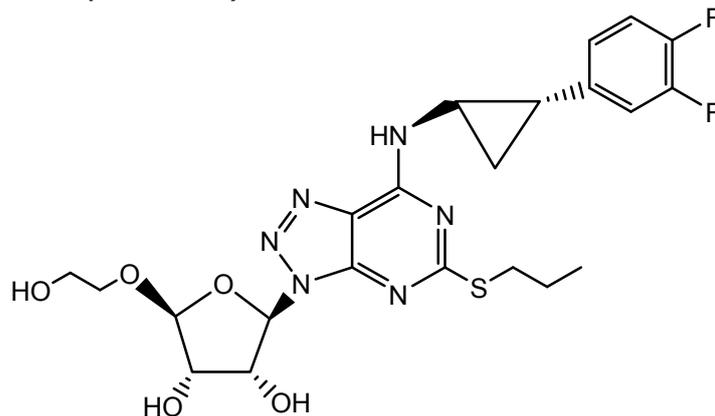
- **Prasugrel**



Prasugrel è la Tieno tetraidropiridina di terza generazione e come detto precedentemente è un pro farmaco che necessita di metabolismo epatico per l'attivazione. Dopo l'assorbimento, le carbossiesterasi dell'intestino e del sangue idrolizzano la molecola in un tiolattone farmacologicamente inattivo che molto rapidamente viene trasformato dal CYP nel suo metabolita attivo. Esso è in grado di legare irreversibilmente il recettore P2Y₁₂ attraverso delle interazioni sulfidriliche. Gli isoenzimi del CYP che partecipano alla conversione sono principalmente 3A e 2B6; 2C9 e 2C19 in maniera marginale.

dovuto all'altissima affinità che il Cangrelor possiede per il recettore P2Y₁₂ e fa sì che il metabolita del Clopidogrel non possa legarsi al recettore. L'importante vantaggio del Cangrelor è un'inibizione dell'aggregazione piastrinica senza bisogno di metabolizzazione epatica, il che significa breve latenza d'azione e minor variabilità d'azione. Purtroppo questo composto, come tutti gli ATP-congeneri presentano diversi problemi di instabilità metabolica dovuti alla presenza della catena fosfatidica che porta ad inattivazione dei farmaci. Per questo è stato sviluppato AZD6140 che manca dell'unità fosfatidica, ma presenta ancora buona attività.

- **Ticagrelor (AZD6140)**



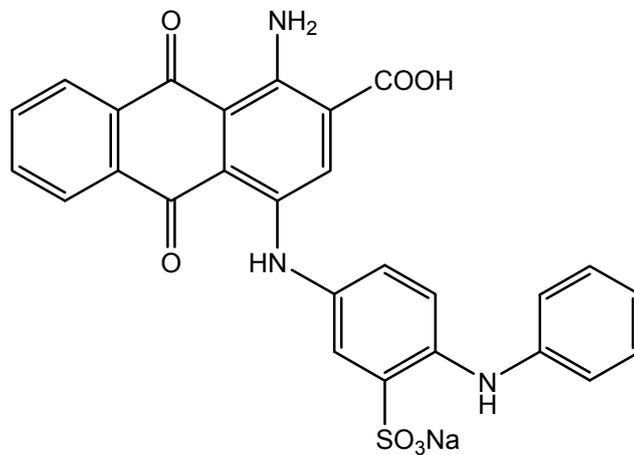
Il Ticagrelor è il prototipo di una nuova classe di farmaci antiaggreganti; è una ciclopentiltriazolopirimidina che va ad inibire in modo reversibile il recettore P2Y₁₂^{15,16}. Questa molecola deriva dall'ATP ed ha il vantaggio di avere una somministrazione orale, un'azione rapida, ed essere potente e reversibile. Inoltre, a differenza delle Tieno tetraidropiridine, non necessita di un'attivazione epatica, ma è attiva come tale; ciò riduce il rischio di interazioni farmacologiche.

Ticagrelor (AZD6140) è un inibitore dell'aggregazione piastrinica prodotto da AstraZeneca. Il trial clinico PLATO, conclusosi a metà del 2009, ha messo in

evidenza che nel trattamento delle sindromi coronariche acute Ticagrelor presenta una minore mortalità rispetto al Clopidogrel, anche se sembra ci sia un maggior rischio di sanguinamento¹⁷. (1) In altri studi di FASE II si è incontrata una maggior frequenza nella comparsa di dispnea e bradicardia.

c. Derivati antrachinonici

Recentemente sono stati sviluppati antagonisti del recettore P2Y₁₂ con nuovo nucleo di base, ovvero il nucleo antrachinonico. Lo sviluppo deriva dal Reactive Blue, un colorante noto come un antagonista non selettivo dei recettori P2 in generale ma con attività antagonista affine e selettiva verso il recettore P2Y₁₂ nel range nano molare. In particolare uno di tali composti, qui riportato, si è dimostrato il miglior antagonista disponibile del recettore P2Y₁₂¹⁸.



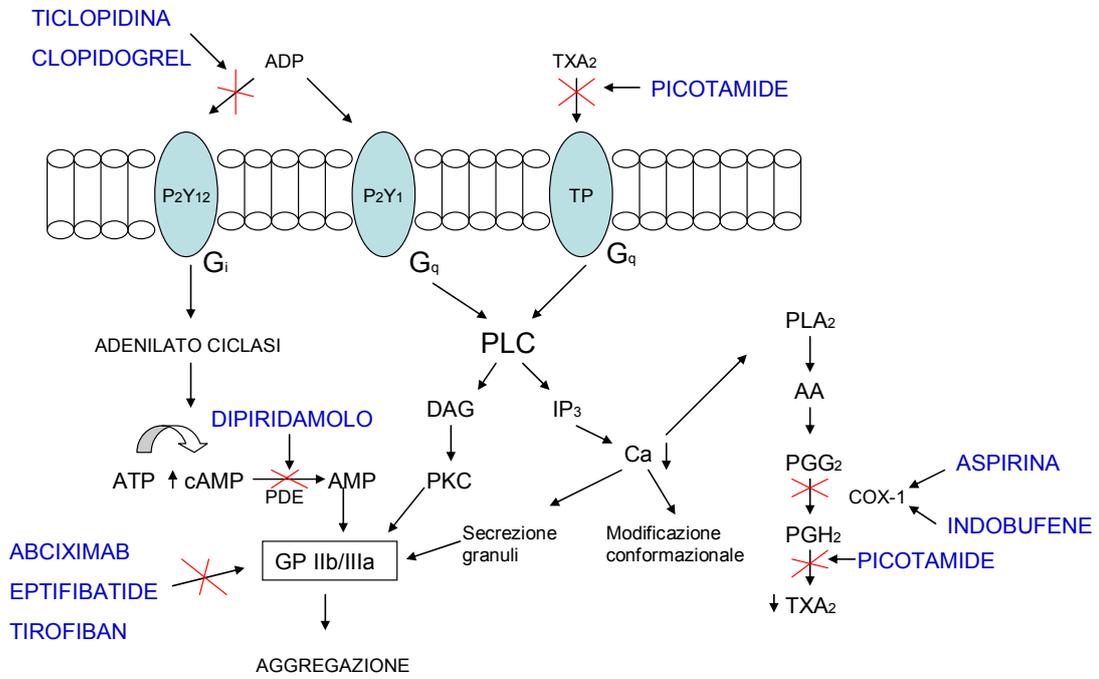


Figura 4

La figura riportata riassume i molteplici meccanismi d'azione implicati nell'aggregazione piastrinica.

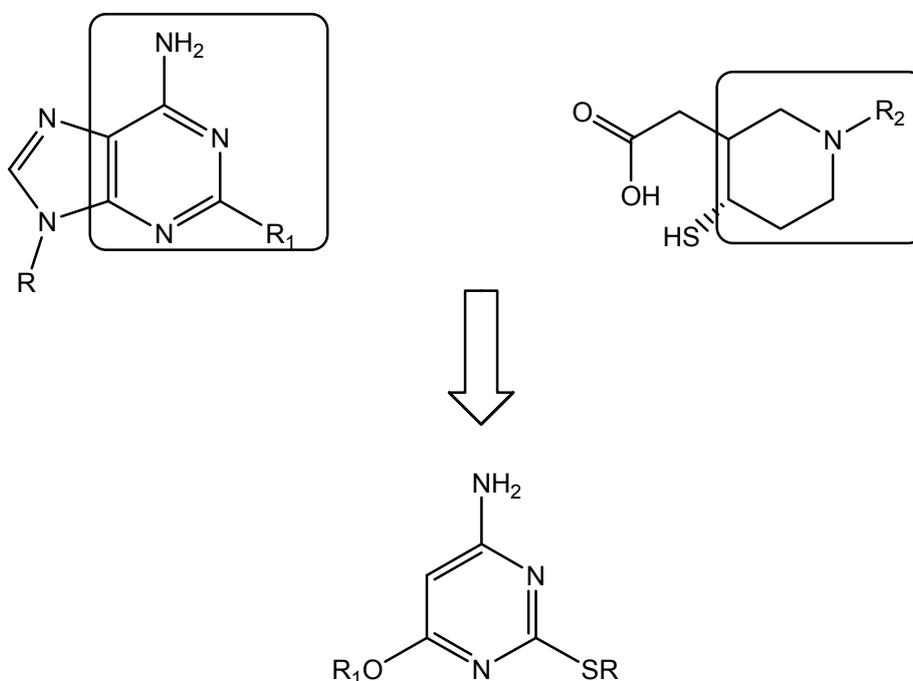
SCOPO DELLA TESI

La disponibilità di composti ad attività antagonista per il recettore P2Y₁₂ può avere un grande potenziale per lo sviluppo di una terapia farmacologica delle patologie cardiovascolari associate ad una alterata aggregazione piastrinica.

A partire dallo studio degli antagonisti attualmente noti in letteratura, è stato possibile individuare il nucleo del 6-ammino tiouracile come struttura di base comune per lo sviluppo di potenziali antagonisti di questo recettore.

La scelta di una semplice struttura monociclica deriva dall'osservazione della classe delle tieno tetraidropiridine che presenta attività in seguito ad un processo metabolico in cui si ha la rottura dell'anello tiofenico, per cui l'attività è imputabile alla semplice struttura piperidinica sostituita.

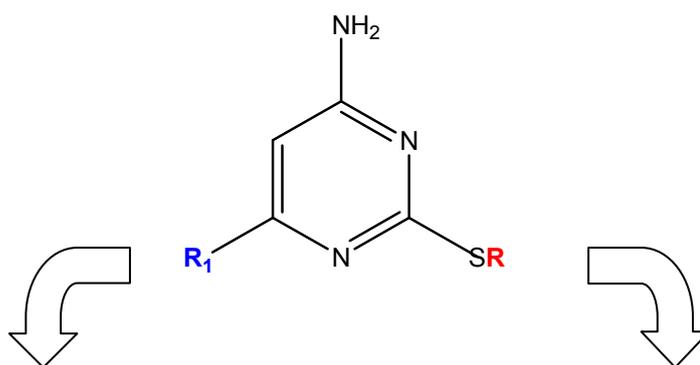
Inoltre, il nucleo del 6-ammino tiouracile, può essere visto come una estrema semplificazione strutturale dell'anello purinico sostituito, presente nella classe degli antagonisti del recettore P2Y₁₂ a struttura simile all'ATP.



Nella struttura scelta come piattaforma comune, abbiamo pensato di mantenere in posizione 6 la funzionalità amminica libera in analogia al gruppo amminico dell'ATP, e di introdurre sostituenti sullo zolfo in posizione 2 e sull'ossigeno in posizione 4.

Sono stati scelti sostituenti con diverse caratteristiche chimico fisiche per sondare il sito di legame. Tra questi abbiamo introdotto sostituenti alchilici e aril alchilici di varia natura sullo zolfo, in posizione 2, variamente combinati con sostituenti alchilici, aril alchilici e aril solfonici sull'ossigeno in posizione 4.

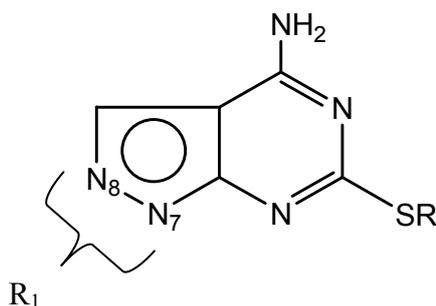
In questo schema sono stati riassunti tutti i sostituenti introdotti nelle posizioni 2, 4 e 6.



R_1
NH_2
NHTos
O-Para-toluen-solfonile
O-Dansile
O-2-Cl-benzensolfonile
O-2-Cl-benzile
O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
O- $\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$
O- CH_2COOH
O- CH_3
O-2-Metossi-Benzile
O-4-Metossi-Benzile
O-2-Fenil-Propile
O-2-Metil-Benzile
O-3-Metil-Benzile
O-4-Br-Benzile
O-4-F-Benzile
O-3-Cl-Benzile
O-2,4-Dicloro-Benzile
O-2,6-Dicloro-Benzile
O-3,5-Dimetil-Benzile

R
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTos}$
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
CH_2CF_3
CH_3
C_5H_{11}
2-Cl-Benzile

Per cercare di aumentare le interazioni con il recettore, abbiamo pensato di implementare la struttura molecolare, passando così da una struttura monociclica a una struttura biciclica strutturalmente più affine al nucleo purinico di base degli antagonisti ATP-correlati noti in letteratura. Abbiamo pensato a un nucleo pirazolo-pirimidinico in quanto isostero del nucleo purinico, su cui abbiamo introdotto sostituenti sullo zolfo in analogia con i composti sintetizzati nella serie monociclica, variamente combinati con sostituenti sull'azoto pirazolico.



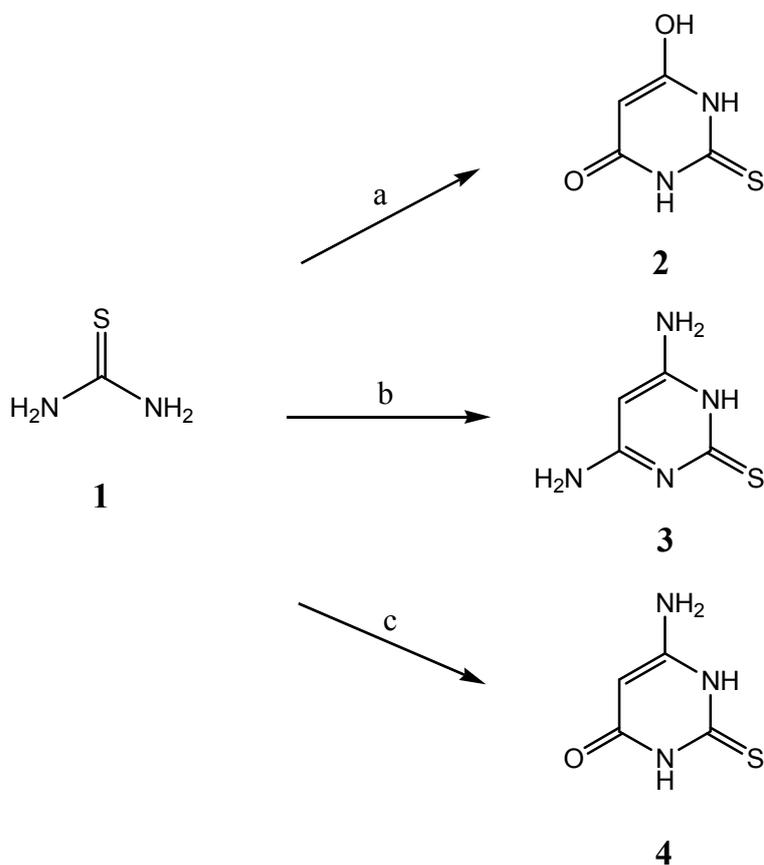
Composto	R	R ₁
22	H	N ₇ -H
28	H	N ₇ -CH ₃
36	H	N ₈ -2,4-dicloro-Benzile
29a	CH ₂ CH ₂ NHBoc	N ₇ -CH ₃
29f	CH ₂ CH ₂ NH ₂	N ₇ -CH ₃
37	CH ₂ CH ₂ NH ₂	N ₈ -2,4-dicloro-Benzile
29b	CH ₂ CH ₂ NHTos	N ₇ -CH ₃
29e	CH ₂ CH ₂ COOEt	N ₇ -CH ₃
23	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -H
29d	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -CH ₃
24a	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -2-Cl-Benzile
24b	CH ₂ CH ₂ OH	N ₈ -2-Cl-Benzile
33a	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -2,4-dicloro-Benzile
33b	CH ₂ CH ₂ OH	N ₈ -2,4-dicloro-Benzile
29c	2-Cl-Benzile	N ₇ -CH ₃

SINTESI

La strategia di sintesi vede la preparazione di una struttura di base monociclica che viene successivamente alchilata in diverse posizioni.

La sintesi dei composti è semplice e di buona resa.

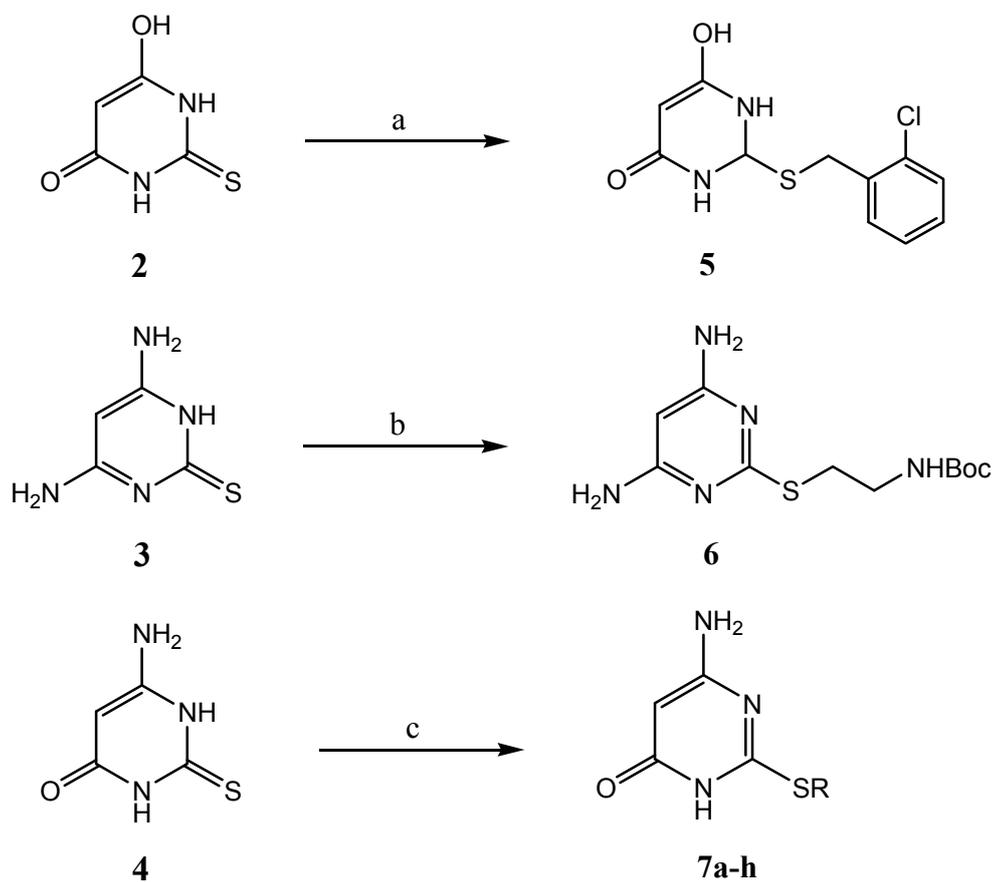
La struttura di base è ottenuta per condensazione della tiourea con opportuno agente condensante a dare i nuclei: 2,3-diidro-6-idrossi-2-tioxopirimidin-4(1H)-one; 4,6-diaminopirimidin-2(1H)-tione; 6-amino-2,3-diidro-2-tioxopirimidin-4(1H)-one (Schema 1).



Schema 1

Condizioni di reazione: a) EtONa, dietil malonato rfx, 3h; b) EtONa, malononitrile, rfx, 3h; c) EtONa, etil cianoacetato rfx, 3h.

I nuclei così ottenuti sono stati alchilati sullo zolfo in posizione 2 con vari agenti alchilanti (Schema 2) in ambiente basico per soda metanolica 0.1 M.

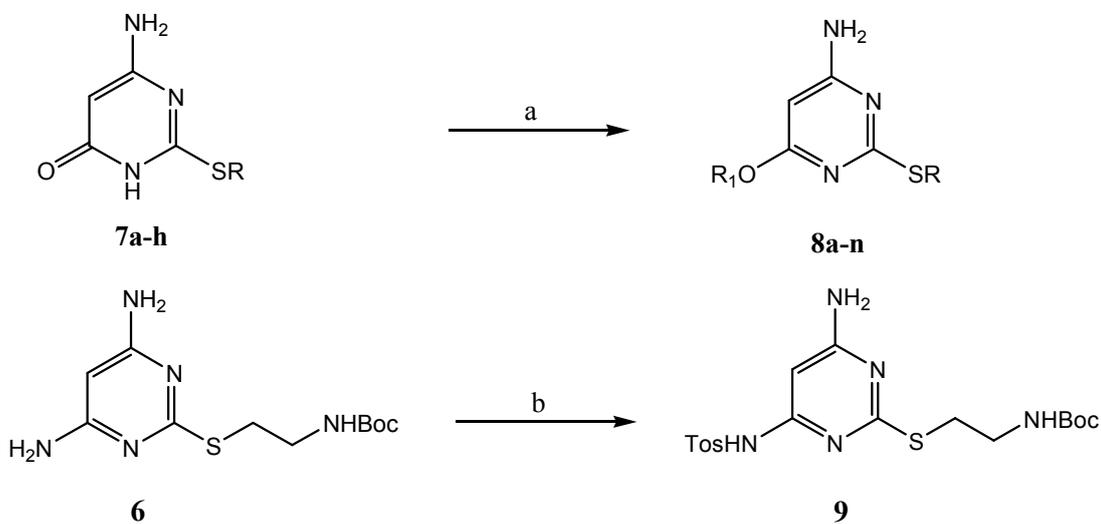


Schema 2

Condizioni di reazione: a) 2-cloro-benzil cloruro, NaOH 0.1 M in CH₃OH; b) BrCH₂CH₂NHBoc, NaOH 0.1 M in CH₃OH; c) RX, NaOH 0.1 M in CH₃OH.

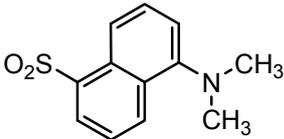
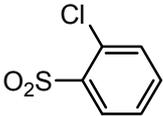
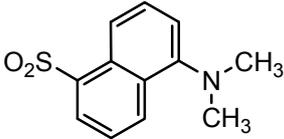
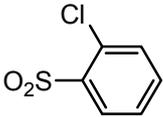
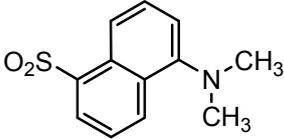
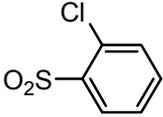
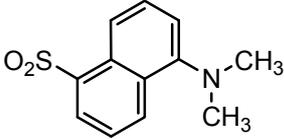
Composto	R
7a	CH ₃
7b	CH ₂ CH ₂ NHBOC
7c	CH ₂ CH ₂ OH
7d	CH ₂ CF ₃
7e	2-cloro-benzile
7f	C ₅ H ₁₁
7g	CH ₂ CH ₂ NHTos
7h	Ph ₃ C

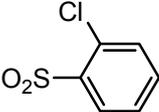
I sostituenti introdotti sull'ossigeno, in posizione 4, possono essere di natura arilsolfonica (Schema 3), alchilica e aril alchilica (Schema 4).



Schema 3

Condizioni di reazione: a) Diossano, DMF, TEA, ArSO₂Cl, RT, 5-7h; b) Piridina, Tosil cloruro, RT, 12h.

Composto	R	R1
8a	CH ₃	
8b	CH ₂ CH ₂ NHBoc	
8c	CH ₂ CH ₂ NHBoc	
8d	CH ₂ CH ₂ OH	
8e	CH ₂ CH ₂ OH	
8f	CH ₂ CH ₂ OH	
8g	CH ₂ CF ₃	
8h	CH ₂ CF ₃	
8i	CH ₂ CF ₃	
8j	2-Cl-Benzile	
8k	2-Cl-Benzile	
8l	2-Cl-Benzile	

8m	C_5H_{11}	
8n	C_5H_{11}	

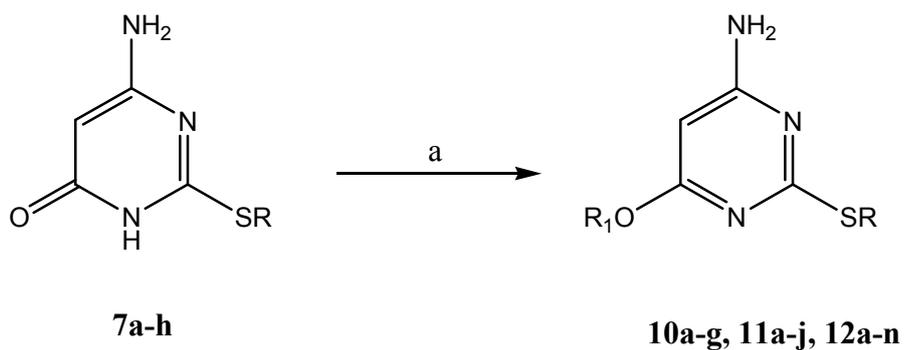
I sostituenti di natura alchilica presenti sull'ossigeno sono le funzionalità:

- CH_3
- $CH_2COOCH_2CH_3$
- CH_2COOH
- CH_2CH_2OH

I sostituenti di natura aril alchilica, riportati in tabella, presenti sull'ossigeno sono molteplici:

2-Metossi-Benzile	2-Metil-Benzile	2-Cl-Benzile
4-Metossi-Benzile	3-Metil-Benzile	3-Cl-Benzile
3-Fenil-Propile	3,5-Dimetil-Benzile	2,4-Cl-Benzile
2-Fenil-Propile	4-F-Benzile	2,6-Cl-Benzile
	4-Br-Benzile	

Anche tutti questi sostituenti di natura sia alchilica che arilalchilica, sono stati introdotti sul nucleo 6-amino tiouracilico variamente sostituito sullo zolfo ottenendo così diversi composti. Lo schema generale è il seguente:



Schema 4

Condizioni di reazione: a) RX, DMF, K₂CO₃, RT, 2-4 h.

I composti ottenuti sono riportati nelle varie tabelle, suddivise secondo la funzionalità presente sullo zolfo.

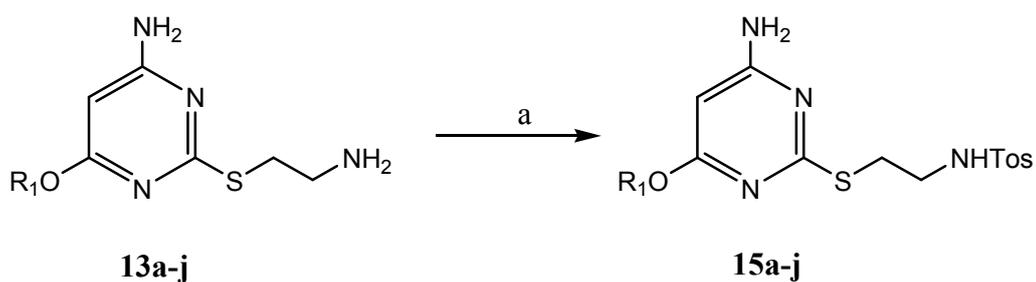
Composto	R	R ₁
10a	2-Cl-Benzile	CH ₂ CH ₂ OH
10b	2-Cl-Benzile	CH ₂ COOCH ₂ CH ₃
10c	2-Cl-Benzile	CH ₃
10d	2-Cl-Benzile	2-Metossi-Benzile
10e	2-Cl-Benzile	4-Metossi-Benzile
10f	2-Cl-Benzile	2-Cl-Benzile
10g	2-Cl-Benzile	CH ₂ COOH

Composto	R	R ₁
11a	CH ₂ CH ₂ OH	3-Fenil-Propile
11b	CH ₂ CH ₂ OH	2-Fenil-Propile
11c	CH ₂ CH ₂ OH	2-Metil-Benzile
11d	CH ₂ CH ₂ OH	3-Metil-Benzile
11e	CH ₂ CH ₂ OH	4-Br-Benzile
11f	CH ₂ CH ₂ OH	4-F-Benzile

11g	CH ₂ CH ₂ OH	3-Cl-Benzile
11h	CH ₂ CH ₂ OH	2,4-Cl-Benzile
11i	CH ₂ CH ₂ OH	2,6-Cl-Benzile
11j	CH ₂ CH ₂ OH	3,5-Dimetil-Benzile

Composto	R	R₁
12a	CH ₂ CH ₂ NHBoc	CH ₂ CH ₂ OH
12b	CH ₂ CH ₂ NHBoc	CH ₂ COOCH ₂ CH ₃
12c	CH ₂ CH ₂ NHBoc	2-Metossi-Benzile
12d	CH ₂ CH ₂ NHBoc	4-Metossi-Benzile
12e	CH ₂ CH ₂ NHBoc	3-Fenil-Propile
12f	CH ₂ CH ₂ NHBoc	2-Fenil-Propile
12g	CH ₂ CH ₂ NHBoc	2-Metil-Benzile
12h	CH ₂ CH ₂ NHBoc	3-Metil-Benzile
12i	CH ₂ CH ₂ NHBoc	4-Br-Benzile
12j	CH ₂ CH ₂ NHBoc	4-F-Benzile
12k	CH ₂ CH ₂ NHBoc	3-Cl-Benzile
12l	CH ₂ CH ₂ NHBoc	2,4-Cl-Benzile
12m	CH ₂ CH ₂ NHBoc	2,6-Cl-Benzile
12n	CH ₂ CH ₂ NHBoc	3,5-Dimetil-Benzile

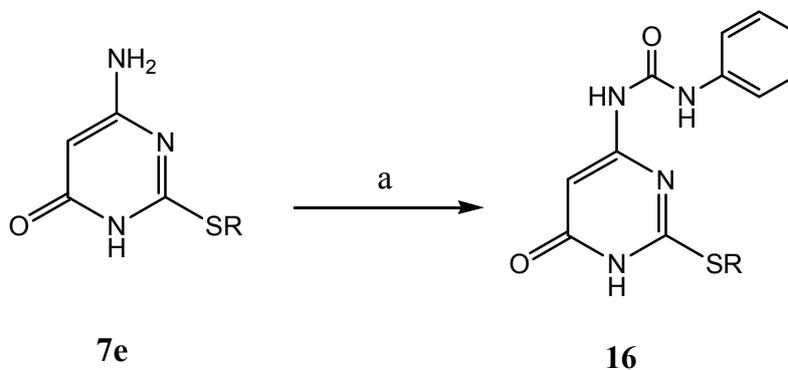
Il gruppo protettivo *Tert*-butil carbammico presente nei composti **8b-c**, **9**, **12e-n** è stato rimosso con CF₃COOH o HCl in AcOEt, secondo procedura standard di de-protezione, ottenendo i composti **13a-l** (riportati in tabella) e **14** (Schema 5).

**Schema 6**

Condizioni di reazione: a) Piridina, Tosil cloruro, RT, 2-3 h.

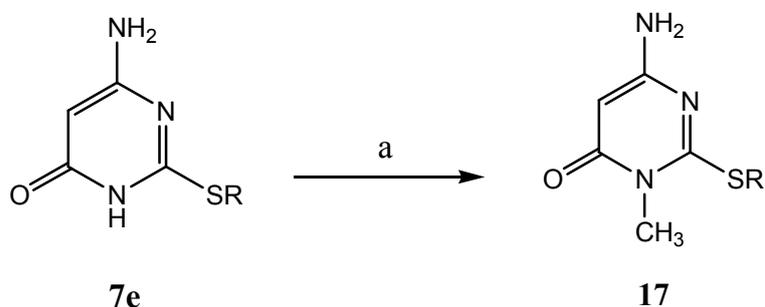
Composto	R ₁
15a	3-Fenil-Propile
15b	2-Fenil-Propile
15c	2-Metil-Benzile
15d	3-Metil-Benzile
15e	4-Br-Benzile
15f	4-F-Benzile
15g	3-Cl-Benzile
15h	2,4-Cl-Benzile
15i	2,6-Cl-Benzile
15j	3,5-Dimetil-Benzile

La formazione del gruppo ureidico in posizione 6 è stata ottenuta per reazione con fenil isotiocianato in diossano sul composto **7e** (Schema 7).

**Schema 7**

Condizioni di reazione: a) Fenil isotiocianato, diossano, rfx, 18h.

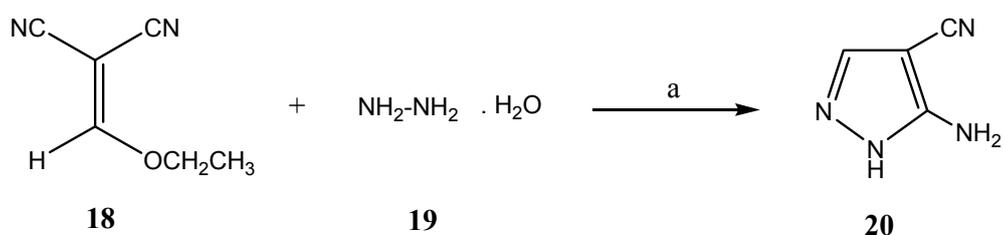
Sul nucleo **7e** è stato introdotto il gruppo metile sull'azoto N₃ in presenza di K₂CO₃ in DMF (Schema 8).



Schema 8

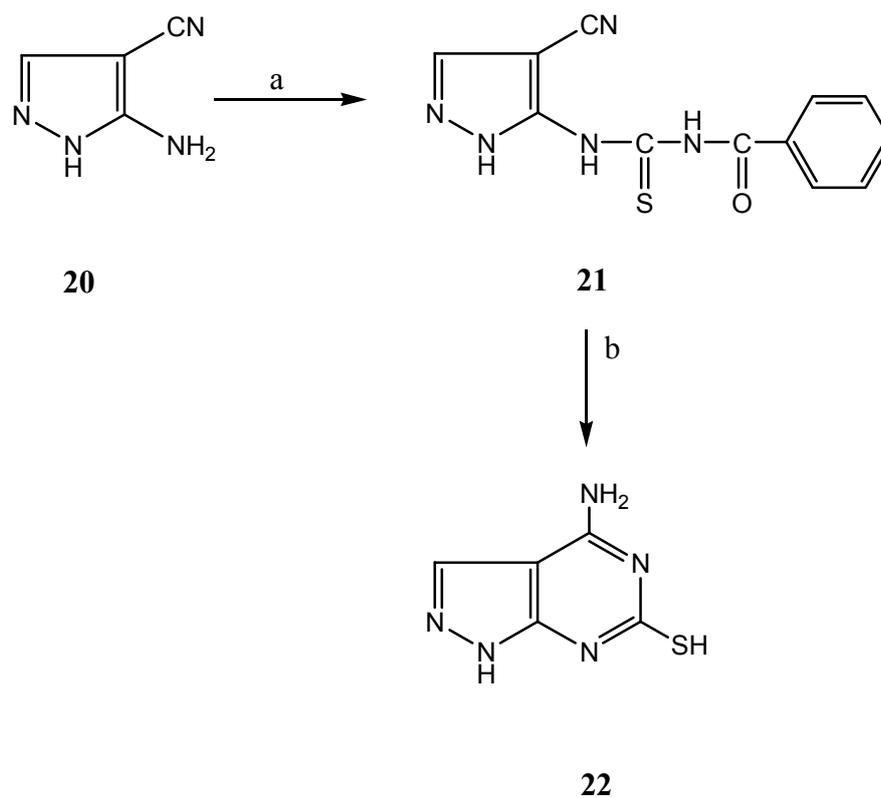
Condizioni di reazione: a) CH₃I, DMF, K₂CO₃, RT, 12h.

La sintesi del nucleo biciclico (**22**) viene ottenuto a partire da 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile (**20**), ottenuto per condensazione a caldo tra etossietilen malononitrile e idrazina, (Schema 9), successivamente condensato con benzoi isotiocianato sul gruppo amminico in posizione 5 e ciclizzato sul nitrile in posizione 4 per trattamento con NaOH 10% (Schema 10)²¹.



Schema 9

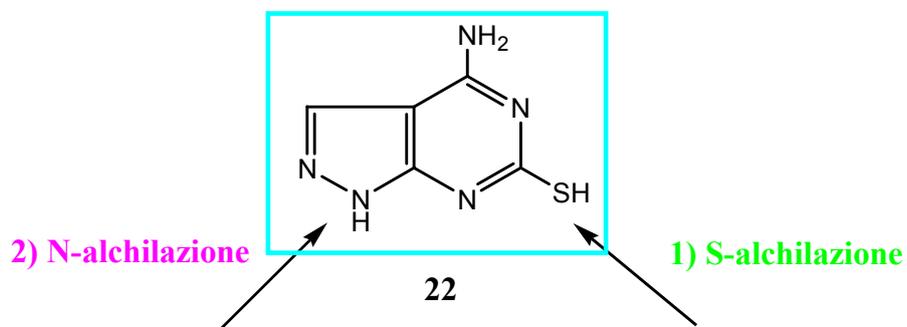
Condizioni di reazione: a) EtOH, rfx overnight.

**Schema 10**

Condizioni di reazione: a) Benzoil isotiocianato, diossano 120° C, 2 h in bomba; b) NaOH 10%, 120° C, 2 h.

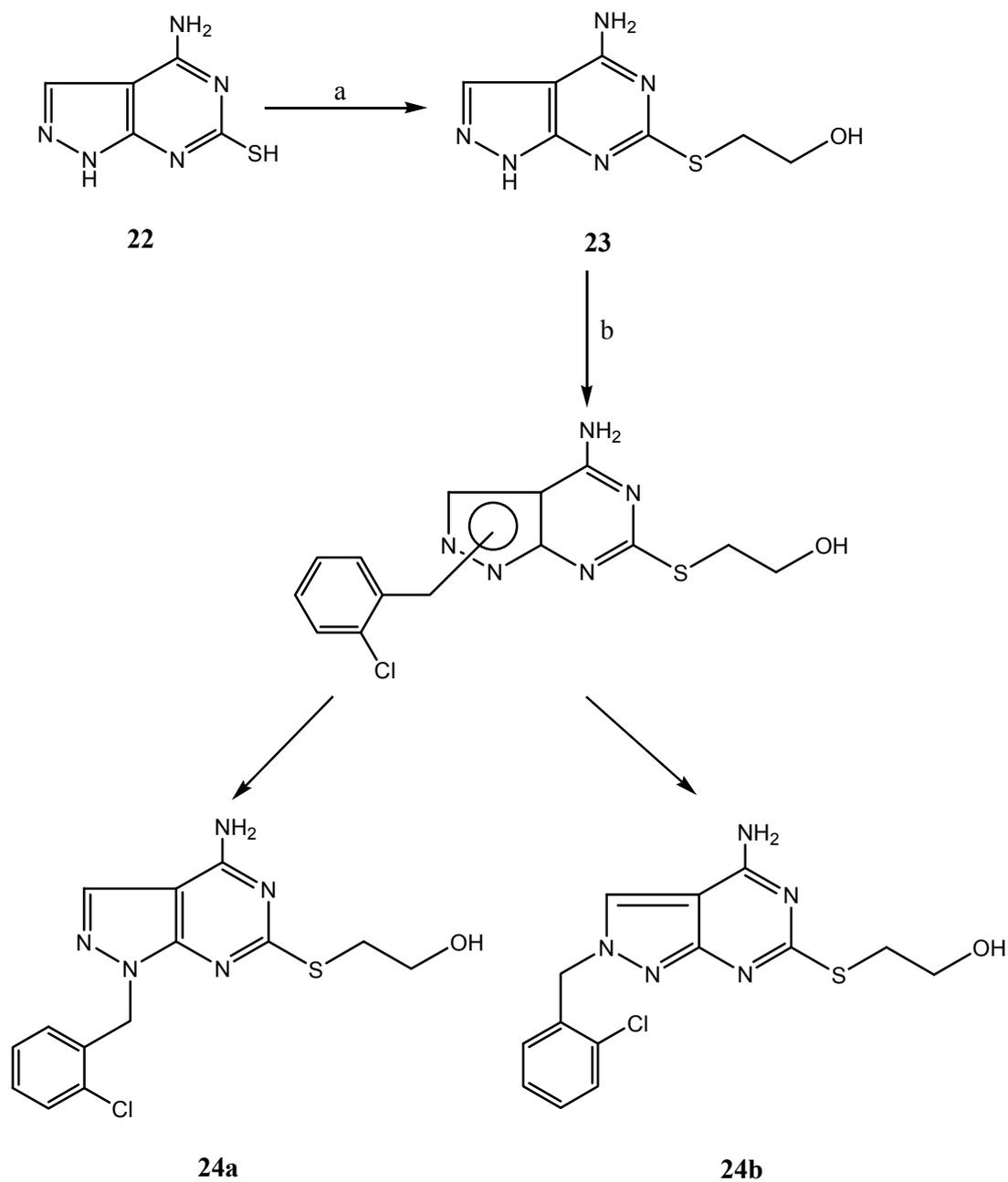
Ci si è concentrati sulla sintesi del nucleo **22** come intermedio comune per l'introduzione di vari sostituenti sia in posizione 2 che in posizione 7 o 8.

I sostituenti che si volevano introdurre erano gli stessi introdotti sulla struttura monociclica.



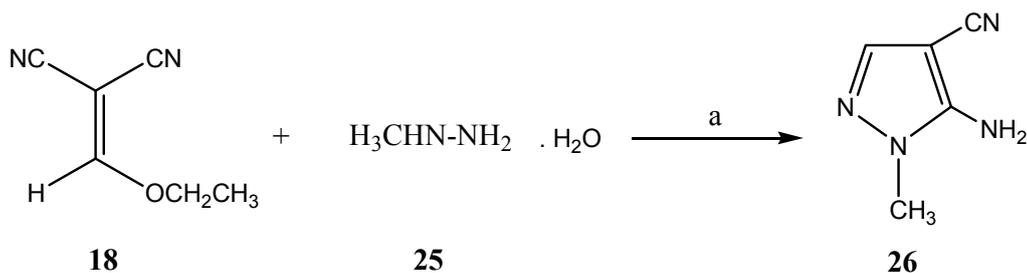
Purtroppo si sono incontrati diversi problemi che ci hanno costretti a cambiare strategia sintetica. L'unica alchilazione riuscita è riportata nello Schema 11 presentando l'alchilazione sullo zolfo con $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ e successivamente alchilazione sull'azoto pirazolico con l'introduzione del 2-Cloro benzile, ottenendo i due isomeri, **24a** e **24b**, isolati con cromatografia flash (Schema 11).

La tecnica NOE ha permesso l'attribuzione della corretta isomeria.

**Schema 11**

Condizioni di reazione: a) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, piridina o NaOH 0.1 M in CH_3OH , RT, overnight; b) 2-Clorobenzil cloruro, K_2CO_3 , DMF, rfx 2 h.

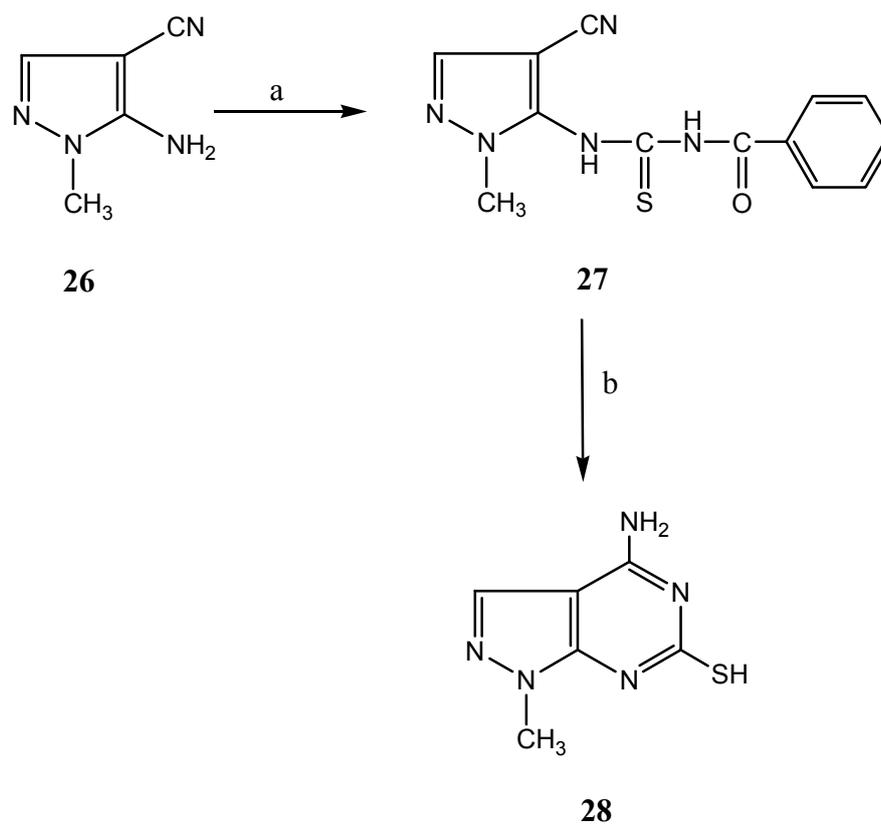
Vista la difficoltà nell'introdurre i sostituenti $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBOC}$ e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHTos}$ sullo zolfo, si è pensato di partire dal pirazolo già sostituito e poi introdurre i sostituenti desiderati sullo zolfo. Per mettere bene a punto le reazioni si è partiti dal pirazolo più semplice, ovvero il 5-amino-1-metil-1H-pirazol-4-carbonitrile, ottenuto per reazione tra etossietilenmalononitrile e metil-idrazina (Schema 12).



Schema 12

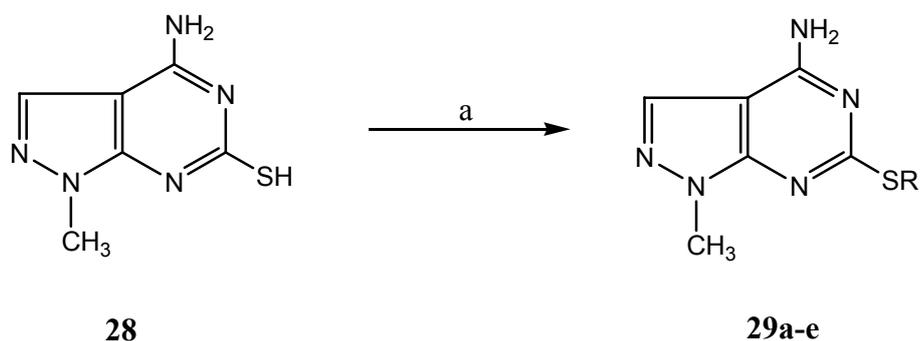
Condizioni di reazione: a) EtOH, rfx overnight.

Il composto **26** è il nucleo base per la sintesi del 4-amino-1-metil-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-6-tiolo ottenuto nelle stesse condizioni descritte precedentemente per il pirazolo non sostituito (Schema 13).

**Schema 13**

Condizioni di reazione: a) Benzoil isotiocianato, diossano 120° C, 2 h in bomba; b) NaOH 10%, 120° C, 2 h.

Sul composto **26** sono stati introdotti sullo zolfo i sostituenti, riportati in tabella, attraverso una reazione di alchilazione in condizioni debolmente basiche per semplice piridina o NaOH 0.1 M in CH₃OH (Schema 14).



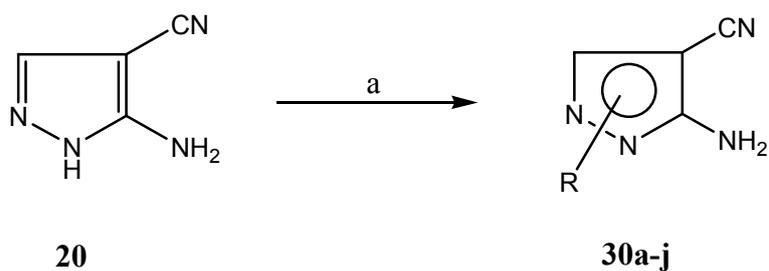
Schema 14

Condizioni di reazione: a) RX, piridina o NaOH 0.1 M/CH₃OH , RT, overnight.

Composto	R
29a	CH ₂ CH ₂ NHBOC
29b	CH ₂ CH ₂ NHTos
29c	2-Cl-Benzile
29d	CH ₂ CH ₂ OH
29e	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Et
29f	CH ₂ CH ₂ NH ₂

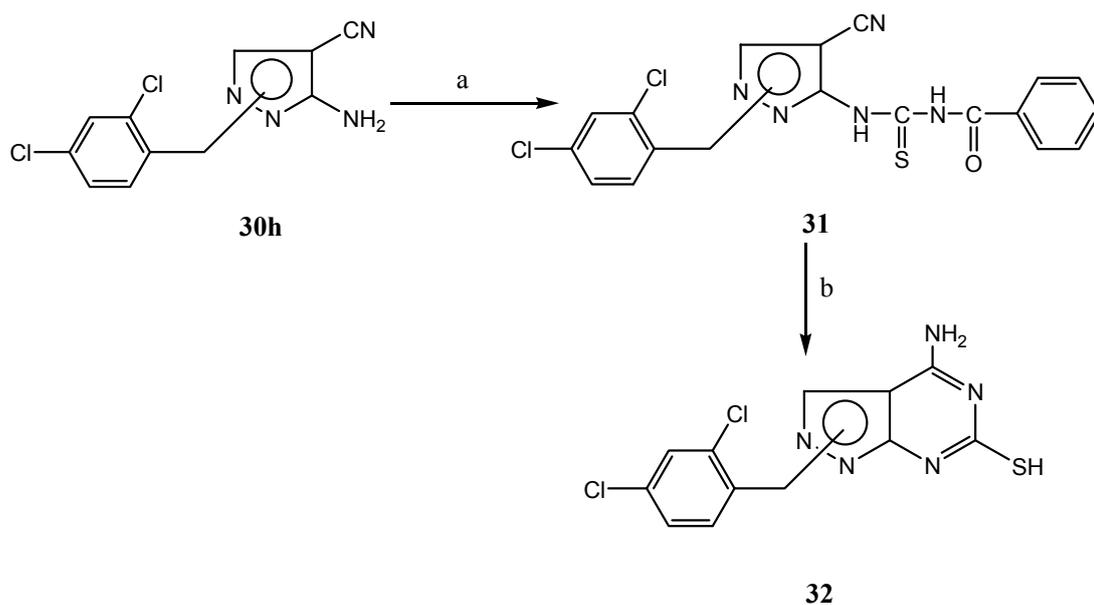
Il gruppo protettivo *Tert*-butil carbammico presente nel composto **29a**, è stato rimosso in ambiente acido secondo procedura standard di de-protezione, ottenendo il composto **29f**.

Quindi si è pensato di partire dal pirazolo non sostituito, ottenuto secondo lo schema 9, alchilare l'azoto pirazolico introducendo gli stessi sostituenti inseriti sulla struttura monociclica, in condizioni classiche di alchilazione con DMF anidra, K₂CO₃ e opportuno alchilante (Schema 15). Successivamente si è pensato di ciclizzare in condizioni classiche e poi alchilare sullo zolfo. La ciclizzazione è stata eseguita solo sul composto **30h** (Schema 16).

**Schema 15**

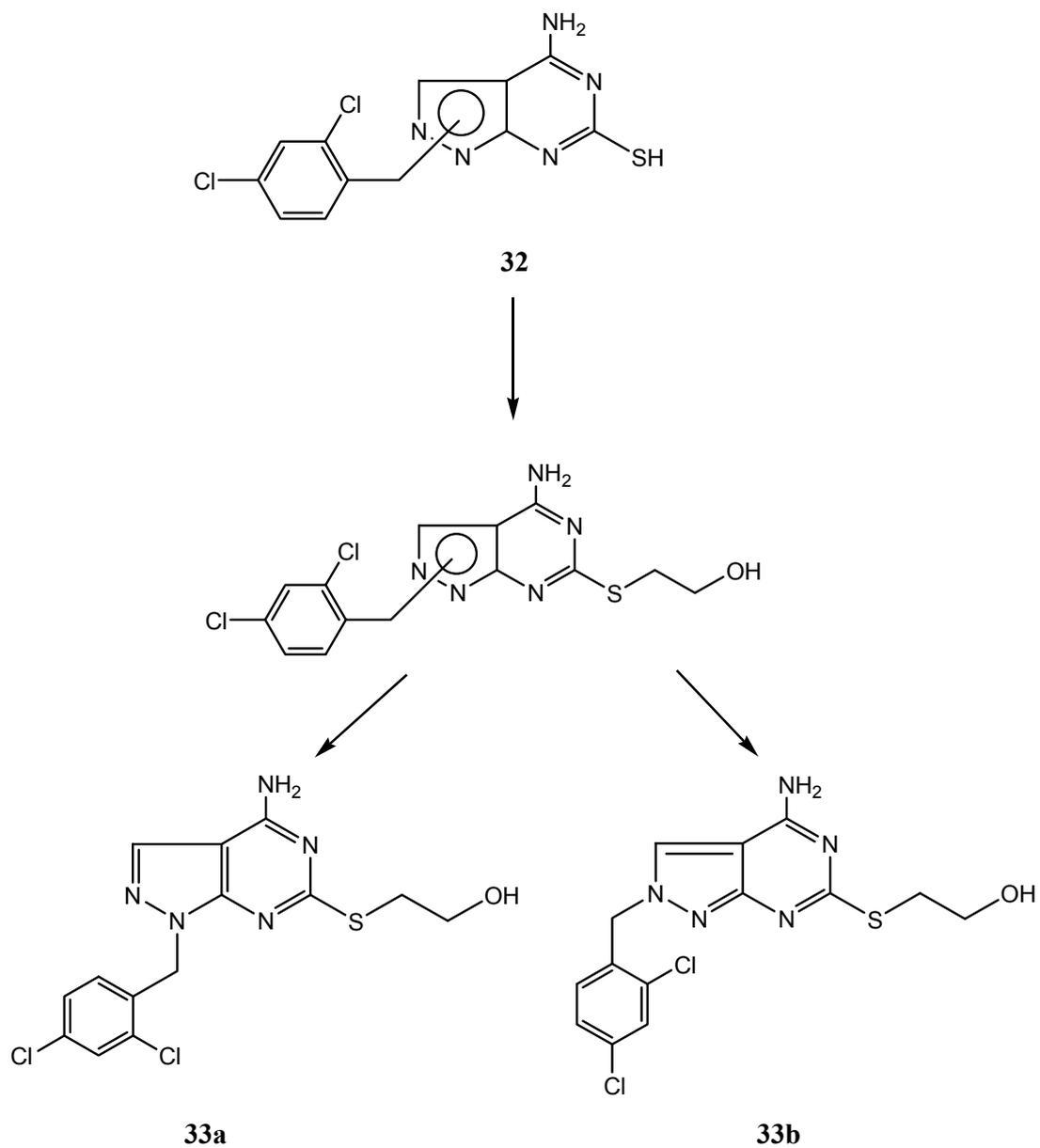
Condizioni di reazione: a) RX, K₂CO₃, DMF, rfx 4 h.

Composto	R
30a	3-Fenil-Propile
30b	2-Fenil-Propile
30c	2-Metil-Benzile
30d	3-Metil-Benzile
30e	4-Br-Benzile
30f	4-F-Benzile
30g	3-Cl-Benzile
30h	2,4-Dicloro-Benzile
30i	2,6-Dicloro-Benzile
30j	Benzile

**Schema 16**

Condizioni di reazione: a) Benzoil isotiocianato, diossano 120° C, 4 h in bomba; b) NaOH 10%, 120° C, 2 h.

Sul composto **32** è stato alchilato il gruppo tioloico con Bromo etanolo in condizioni basiche per piridina o soda metanolica 0.1 M (Schema 17). Successivamente si è proseguito separando i due isomeri con cromatografia flash, ottenendo i composti **33a** e **33b**.



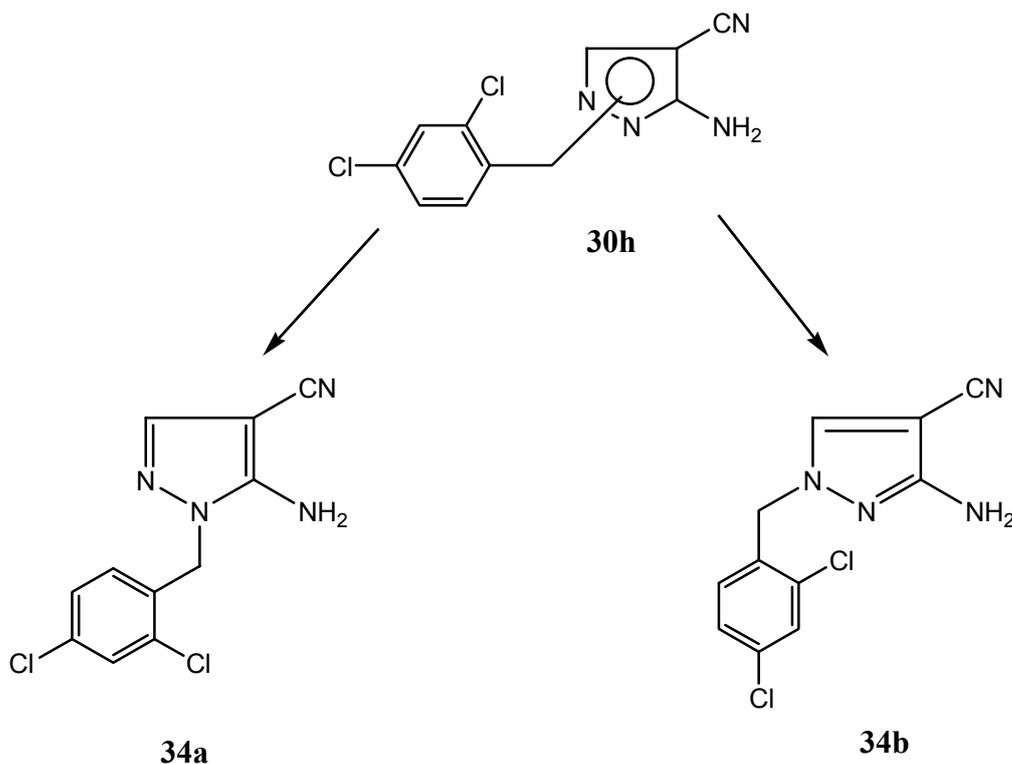
Schema 17

Condizioni di reazione: a) Bromoetano, NaOH 0.1 M in CH₃OH (o in piridina), RT, overnight.

Analogamente si è cercato di introdurre la funzionalità $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBOC}$, senza successo probabilmente per un problema di competizione tra i gruppi acidi SH e NH-Boc. Vista la difficoltà della reazione si è pensato di procedere non più sulla miscela isomerica ma sugli isomeri purificati e di utilizzare la semplice Bromo etil ammina eliminando così la possibile competizione da parte del gruppo NH-Boc.

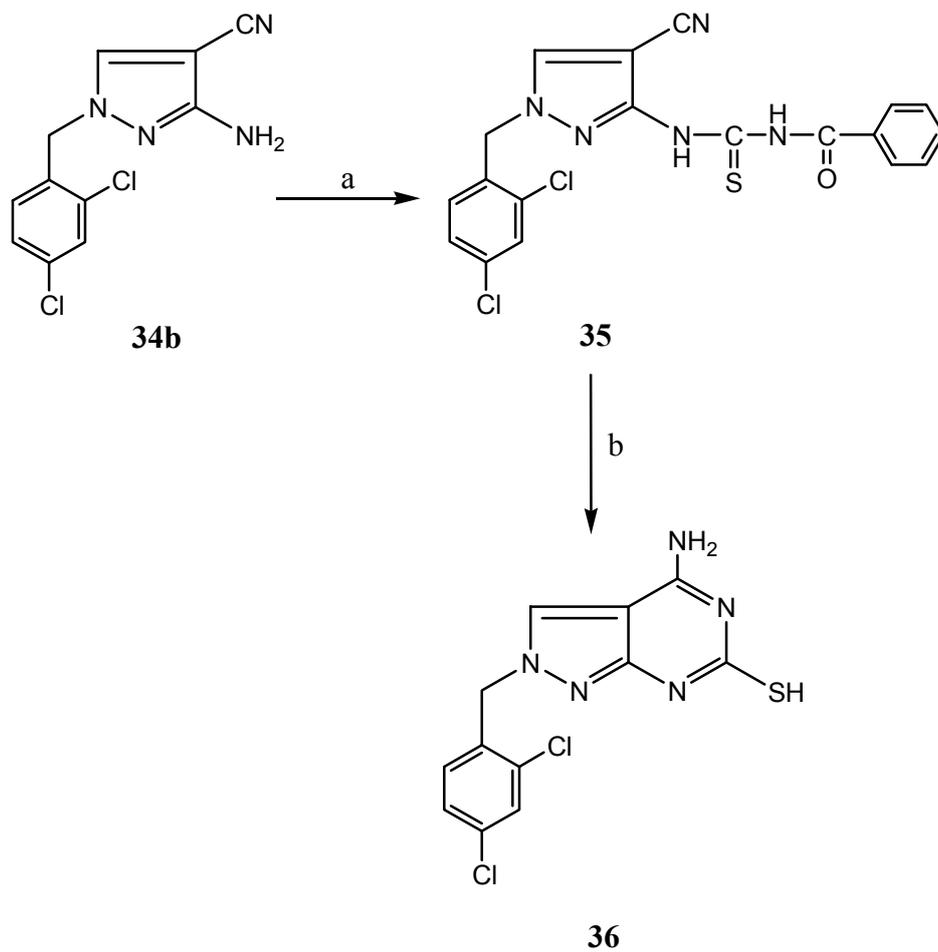
La miscela **30h** è stata purificata per colonna cromatografica ottenendo i due isomeri separati **34a** e **34b** (Schema 18).

L'attribuzione della corretta isoemia è stata eseguita con tecnica NOE e abbiamo proseguito la sintesi solo sull'isomero preponderante **34b**. Il composto **34b** si è dimostrato prevalente di circa 5-6 volte rispetto al composto **34a**.



Schema 18

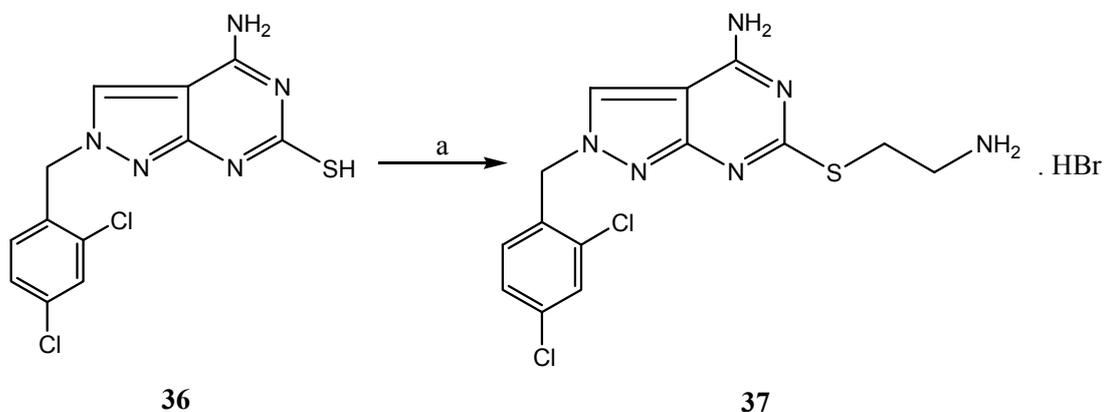
Si è quindi continuato sul composto **34b** ciclizzando la struttura monociclica in condizioni classiche riportate precedentemente, ottenendo il composto **36** (Schema 19).



Schema 19

Condizioni di reazione: a) Benzoil isotiocianato, diossano 120° C, 4h in bomba; b) NaOH 10%, 120° C, 2h.

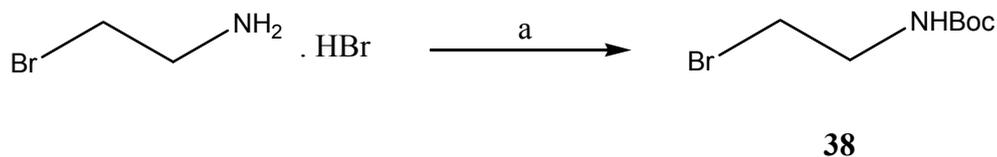
Il composto **36** è stato alchilato con bromo-etil ammina in condizioni basiche per piridina ottenendo così il composto **37** (Schema 20).



Schema 20

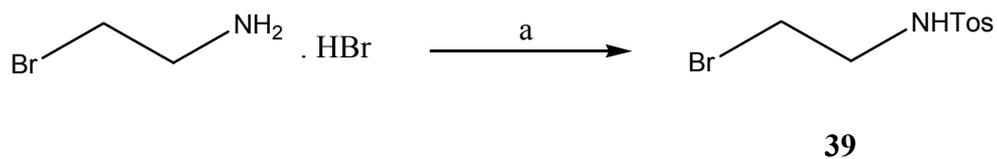
Condizioni di reazione: a) Bromo-etil ammina, piridina, RT, overnight.

Gli alchilanti quando non disponibili commercialmente sono stati preparati secondo procedure note (Schema 21 e 22).



Schema 21

Condizioni di reazione: a) Boc₂O, TEA, diossano, RT, overnight.



Schema 22

Condizioni di reazione: a) Tosil cloruro, TEA, DMF, RT, 24h.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti sintetizzati sono stati testati dal gruppo di ricerca del Prof. Cattaneo dell'Università di Milano sulle piastrine umane avvalendosi del test LTA (*light transmission aggregometry*)¹⁹.

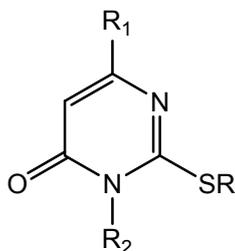
Tutti sono stati testati in soluzioni alla concentrazione 10^{-4} M in DMSO e sono stati valutati sia come agonisti che antagonisti.

Nessun composto è in grado di indurre aggregazione piastrinica indicando che nessuno è agonista per il recettore P2Y₁₂.

L'attività antagonista dei composti è stata valutata come inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta dall'agonista ADP alla concentrazione 10^{-5} M e 10^{-6} M.

Tutti i composti sono in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da ADP alla concentrazione 10^{-6} M, alcuni quasi al 100% (**13a**, **13c**, **13d**, **13g**, **13h**). Alcuni (**13c**, **13i**, **13j**, **15a**) hanno evidenziato una certa inibizione (circa 10-20%) dell'aggregazione indotta da ADP in concentrazione 10^{-5} M.

Nella tabella sottostante sono riportate le attività dei composti portanti sostituenti in posizione 2.



7b-h, 5, 17, 16

Composto	R	R ₁	R ₂	ADP 10 ⁻⁵ M	ADP 10 ⁻⁶ M
7b	CH ₂ CH ₂ NHBoc	NH ₂	H	76	40
7c	CH ₂ CH ₂ OH	NH ₂	H	99	114
7e	2-Cl-Benzile	NH ₂	H	101	88
7f	C ₅ H ₁₁	NH ₂	H	100	63
7g	CH ₂ CH ₂ NHTos	NH ₂	H	89	51
7h	Ph ₃ C	NH ₂	H	100	81
5	2-Cl-Benzile	OH	H	96	97
17	2-Cl-Benzile	NH ₂	CH ₃	88	61
16	2-Cl-Benzile	NHCONHPh	H	94	91

Tabella 2. Effetti dei vari composti (% di aggregazione piastrinica) ottenuti dopo induzione dell'aggregazione utilizzando l'agonista ADP alla concentrazione 10⁻⁵M e 10⁻⁶M.

La natura del sostituente sullo zolfo sembra di una certa importanza. In particolare la presenza di un gruppo amminico sembra influenzare in modo positivo l'attività, come dimostrato dai composti **7b** e **g** in grado di inibire l'aggregazione piastrinica per il 60% e 49% rispettivamente, mentre gli altri hanno dimostrato solo debole attività in caso di aggregazione indotta da ADP 10⁻⁶M.

In caso di derivati monosostituiti allo zolfo, è possibile ipotizzare l'influenza positiva di sostituenti piuttosto lipofili come il pentile **7f** e il 2-Cl-benzile associato a sostituzione all'azoto in 3 come in **17**; invece un eccessivo ingombro sterico risulta negativo per l'attività come dimostrato da **7h**.

Inoltre è possibile osservare che la presenza del gruppo amminico libero in posizione 6 è importante, vista la perdita di attività degli analoghi **16** e **5** mancanti di questa funzione, confrontata con l'analogo **7e**.

In caso di contemporanea sostituzione in posizione 2 e 4, sembra invece necessaria la presenza in posizione 2 di sostituenti portanti gruppi a carattere idrofilo probabilmente in grado di formare legami idrogeno, quali la catena 2-amino-etil e 2-

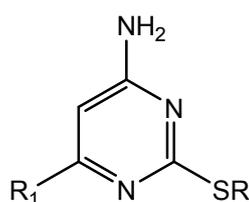
idrossi-etil, mentre risultano completamente inattive le funzioni protette al gruppo amminico in catena laterale come evidenziato precedentemente.

Per meglio valutare la possibilità di formazioni di legami idrogeno a questo livello, è stato introdotto il gruppo 2-trifluoroetilico in posizione 2 in grado di accettare legami idrogeno; i composti **8g-i** hanno però mostrato un calo notevole di attività facendo ipotizzare eventualmente la necessità di gruppi donatori di legami idrogeno.

In posizione 4 sono stati introdotti sostituenti arilsolfonici, arilalchilici e alchilici combinati con le precedenti funzionalità viste in posizione 2.

I sostituenti arilsolfonici hanno dato buoni risultati. In particolare il sostituito migliore si è dimostrato il gruppo tosilico, mentre il 2-Cl-benzen solfonile e il gruppo dansilico hanno influenzato negativamente l'attività, indipendentemente dalla natura del sostituito in posizione 2, come si può vedere nei derivati **8d-f**, **8j-l**, **13k,l**. Il 2-cloro benzensulfonile in posizione 4 ha dimostrato una migliore attività rispetto al tosile solo nel caso di sostituzione col pentile in posizione 2 (**8n** rispetto **8m**).

Mantenendo la funzionalità CH₂CH₂NH₂ sullo zolfo si è confrontata l'attività di composti portanti il gruppo tosile in posizione 4, legato all'ossigeno e legato all'NH, ottenendo però un insuccesso in termini di attività biologica (vedi attività composto **14**, a confronto con l'attività del composto **13k**, tabella 2), confermando l'influenza di questa posizione nell'interazione recettoriale.



8a-n, **13k,l**, **14**, **10a-f**, **13a-j**, **15a-j**, **11a-j**

Composto	R	R ₁	ADP 10 ⁻⁵ M	ADP 10 ⁻⁶ M
8a	CH ₃	OTos	96	120
8b	CH ₂ CH ₂ NHBoc	OTos	97	75
8d	CH ₂ CH ₂ OH	OTos	99	57

8e	CH ₂ CH ₂ OH	O-2-Cl-Benzensulfonil	100	110
8f	CH ₂ CH ₂ OH	ODansil	100	93
8g	CH ₂ CF ₃	OTos	101	105
8h	CH ₂ CF ₃	O-2-Cl-Benzensulfonil	102	97
8i	CH ₂ CF ₃	ODansil	104	115
8j	2-Cl-Benzile	OTos	100	68
8k	2-Cl-Benzile	O-2-Cl-Benzensulfonil	96	92
8l	2-Cl-Benzile	ODansil	101	96
8m	C ₅ H ₁₁	OTos	88	96
8n	C ₅ H ₁₁	O-2-Cl-Benzensulfonil	95	58
14	CH ₂ CH ₂ NH ₂	NHTos	91	91
10a	2-Cl-Benzile	O-CH ₂ CH ₂ OH	101	85
10c	2-Cl-Benzile	O-CH ₃	101	64
10d	2-Cl-Benzile	O-2-Metossi-Benzile	102	98
10e	2-Cl-Benzile	O-4-Metossi-Benzile	103	82
10f	2-Cl-Benzile	O-2-Cl-Benzil	95	86
10g	2-Cl-Benzile	O-CH ₂ COOH	99	85
11a	CH ₂ CH ₂ OH	O-3-Fenil-Propile	103	90.5
11b	CH ₂ CH ₂ OH	O-2-Fenil-Propile	94	70.5
11c	CH ₂ CH ₂ OH	O-2-Metil-Benzile	97	81

11d	CH ₂ CH ₂ OH	O-3-Metil-Benzile	100	82
11e	CH ₂ CH ₂ OH	O-4-Br-Benzile	102	72.5
11f	CH ₂ CH ₂ OH	O-4-F-Benzile	95	67
11g	CH ₂ CH ₂ OH	O-3-Cl-Benzile	102	76
11h	CH ₂ CH ₂ OH	O-2,4-Dicloro-Benzile	100	58
11i	CH ₂ CH ₂ OH	O-2,6-Dicloro-Benzile	99	69
11j	CH ₂ CH ₂ OH	O-3,5-Dimetil-Benzile	94	73
13a	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-3-Fenil-Propile	88	24
13b	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-2-Fenil-Propile	96	47
13c	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-2-Metil-Benzile	72	9
13d	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-3-Metil-Benzile	79	27
13e	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-4-Br-Benzile	85	38
13f	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-4-F-Benzile	86	36
13g	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-3-Cl-Benzile	82 (max)-59 (3-min)	21
13h	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-2,4-Dicloro-Benzile	80 (max)-51 (3-min)	13
13i	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-2,6-Dicloro-Benzile	81	43

13j	CH ₂ CH ₂ NH ₂	O-3,5-Dimetil-Benzile	77	31
13k	CH ₂ CH ₂ NH ₂	OTos	96	37
13l	CH ₂ CH ₂ NH ₂	ODansil	99	83
15a	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-3-Fenil-Propile	75	65
15b	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-2-Fenil-Propile	90	67
15c	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-2-Metil-Benzile	87	51
15d	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-3-Metil-Benzile	79	86
15e	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-4-Br-Benzile	88	90
15f	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-4-F-Benzile	105	93
15g	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-3-Cl-Benzile	82	66
15h	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-2,4-Dicloro-Benzile	78	69
15i	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-2,6-Dicloro-Benzile	91	60
15j	CH ₂ CH ₂ NHTos	O-3,5-Dimetil-Benzile	103	84

Tabella 3. Effetti dei vari composti (% di aggregazione piastrinica) ottenuti dopo induzione dell'aggregazione utilizzando l'agonista ADP alla concentrazione 10⁻⁵M e 10⁻⁶M.

L'introduzione di sostituenti alchilici in posizione 4, anche combinato con la presenza di un gruppo arilico in posizione 2, non ha dato buoni risultati (**10a, c, g**) anche se il semplice metile nel composto **10c** sembra meglio tollerato, rispetto alla

presenza di sostituenti a carattere idrofilo (**10a, g**). Anche il gruppo 2-idrossietilico che, in posizione 2 conferiva attività, non ha dato risultati incoraggianti.

Dati migliori sono stati ottenuti con l'introduzione in posizione 4 di sostituenti arilalchilici. In questo caso i derivati hanno dimostrato le attività migliori quando combinati col gruppo 2-amminicoetilico in posizione 2, come si può osservare negli analoghi **13c, 15c, 11c**, dove **13c** si è dimostrato molto interessante in termini di attività, mentre **15c** e **11c** portanti lo stesso sostituente in posizione 4 ma gruppi diversi in posizione 2, perdono moltissimo come inibitori dell'aggregazione piastrinica.

All'interno della serie portante in posizione 2 il gruppo 2-amminico etilico, l'importanza della posizione e della natura dei sostituenti al fenile non è di facile interpretazione. Il cloro e il metile sono i gruppi che hanno dato risultati migliori come dimostrato dai composti **13c** e **h**. Sembra avere più importanza la posizione di sostituzione sul fenile piuttosto che la natura del sostituente, come dimostrato dai composti **13c** e **d** che presentano una attività piuttosto diversa, dove lo stesso sostituente (CH₃) si trova in posizione 2 e 3 rispettivamente. Mentre **13d** e **g** che presentano sostituenti di natura elettronica opposta, mostrano un'attività molto simile confermando una preferenza per la posizione del sostituente piuttosto che la natura di questo.

Questo può essere validato anche dall'osservazione che sostituenti di natura elettronica simile ma con ingombro sterico diverso quali Fluoro e Bromo in posizione para al fenile, come in **13e** ed **f**, mostrano una minore attività, del tutto confrontabile tra loro probabilmente per la posizione non ottimale occupata sul fenile.

Per cercare di aumentare l'attività biologica, poiché l'inibizione rilevata è riferita a livelli di ADP più bassi rispetto a quelli fisiologici, si è pensato di utilizzare come nucleo di base una struttura pirazolo pirimidinica, biciclica, allo scopo di ampliare le interazioni con il recettore.

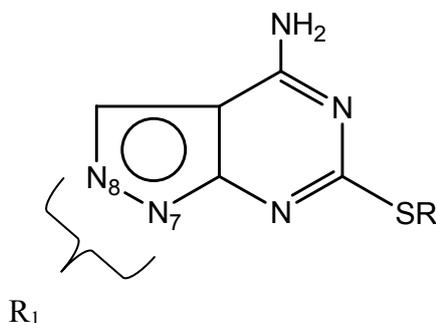
La scelta di questo nucleo è stata determinata dall'osservazione che può essere considerato un isostero del nucleo purinico presente nell'adenosina e in molti antagonisti del recettore P2Y₁₂ noti in letteratura derivati da ATP; inoltre è un

naturale prodotto di complicazione molecolare del nucleo 6-ammino tiouracilico oggetto dei nostri studi.

In relazione con i composti sintetizzati precedentemente, abbiamo pensato di mantenere gli stessi sostituenti sullo zolfo e combinare funzionalità diverse sull'azoto pirazolico.

Anche i composti biciclici sono stati testati con lo stesso test dei derivati monociclici.

I dati ottenuti hanno evidenziato buona attività di inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP 10^{-6} M, ma minore se confrontata con la serie di composti monociclici, come riportato in tabella sottostante.



Composto	R	R ₁	ADP 10^{-6} M
22	H	N ₇ -H	85
28	H	N ₇ -CH ₃	60
29a	CH ₂ CH ₂ NHBoc	N ₇ -CH ₃	83
29f	CH ₂ CH ₂ NH ₂	N ₇ -CH ₃	83
37	CH ₂ CH ₂ NH ₂	N ₈ -2,4-dicloro-Benzile	61
29b	CH ₂ CH ₂ NHTos	N ₇ -CH ₃	81
29e	CH ₂ CH ₂ COOEt	N ₇ -CH ₃	53
23	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -H	89
29d	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -CH ₃	66
24a	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -2-Cl-Benzile	82

24b	CH ₂ CH ₂ OH	N ₈ -2-Cl-Benzile	81
33a	CH ₂ CH ₂ OH	N ₇ -2,4-dicloro-Benzile	72
33b	CH ₂ CH ₂ OH	N ₈ -2,4-dicloro-Benzile	64
29c	2-Cl-Benzile	N ₇ -CH ₃	66

Tabella 4. Effetti dei vari composti (% di aggregazione piastrinica) ottenuti dopo induzione dell'aggregazione utilizzando l'agonista ADP alla concentrazione 10⁻⁵M e 10⁻⁶M.

Osservando l'attività dei composti più attivi si può notare l'importanza del gruppo 2,4-dicloro-benzile, supportata dalla presenza sull'azoto della funzionalità CH₂CH₂NH₂, già dimostratasi importante nella struttura monociclica (**33b** e **37**).

Di difficile interpretazione è invece l'attività degli altri composti; il composto più attivo tra i biciclici è il **29e**, portante CH₂CH₂COOEt sullo zolfo e il gruppo CH₃ sull'N₇; buona attività è anche nel composto più semplice (**28**), non alchilato sullo zolfo e portante il gruppo metilico sull'N₇.

Inoltre sembra più importante il sostituito sull'azoto che sullo zolfo, anche se nel sostituito nel pirazolo la natura e la posizione è di difficile interpretazione. Sul pirazolo sembra che il sostituito più ingombrante sia meglio tollerato in posizione 8, meno in posizione 7 dove sembra che l'attività migliori con sostituiti più piccoli. Sembra infatti che l'introduzione sull'N₇ sia favorita apportando piccoli sostituiti (**29c** e **29d**).

Purtroppo il sistema biciclico non ha dato i risultati attesi, anzi ha confuso sulla possibile interazione recettoriale.

Come enunciato nell'introduzione, sulle piastrine sono presenti tre recettori purinergici: P2X₁, P2Y₁ e P2Y₁₂, tutti con un importante ruolo nell'attivazione piastrinica.

Per cui abbiamo testato uno dei composti più attivi, ovvero il composto **13k**, sul recettore P2Y₁₂ clonato e l'attività dimostrata è confrontabile con il dato ottenuto sulle piastrine intere facendoci ipotizzare un'attività inibitoria dovuta all'azione selettiva sul recettore P2Y₁₂.

L'esperimento è stato condotto dal gruppo di ricerca del Dr. Von Kügelgen dell'Università di Bonn evidenziando una diminuzione della risposta dell'agonista 2-metiltilio-ADP in un modo dipendente dalla concentrazione, con IC₅₀ di 8.08 μM²⁰.

Per analogia strutturale è stato pensato che anche gli altri composti presentino lo stesso comportamento selettivo sul recettore P2Y₁₂.

Inoltre, recentemente alcuni derivati del 6-amino-2-mercapto-3H-pirimidin-4-one variamente sostituito allo zolfo e all'ossigeno, strutture correlate alle nostre, hanno evidenziato attività sul recettore adenosinico A₃.

Per tale motivo alcuni dei nostri composti (11b, g, 12d, f, n, 13b) sono stati testati con un saggio di *binding* sui recettori A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Nessuno dei nostri composti ha mostrato attività su tali recettori, dimostrando di nuovo un'attività selettiva sul recettore P2Y₁₂.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi-Tottoli e non sono stati corretti.

Le reazioni e le miscele di prodotti sono state controllate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre di gel di silice Macherey-Nagel poligram SIL/UV 254 da 0.25 mm, usando come sistemi di rilevazione una lampada UV a 254 nm e KMnO_4 soluzione acquosa al 2%. Le purificazioni cromatografiche su colonna sono state eseguite con gel di silice Merck 60-200 mesh.

I prodotti sono stati anidrificati con sodio solfato anidro della Carlo Erba.

Gli spettri IR sono stati eseguiti con apparecchio Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100. Per le intensità valgono le seguenti abbreviazioni: s = forte; m = media; w = debole.

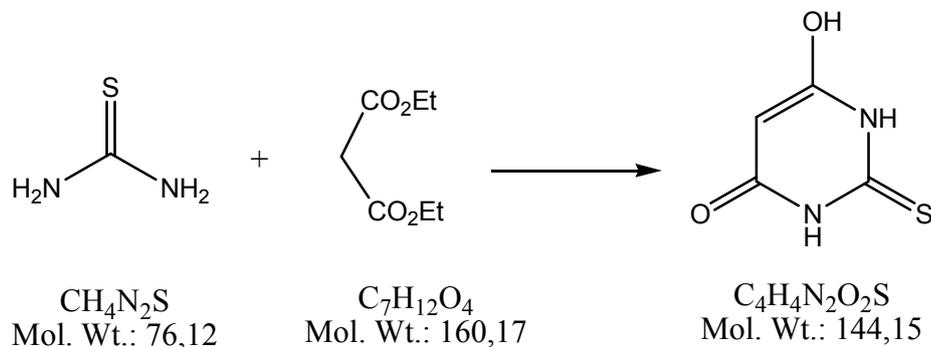
Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ e NOE, sono stati effettuati con uno strumento VARIAN 400 MHz in soluzione di CDCl_3 o DMSO. I chimica shift (δ) sono espressi in parte per milione (ppm) utilizzando come standard interno il picco a 7.256 ppm del cloroformio deuterato, mentre le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hertz (Hz). Per le molteplicità valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto; br = segnale allargato; dd = doppio doppietto; dt = doppio tripletto.

I solventi e i reagenti utilizzati per le TLC, le purificazioni cromatografiche, le cristallizzazioni e le reazioni sono indicati come riportati di seguito:

- AcOEt o EtOAc per l'acetato d'etile;
- Etere o Et_2O per l'etere etilico;
- EtPt per l'etere di petrolio;
- EtOH per l'etanolo;

- DMF per la N,N'-dimetilformammide;
- THF per il tetraidrofurano;
- TFA per l'acido trifluoroacetico;
- Boc per il terbutilossicarbonile;
- Boc₂O per l'anidride del BOC (terbutilossicarbonil);
- TEA per trietilammina;

Preparazione di: **2,3-diidro-6-idrossi-2-tioxopirimidin-4(1H)-one (2)**



Ad una soluzione di etilato di sodio preparata al momento sciogliendo Na metallico (0.3 g, 0.013mol) in EtOH (20 ml) viene aggiunta tiourea, (1g, 0.013 mol) ed dietil malonato, (1.97 ml, 0.013 mol).

Si lascia la miscela a refluxo per 3 ore, quindi si filtra il precipitato su buchner.

Si scioglie il precipitato in H₂O (10 ml), si aggiusta il pH a 7-8 e successivamente si filtra il precipitato e lo si pone in essiccatore ottenendo così un solido bianco.

Caratteristiche del composto **2**:

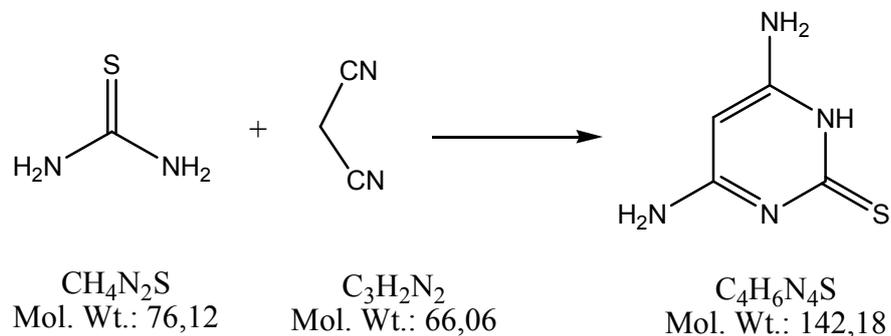
Resa: 67%.

Punto di fusione: > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 3.34 (s,1H); 4.10 (s, 1H); 10.46 (bs, 2H).

IR (KBr) : 3390, 3334, 1690, 1320 cm⁻¹.

Preparazione di: **4,6-diaminopirimidin-2(1H)-tione (3)**



Ad una soluzione di etilato di sodio preparata al momento sciogliendo Na metallico (0.3 g, 0.013mol) in EtOH (20 ml) viene aggiunta tiourea, (1g, 0.013 mol) e malononitrile, (860 mg, 0.013 mol).

Si lascia la miscela a refluxo per 3 ore, quindi si filtra il precipitato.

Il filtrato viene sciolto in H₂O (10 ml) e si aggiusta il pH circa a 7-8.

Il precipitato che si forma viene filtrato ed essiccato in essiccatore ottenendo così un solido bianco.

Caratteristiche del composto **3**:

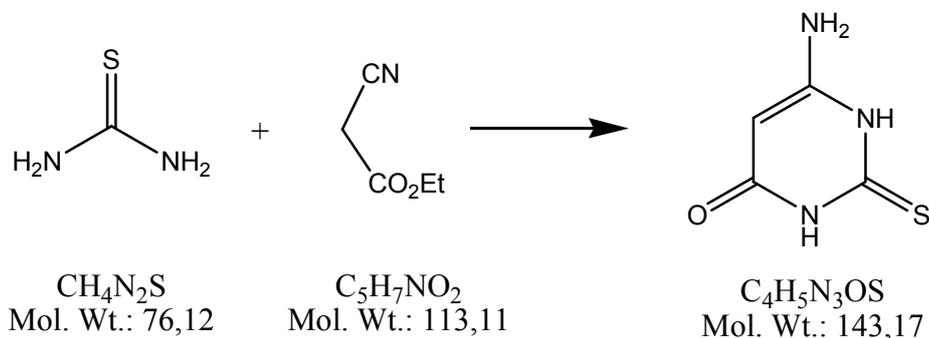
Resa: 52%.

Punto di fusione: > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 5.01 (s,1H); 6.56 (bs, 4H); 10.97 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3434, 3350, 1692, 1320 cm⁻¹.

Preparazione di: **6-amino-2,3-diidro-2-tioxopirimidin-4 (1H)-one (4)**



Ad una soluzione di etilato di sodio preparata al momento sciogliendo Na metallico (0.3 g, 0.013mol) in EtOH (20 ml) viene aggiunta tiourea, (1g, 0.013 mol) ed etil ciano acetato, (1.38 ml, 0.013 mol).

Si lascia la miscela a refluxo per 3 ore, quindi si filtra il precipitato su buchner.

Si scioglie il precipitato in H₂O (15 ml), si aggiusta il pH a 7-8 e successivamente si filtra il precipitato e lo si pone in essiccatore ottenendo così un solido bianco.

Caratteristiche del composto **4**:

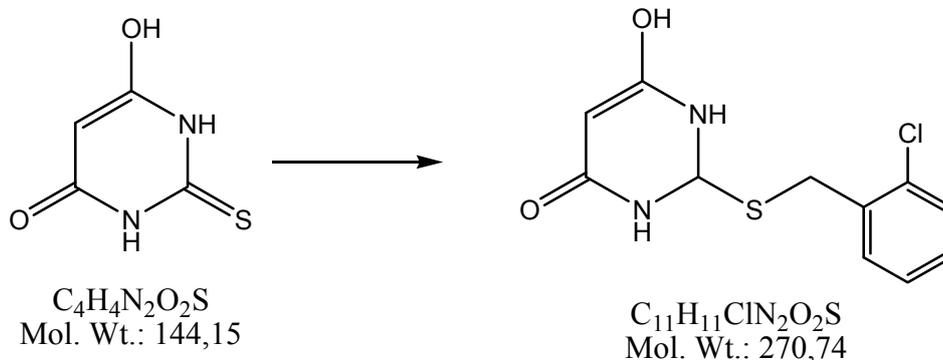
Resa: 78%.

Punto di fusione: > 300 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 4.69 (s,1H); 6.37 (bs,2H); 11.52 (bs,1H); 11.63 (bs,1H).

IR (KBr) : 3450, 3220, 1690, 1320 cm⁻¹.

Preparazione di: **6-idrossi-2-(2-cloro benzilsulfanil) -3H-pirimidin-4-one (5)**



A una soluzione del composto **2** (0.3 g, 2 mmol) in 20 ml di NaOH 0.1 M in CH_3OH , viene aggiunto 2-clorobenzil cloruro (0.66 mL, 5 mmol).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2.5ore. Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H_2O (10-15 mL) e filtrato ottenendo così il composto desiderato.

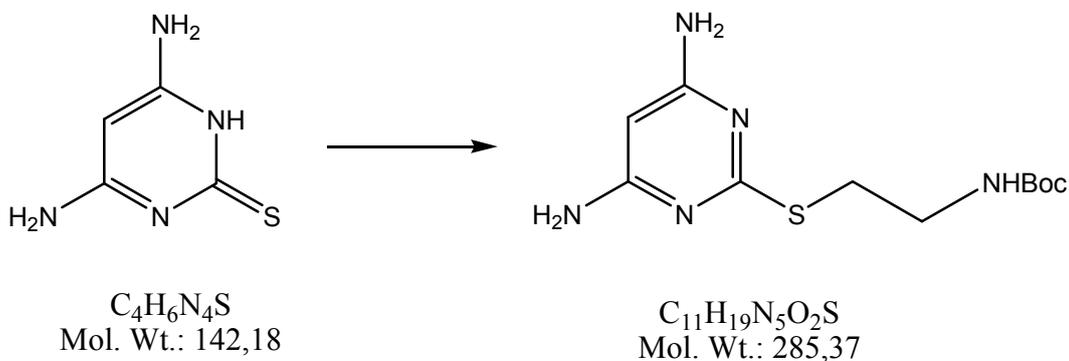
Caratteristiche del composto **5**:

Resa: 68%.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : δ : 3.35 (bs, 2H); 4.21 (s, 1H); 4.32 (s, 2H); 7.25-7.27 (m, 2H); 7.41-7.43 (m, 1H); 7.46-7.60 (m, 1H).

IR (KBr) : 3390, 3334, 1690, 1320 cm^{-1} .

Preparazione di: **2-(4,6-diamino-pirimidin-2-ilsulfanil)-etil- acido carbammico *tert* butil estere (6)**



Ad una soluzione del composto **3** (0.1 g, 0.7 mmol) in 7 mL di NaOH 0.1 M in CH_3OH , si aggiunge l'alchilante $BrCH_2CH_2NHBoc$, (0.4 g, 1.75 mmol) e la soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 18 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato 100%) ottenendo il composto desiderato (olio).

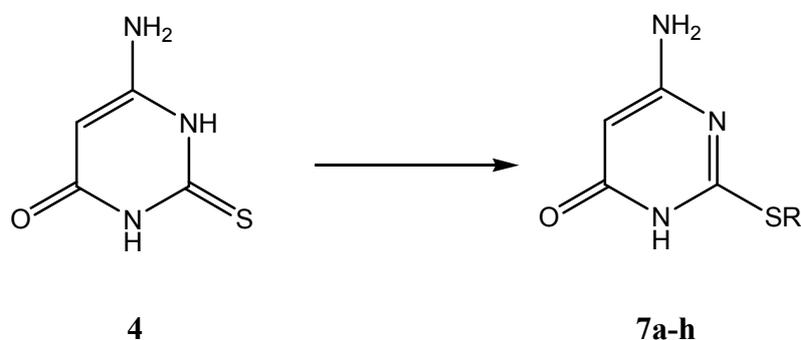
Caratteristiche del composto **6**:

Resa: 72%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H); 3.14 (t, 2H, J = 4 Hz); 3.40-3.48 (m, 2H); 4.73 (bs, 4H); 5.26 (s, 1H); 5.75 (bs, 1H); 7.12 (d, 1H, J = 8 Hz); 7.42-7.57 (m, 2H); 8.21 (d, 2H, J = 8 Hz); 8.54 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (neat) : 3450, 3220, 1720, 1690 cm^{-1} .

Procedura generale per la preparazione dei composti **7a-h**:

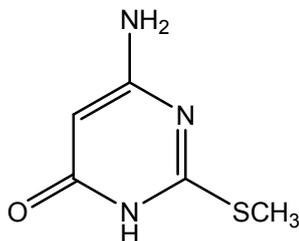


A una soluzione del composto **4** (0.5 g, 3.49 mmol) in 35 ml di NaOH 0.1 M in CH₃OH, si aggiunge l'opportuno alchilante (3.49 mmol).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 ore. Quindi si evapora il solvente fino ad avere 4-5 ml di residuo che viene posto in frigo per 24 ore.

Il residuo viene poi lavato con H₂O (10-15 ml) e filtrato così da ottenere il composto desiderato (solido o olio).

6-amino-2-metilsulfanil-3H-pirimidin-4-one (7a)



$C_5H_7N_3OS$
Mol. Wt.: 157,19

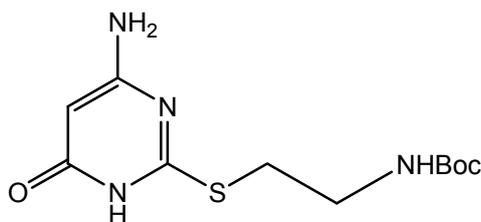
Resa: 81%.

Punto di fusione: 275-277 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.37 (s, 3H); 4.90 (s, 1H); 5.87 (bs, 2H); 7.97 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3465, 3218, 1685 cm^{-1} .

[2-(4-amino-6-oxo-1,6-diidro-pirimidin-2-ilsulfanil)-etil]-acido carbammico *tert*-butil ester (7b)



$C_{11}H_{18}N_4O_3S$
Mol. Wt.: 286,35

Resa: 76%.

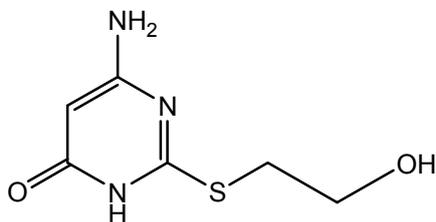
Punto di fusione: 183-185 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.37 (s, 9H); 3.04 (t, 2H, $J = 3.4$ Hz); 3.16 (q, 2H, $J = 2$ Hz); 4.86 (s, 1H); 6.10 (bs, 2H); 7.01 (bs, 1H); 11.20 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3450, 3220, 1720, 1690 cm^{-1} .

MS (ESI): $[MH]^+ = 287$.

6-amino-2-(2-idrossi-etilsulfanil)-3H-pirimidin-4-one (7c)



$C_6H_9N_3O_2S$
Mol. Wt.: 187,22

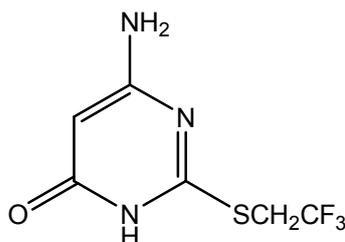
Resa: 81%.

Punto di fusione: >270 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.15 (t, 2H, J = 4 Hz); 3.38 (bs, 1H); 3.58 (t, 2H, J = 6 Hz); 4.88 (s, 1H); 6.40 (bs, 2H); 10.80 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3450, 3280, 3220, 1690 cm^{-1} .

6-amino-2-(2,2,2-trifluoro-etilsulfanil)-3H-pirimidin-4-one (7d)



$C_6H_6F_3N_3OS$
Mol. Wt.: 225,19

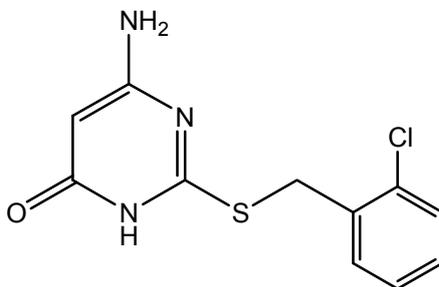
Resa: 72%.

Punto di fusione: 215-217 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.94 (q, 2H, J = 10 Hz); 4.95 (bs, 2H); 5.28 (s, 1H); 10.10 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3400, 3223, 1690 cm^{-1} .

6-amino-2-(2-cloro benzilsulfanil)-3H-pirimidin-4-one (7e)



C₁₁H₁₀ClN₃OS
Mol. Wt.: 267,73

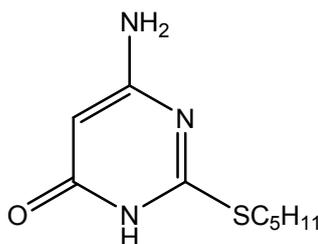
Resa: 76%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 4.40 (s, 2H); 4.98 (bs, 1H); 6.61 (bs, 2H); 7.28-7.31(m, 2H); 7.45-7.47(m, 1H); 7.68-7.71 (m, 1H); 11.45 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3380, 3234, 1692 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 268.

6-amino-2-pentilsulfanil-3H-pirimidin-4-one (7f)



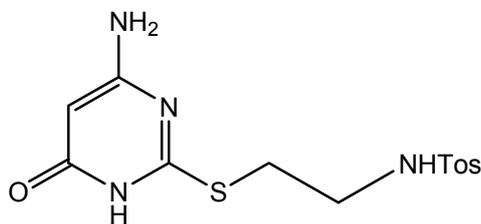
C₉H₁₅N₃OS
Mol. Wt.: 213,3

Resa: 68%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0.86 (t, 3H, J = 3 Hz); 1.30-1.33 (m, 4H); 1.58-1.61 (m, 2H); 3.04 (t, 2H, J = 4 Hz); 5.75 (s, 1H); 6.40 (bs, 2H); 11.55 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3378, 3241, 1690 cm⁻¹.

N-[2-(4-amino-6-oxo-1,6-diidro-pirimidin-2-ilsulfanil)-etil]-4-metil-benzensulfonamide (7g)



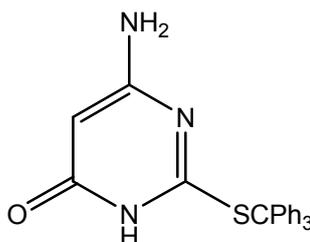
$C_{13}H_{16}N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 340,42

Resa: 65%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.42 (s, 3H); 3.09-3.12 (m, 2H); 3.26 (s, 2H); 3.39 (t, 2H, J = 6 Hz); 4.92 (s, 1H); 7.30 (d, 2H, J = 6 Hz); 7.61 (bs, 1H); 7.74 (d, 2H, J = 6 Hz); 11.41 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3380, 3292, 3250, 1690 cm^{-1} .

6-amino-2-tritilsulfanil-3H-pirimidin-4-one (7h)



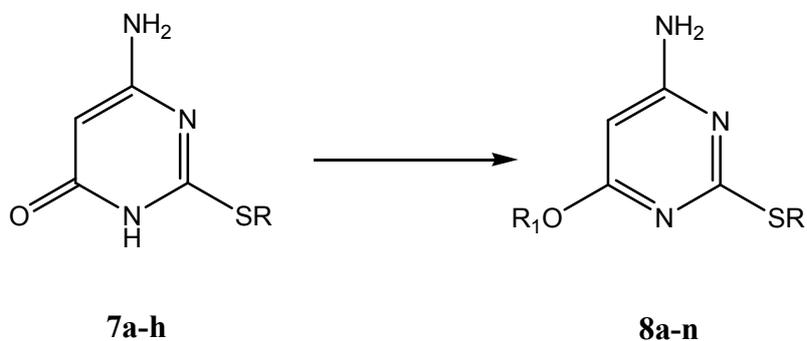
$C_{23}H_{19}N_3OS$
Mol. Wt.: 385,48

Resa: 52%.

1H NMR ($DMSO-d_6$) δ : 6.25 (s, 1H); 6.49 (bs, 2H); 7.22-7.44 (m, 15H); 11.49 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3380, 3312, 1690 cm^{-1} .

Procedura generale per la preparazione dei composti **8a-n**:

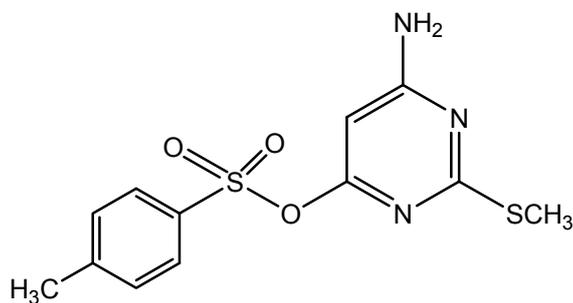


A una soluzione del composto 6-amino-2-sostituito-3H-pirimidin-4-one, **7a-h**, (1.74 mmol) in diossano (10 ml) e DMF (10 ml), vengono aggiunti TEA (1.74 mmol, 0.24 ml) e l'opportuno aril solfonile (1.74 mmol).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5ore. Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H₂O ed estratto con Etile Acetato.

La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata e successivamente purificata con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 8:2) ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

Toluen-4- acido solfonico 6-ammino-2-metilsulfanil-pirimidin-4-il estere (8a)



$C_{12}H_{13}N_3O_3S_2$
Mol. Wt.: 311,38

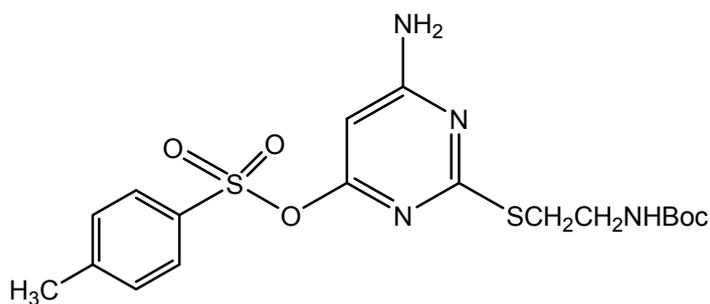
Resa: 68%.

Punto di fusione: >270 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.16 (s, 3H); 2.42 (s, 3H); 5.83 (s, 1H); 7.33 (bs, 2H); 7.50 (d, 2H, J = 8 Hz), 7.86 (d, 2H, J = 8 Hz), 11.49 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3385, 3320, 1715 cm^{-1} .

Toluen-4-acido solfonico 6-ammino-2-(2-tertbutossicarbonilamino-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8b)



$C_{18}H_{24}N_4O_5S_2$
Mol. Wt.: 440,54

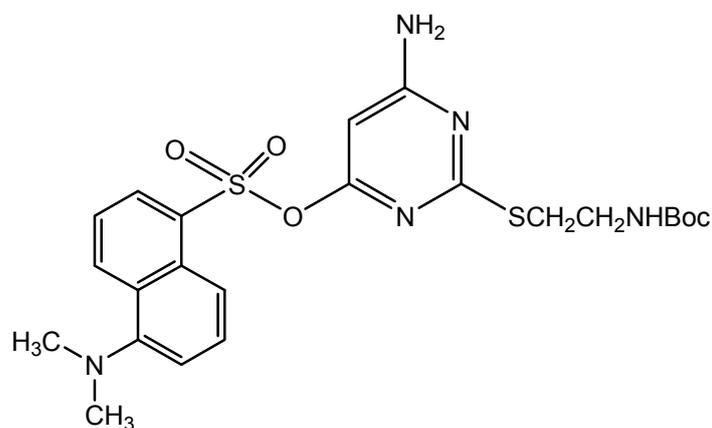
Resa reazione: 71%.

Punto: 228-230 °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.42 (s, 9H); 2.46 (s, 3H); 2.96 (t, 2H, $J = 4$ Hz); 3.27 (q, 2H, $J = 4$ Hz); 4.99 (bs, 1H); 5.12 (bs, 2H); 5.85 (s, 1H); 5.36 (d, 2H, $J = 4$ Hz); 7.87 (d, 2H, $J = 4$ Hz).

IR (KBr) : 3450, 3220, 1720, 1362, 1180 cm^{-1} .

5-dimetilamino-nafttalene-1-acido solfonico -6-ammino-2-(2-tertbutossicarbonilamino-etillsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8c)



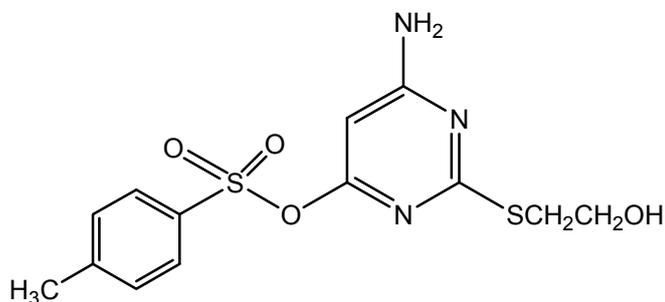
$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2$
Mol. Wt.: 519,64

Resa: 67%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.37 (s, 9H); 2.61 (t, 2H, $J = 6$ Hz); 2.85 (s, 6H); 2.96-3.11 (m, 2H); 4.83 (t, 1H, $J = 6$ Hz), 5.56 (bs, 2H); 5.84 (s, 1H); 7.18 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.51-7.62 (m, 4H); 8.22-8.31 (m, 4H); 8.60 (d, 2H, $J = 8$ Hz).

IR (KBr) : 3455, 3230, 1717, 1358, 1180 cm^{-1} .

Toluen-4- acido solfonico 6-ammino-2-(2-idrossi-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8d)



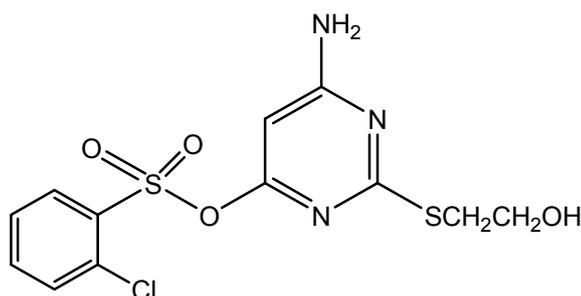
$C_{13}H_{15}N_3O_4S_2$
Mol. Wt.: 341,41

Resa: 75%.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.42 (s, 3H); 2.85 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.45 (t, 2H, J = 6 Hz); 4,75 (bs, 1H); 5.83 (s, 1H); 7.33 (bs, 2H); 7.49 (d, 2H, J = 8 Hz); 7.86 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr) : 3385, 1721, 1358, 1180 cm^{-1} .

Acido 2-cloro-benzensolfonico 6-ammino-2-(2-idrossi-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8e)



$C_{12}H_{12}ClN_3O_4S_2$
Mol. Wt.: 361,82

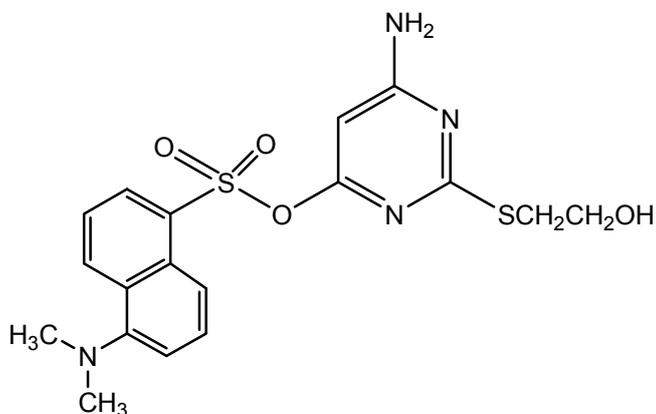
Resa: 54%.

1H NMR (CDCl $_3$) δ : 2.86 (bs, 1H); 2.90 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.67 (t, 2H, J = 6 Hz), 5.58 (bs, 2H); 5.86 (s, 1H); 7.45-7.49 (m, 1H); 7.57-7.60 (m, 2H); 8.08-8.12 (m, 1H).

IR (KBr) : 3398, 1720, 1360, 1180 cm^{-1} .

**5-dimetilamino-nafttalene-1-solfonico
pirimidin-4-il estere (8f)**

6-amino-2-(2-idrossi-etilsulfanil)-



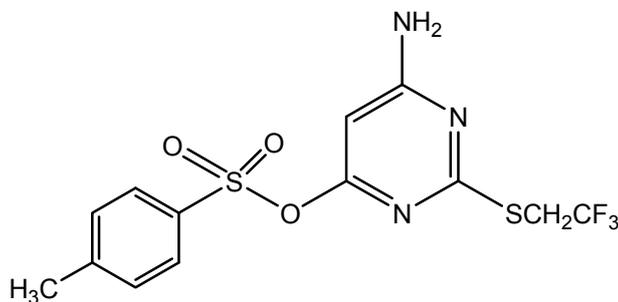
$C_{18}H_{20}N_4O_4S_2$
Mol. Wt.: 420,51

Resa: 77%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.83 (bs, 1H); 2.73 (t, 2H, J = 6 Hz); 2.85 (s, 6H); 3.48 (t, 2H, J = 6 Hz), 5.49 (bs, 2H); 5.81 (s, 1H); 7.18 (d, 2H, J = 8 Hz); 7.48-7.63 (m, 4H); 8.24-8.30 (m, 4H); 8.60 (d, 2H, J=8 Hz).

IR (KBr) : 3456, 3230, 1720, 1356, 1180 cm^{-1} .

**Toluen-4-acido solfonico 6-amino-2-(2,2,2-trifluoro-etilsulfanil)-pirimidin-4-il
estere (8g)**



$C_{13}H_{12}F_3N_3O_3S_2$
Mol. Wt.: 379,38

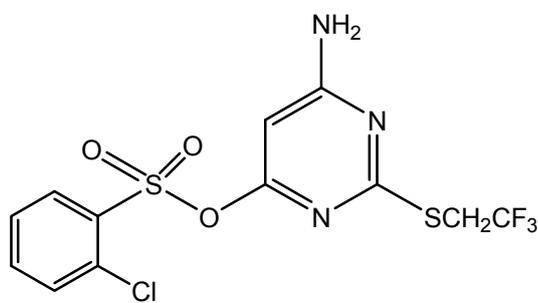
Resa: 71%.

Punto di fusione: 133-136 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.45 (s, 3H); 3.57 (q, 2H, J = 10 Hz); 5.23 (bs, 2H); 5.95 (s, 1H); 7.35 (d, 2H, J = 8 Hz); 7.87 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr) : 3450, 3220, 1360, 1170 cm⁻¹.

2-cloro- acido benzensolfonico 6-amino-2-(2,2,2-trifluoro-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8h)



C₁₂H₉ClF₃N₃O₃S₂
Mol. Wt.: 399,8

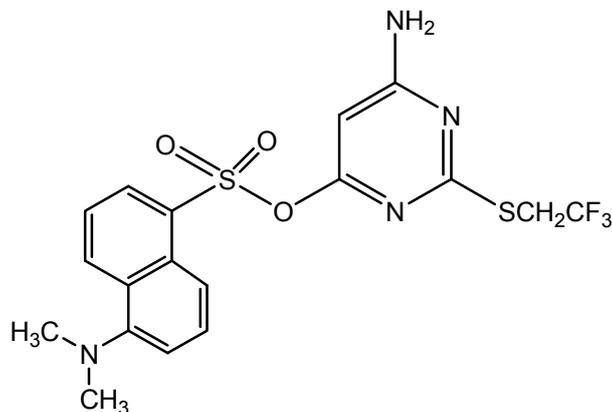
Resa: 62%.

Punto di fusione: 119-121 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.42 (q, 2H, J = 10 Hz); 5.26 (bs, 2H); 5.98 (s, 1H); 7.54-7.57 (m, 1H); 7.60-7.62 (m, 2H); 8.09-8.13 (m, 1H).

IR (KBr) : 3400, 3230, 1360, 1180 cm⁻¹.

**5-dimetilamino-naftalene-1- acido solfonico 6-amino-2-(2,2,2-trifluoro-
etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8i)**



$C_{18}H_{17}F_3N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 458,48

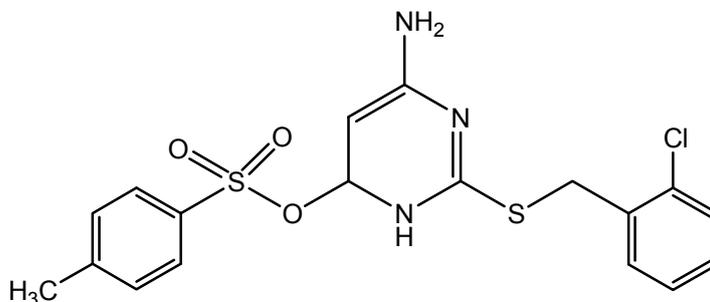
Resa: 65%.

Punto di fusione: 163-165 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.90 (s, 6H); 3.34 (q, 2H, J = 10 Hz); 5.10 (bs, 2H); 5.96 (s, 1H); 7.24 (d, 1H, J = 7 Hz); 7.52-7.67 (m, 2H); 8.28-8.35 (m, 2H); 8.66 (d, 1H, J = 7 Hz).

IR (KBr) : 3450, 3225, 1350, 1170 cm^{-1} .

**Toluene-4- acido solfonico 6-amino-2-(2-cloro benzilsulfanil)-pirimidin-4-il
estere (8j)**



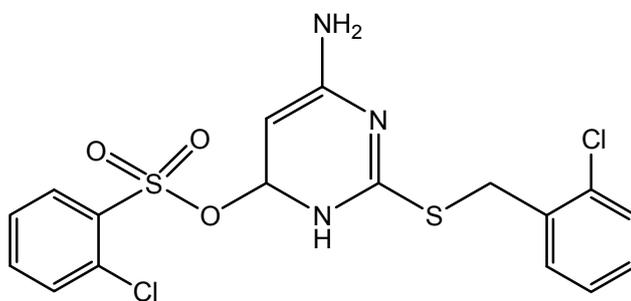
$C_{18}H_{18}ClN_3O_3S_2$
Mol. Wt.: 423,94

Resa: 68%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 2.35 (s, 3H); 4.10 (s, 2H); 5.87 (s, 1H); 7.25-7.30 (m, 2H); 7.42-7.49 (m, 6H); 7.86 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr) : 3430, 3280, 1358, 1180 cm⁻¹.

2-cloro- acido benzensolfonico 6-amino-2-(2-cloro benzilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8k)



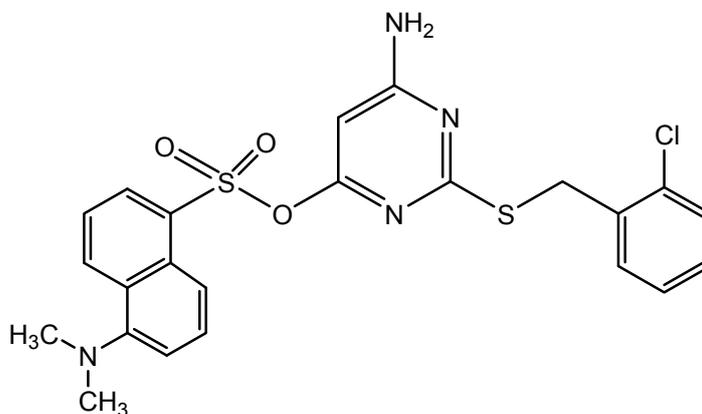
C₁₇H₁₅Cl₂N₃O₃S₂
Mol. Wt.: 444,36

Resa: 43%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 3.92 (s, 2H); 5.91 (s, 1H); 7.23-7.81 (m, 8H); 8.08-8.12 (m, 2H).

IR (KBr) : 3435, 3282, 1358, 1180 cm⁻¹.

5-dimetilamino-naftalene-1-acidosolfonico 6-amino-2-(2-cloro benzilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (8l)



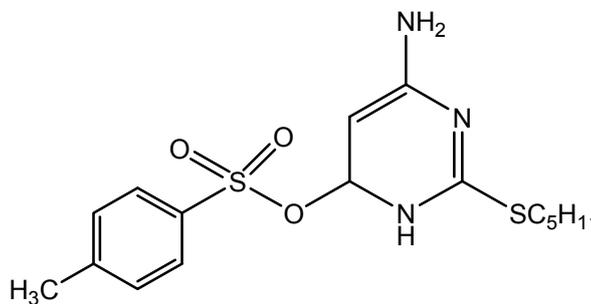
$C_{23}H_{21}ClN_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 501,02

Resa: 51%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.76 (s, 6H); 3.75 (s, 2H); 5.09 (bs, 2H); 5.89 (s, 1H); 6.90-6.92 (m, 2H); 7.03-7.27 (m, 3H); 7.48-7.62 (m, 2H); 8.27-8.34 (m, 2H); 8.56-8.59 (m, 1H).

IR (KBr): 3445, 3220, 1350, 1170 cm^{-1} .

Toluene-4- acido solfonico 6-amino-2-pentil-pirimidin-4-il estere (8m)



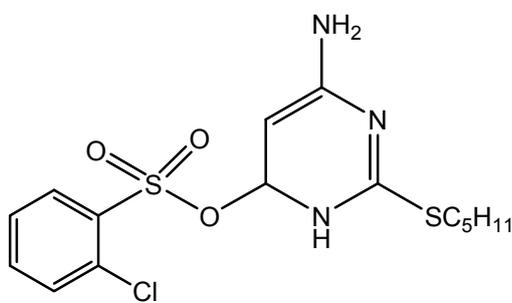
$C_{18}H_{18}ClN_3O_3S_2$
Mol. Wt.: 423,94

Resa: 71%.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.87 (t, 3H, J = 6 Hz); 1.19-1.42 (m, 6H); 2.44 (s, 3H); 2.82 (t, 2H, J = 8 Hz); 5.09 (bs, 2H); 5.87 (s, 1H); 7.33 (d, 2H, J = 8 Hz); 7.88 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr): 3450, 3215, 1350, 1172 cm⁻¹.

2-cloro- acido benzensolfonico 6-amino-2-pentilpirimidin-4-il estere (8n)



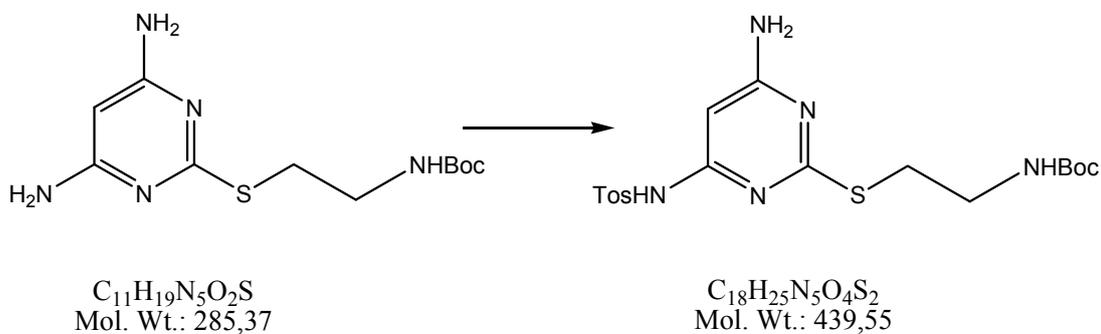
C₁₅H₂₀ClN₃O₃S₂
Mol. Wt.: 389,92

Resa: 67%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0.84 (t, 3H, J = 6 Hz); 1.18-1.38 (m, 6H); 2.87-2.89 (m, 2H); 5.87 (s, 1H); 7.37 (bs, 2H); 7.758-7.63 (m, 2H); 7.80-7.82 (m, 2H); 8.15-8.17 (m, 1H).

IR (KBr): 3432, 3278, 1358, 1180 cm⁻¹.

Preparazione di: **tert-butil 2-(4-amino-6-(tosilamino)pirimidin-2-iltio)etilcarbammato (9)**

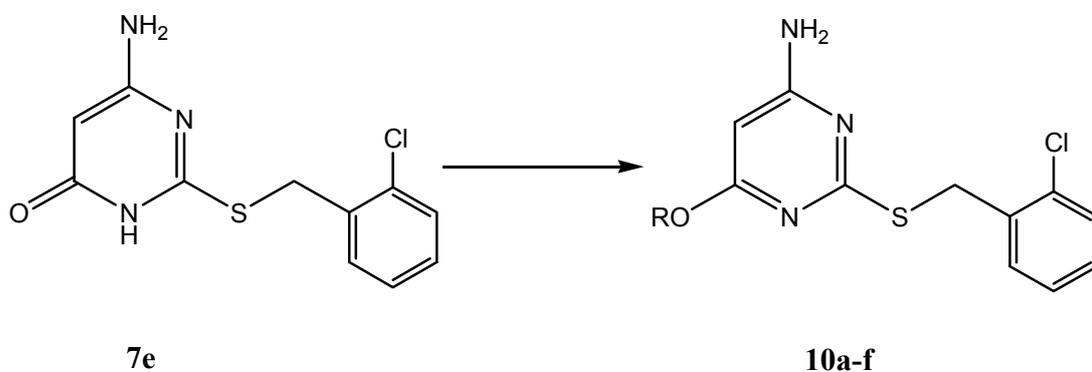


Il composto **6** (0.29 g, 1 mmol) viene sciolto in piridina (5 mL) e addizionato di Tosil cloruro (0.23 g, 1.2 mmol).

La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di petrolio 8:2).

Procedura generale per la preparazione dei composti **10a-e**²²

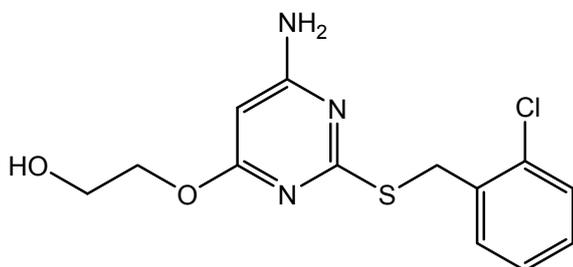


A una soluzione del composto **7e** (50 mg, 0.187 mmol) in DMF anidra (0.561 ml), vengono aggiunti K_2CO_3 anidro (3 eq) e goccia a goccia l'opportuno alchilante (1 eq).

La soluzione viene lasciata in agitazione a 80-85°C per 2-4 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:1 o 1:2) ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

2-[6-amino-2-(2-cloro-benzilsulfanil)-pirimidin-4-ilossi]-etanolo (10a)



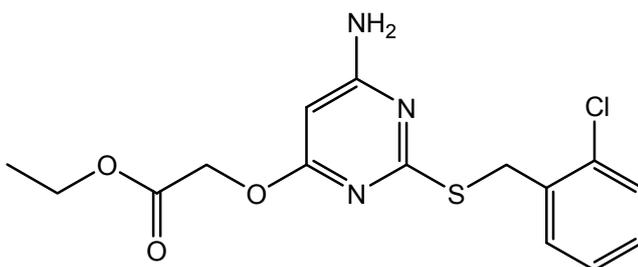
C₁₃H₁₄ClN₃O₂S
Mol. Wt.: 311,79

Resa: 83%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 1.94 (s, 1H); 3.68-3.72 (q, 2H, J = 5.2 Hz); 4.22-4.24 (t, 2H, J = 5.2 Hz); 4.36 (s, 2H); 5.46 (s, 1H); 5.83 (bs, 2H); 7.12 (m, 2H); 7.21 (m, 1H); 7.49 (m, 1H).

IR (KBr) : 3332, 3211, 1709, 1547, 1344 cm⁻¹.

[6-amino-2-(2-cloro-benzilsulfanil)-pirimidin-4-ilossi]-acido acetico etil estere (10b)



C₁₅H₁₆ClN₃O₃S
Mol. Wt.: 353,82

Resa: 80%.

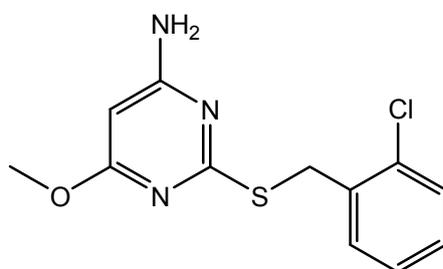
Punto di fusione: 133-140 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 1.10-1.17 (t, 3H, J = 7 Hz); 4.08-4.12 (q, 2H, J = 7 Hz); 4.35 (s, 2H); 4.82-4.85 (s, 2H); 5.52 (s, 1H); 6.87 (bs, 2H); 7.29 (m, 2H), 7.44 (m, 1H), 7.59 (m, 1H).

IR (KBr) : 3440, 3172, 1749, 1547, 1194 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 354-356.

2-(2-Cloro-benzilsulfanil)-6-metossi-pirimidin-4-ilamina (10c)



C₁₂H₁₂ClN₃OS
Mol. Wt.: 281,76

Resa: 17%.

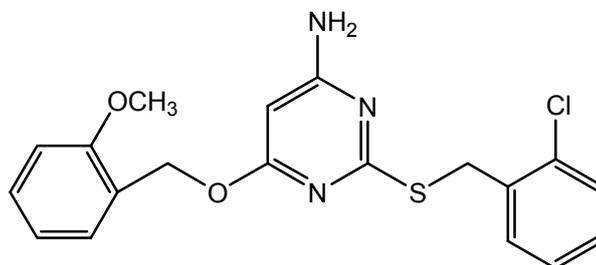
¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.86 (s, 3H); 4.49 (s, 2H); 4.74 (bs, 2H); 5.47 (s, 1H); 7.19(m, 2H); 7.34 (m, 1H); 7.54 (m, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 29.78, 32.67, 53.79, 83.16, 126.86, 128.47, 129.52, 130.78, 134.29, 135.98, 164.20, 170.11.

IR (KBr) : 3444, 3145, 1650, 1546, 1386, 1214 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 282.1.

2-(2-Cloro-benzilsulfanil)-6-(2-metossi-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (10d)



$C_{19}H_{18}ClN_3O_2S$
Mol. Wt.: 387,88

Resa: 92%.

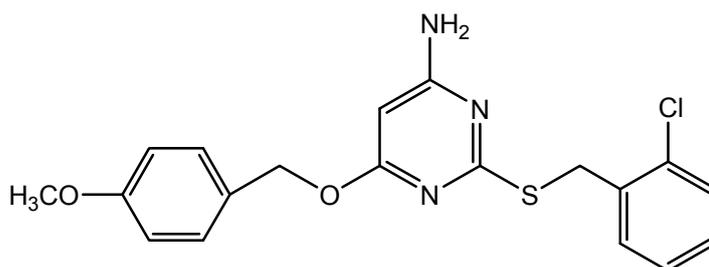
Punto di fusione: 112-122 °C.

1H NMR (CDCl₃) δ : 3.83 (s, 3H); 4.48 (s, 2H); 4.67 (bs, 2H); 5.41 (s, 2H); 5.55 (s, 1H); 6.90 (m, 2H); 7.17 (m, 2H); 7.32 (m, 3H); 7.45 (m, 1H).

IR (KBr): 3481, 3377, 1619, 1580, 1239 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 388.

2-(2-Cloro-benzilsulfanil)-6-(4-metossi-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (10e)



$C_{19}H_{18}ClN_3O_2S$
Mol. Wt.: 387,88

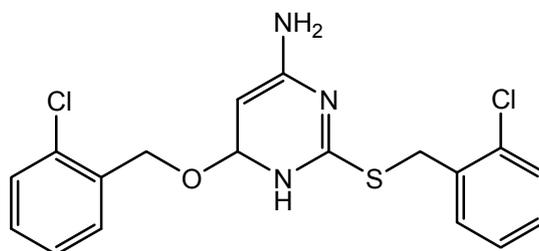
Resa: 56%.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.80 (s, 3H); 4.49 (s, 2H); 4.67 (bs, 2H); 5.26 (s, 2H); 5.50 (s, 1H); 6.85-6.89 (d, 2H, J = 8.8 Hz); 7.16-7.20 (d, 2H, J = 9.2 Hz); 7.28 (m, 3H); 7.51 (m, 1H).

IR (KBr): 3452, 3156, 1652, 1583, 1202, 1173 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 388.1.

6-(2-cloro-benzilossi)-2-(2-cloro-benzilsulfanil)-pirimidin-4-il amina (10f)



C₁₈H₁₇Cl₂N₃OS
Mol. Wt.: 394,32

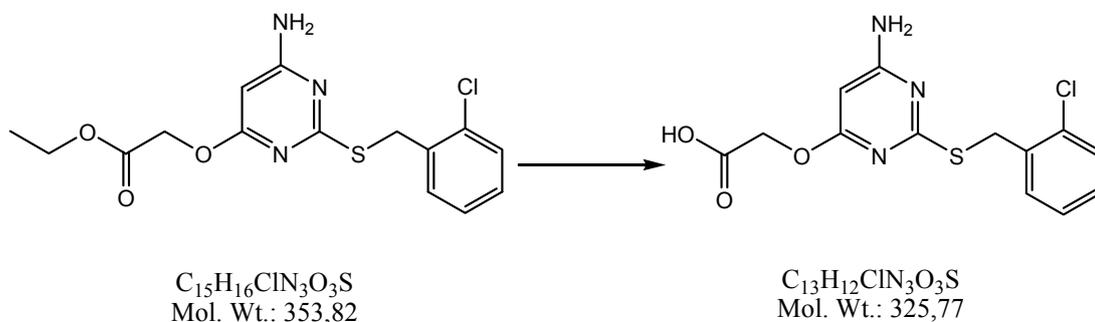
Resa: 82%.

Punto di fusione: > 270 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 4.37 (s, 2H); 5.37 (s, 2H); 5.52 (s, 1H); 6.86 (bs, 2H); 7.21-7.53 (m, 8H).

IR (KBr) : 3356, 1558 cm⁻¹.

Preparazione del composto: **[6-amino-2-(2-cloro-benzilsulfanil)-pirimidin-4-ilossi]-acido acetico (10g)**



Si scioglie il composto **10b** (10 mg, 0.0283 mmol) nella miscela THF/CH₃OH/H₂O (3:3:1) e si aggiunge LiOH · H₂O (3 eq, 3.56 mg)

La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 ore.

Quindi si evapora il solvente, si acidifica con una soluzione di HCl al 10% fino a pH 5 e si estrae con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata ottenendo il composto desiderato (olio).

Caratteristiche del composto (**10g**):

Resa: 30%.

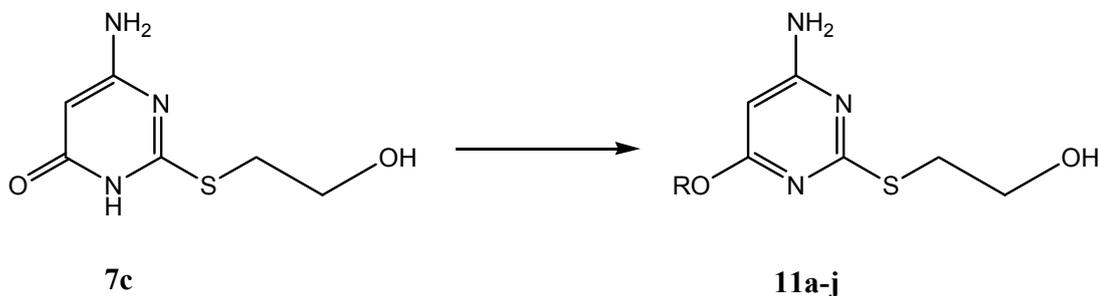
Punto di fusione: > 230° C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 4.36 (s, 1H); 4.75 (s, 2H); 5.49 (s, 1H); 6.84 (bs, 2H); 7.26-7.62 (m, 4H).

IR (KBr): 2922, 1715, 1590, 1216 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 326.2.

Procedura generale per la preparazione dei composti **11a-j**:



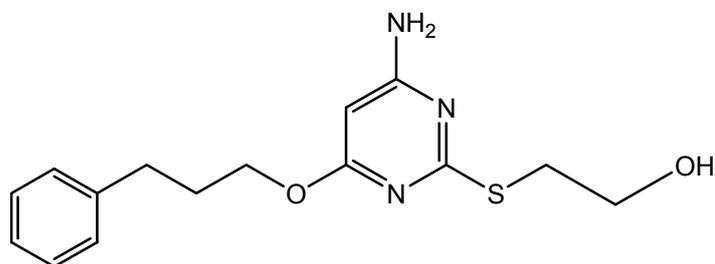
A una soluzione del composto **7c** (300 mg, 1.6043 mmol) in DMF anidra (4.813 ml), vengono aggiunti K_2CO_3 anidro (3 eq) e goccia a goccia l'opportuno alchilante (1 eq).

La soluzione viene lasciata in agitazione a 80-85°C per 2-3 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H_2O (10 mL) ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 , è stata evaporata e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:1) ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

2-[4-amino-6-(3-fenil-propossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11a)



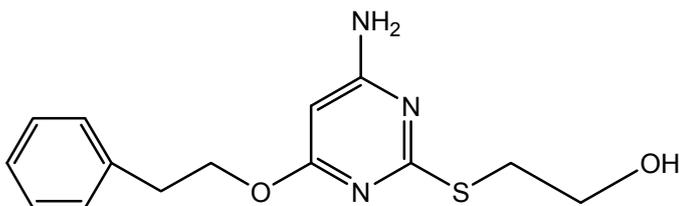
$C_{15}H_{19}N_3O_2S$
Mol. Wt.: 305,4

Resa: 18%.

Punto di fusione: 105-109 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.98 (s, 1H); 2.05-2.12 (m, 2H); 2.71-2.79 (m, 2H); 3.23-3.28 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 3.89-3.95 (m, 2H); 4.23-4.29 (t, 2H, J = 6.2 Hz); 4.72 (bs, 2H); 5.47 (s, 1H); 7.21-7.29 (m, 5H).

2-(4-amino-6-fenetilossi-pirimidin-2-ilsulfanil)-etanolo (11b)



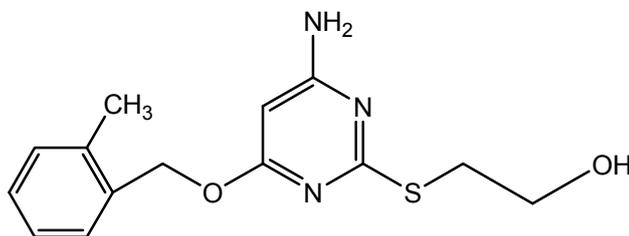
$C_{14}H_{17}N_3O_2S$
Mol. Wt.: 291,37

Resa: 22%.

Punto di fusione: 76-80 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.05 (s, 1H); 2.99-3.07 (m, 2H); 3.25-3.31 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 3.91-3.97 (m, 2H); 4.44-4.47 (m, 2H); 4.71 (bs, 2H); 5.47 (s, 1H); 7.24-7.34 (m, 5H).

2-[4-amino-6-(2-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11c)



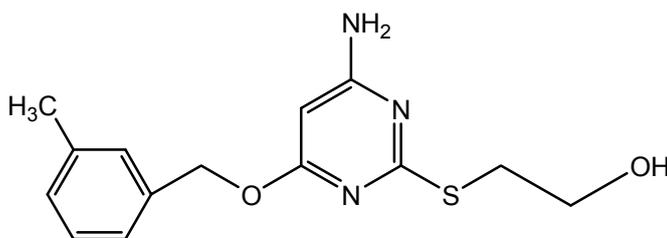
$C_{14}H_{17}N_3O_2S$
Mol. Wt.: 291,37

Resa: 10%.

Punto di fusione: 126-130°C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.05 (s, 1H); 2.39 (s, 3H); 3.29-3.34 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); 3.92-3.98 (m, 2H); 4.77 (bs, 2H); 5.36 (s, 2H); 5.58 (s, 1H); 7.29-7.39 (m, 4H).

2-[4-amino-6-(3-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11d)



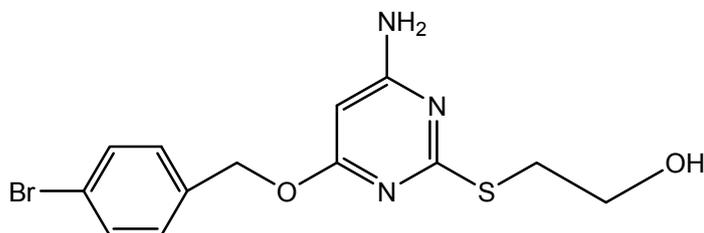
$C_{14}H_{17}N_3O_2S$
Mol. Wt.: 291,37

Resa: 10%.

Punto di fusione: 104-109 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.05 (s, 1H); 2.36 (s, 3H); 3.24-3.29 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz); 3.87-3.93 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz); 4.73 (bs, 2H); 5.29 (s, 2H); 5.55 (s, 1H); 7.12-7.26 (m, 4H).

2-[4-amino-6-(4-bromo-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11e)



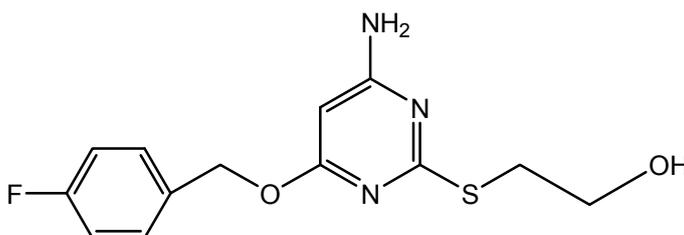
$C_{13}H_{14}BrN_3O_2S$
Mol. Wt.: 356,24

Resa: 26%.

Punto di fusione: 122-127 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.05 (s, 1H); 3.34 (m, 2H); 3.52-3.62 (m, 2H); 5.25 (s, 2H); 5.46 (s, 1H); 6.72 (bs, 2H); 7.33-7.38 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz); 7.55-7.59 (d, 2H, $J = 8$ Hz).

2-[4-amino-6-(4-fluoro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11f)



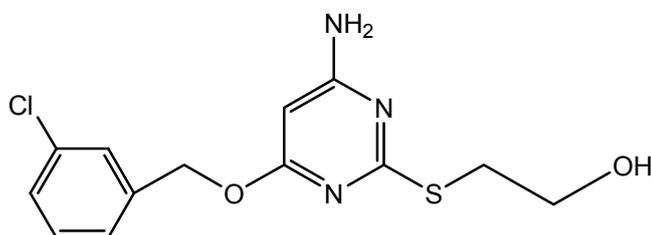
$C_{13}H_{14}FN_3O_2S$
Mol. Wt.: 295,33

Resa: 18%.

Punto di fusione: 131-135 °C.

1H NMR (CDCl $_3$) δ : 2.05 (s, 1H); 3.25-3.30 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); 3.89-3.95 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); 4.74 (bs, 2H); 5.29 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 7.01-7.41 (m, 4H).

2-[4-amino-6-(3-cloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11g)



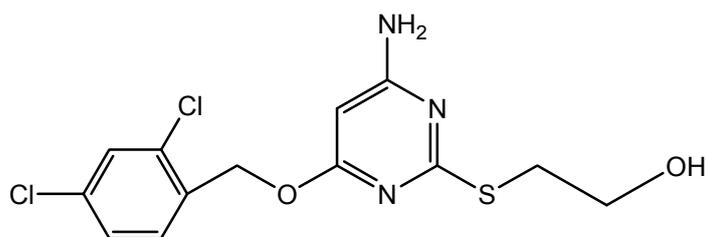
$C_{13}H_{14}ClN_3O_2S$
Mol. Wt.: 311,79

Resa: 10%.

Punto di fusione: 122-125 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.99 (s, 1H); 3.23-3.27 (m, 2H); 3.86-3.91 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 4.73 (s, 2H); 5.29 (bs, 2H); 5.55 (s, 1H); 7.28-7.39 (m, 4H).

2-[4-amino-6-(2,4-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11h)



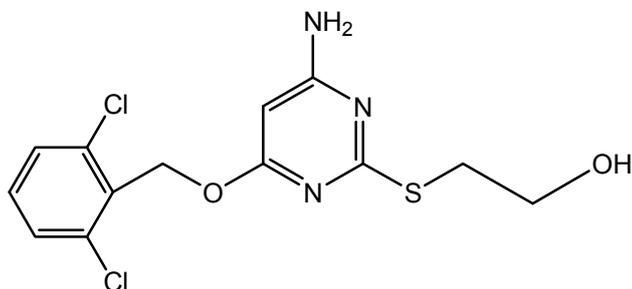
$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_2S$
Mol. Wt.: 346,23

Resa: 32%.

Punto di fusione: 124-127 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.17 (s, 1H); 3.23-3.26 (m, 2H); 3.86-3.91 (m, 2H, J = 5.4 Hz); 4.76 (s, 2H); 5.39 (bs, 2H); 5.57 (s, 1H); 7.23-7.41 (m, 3H).

2-[4-amino-6-(2,6-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11i)



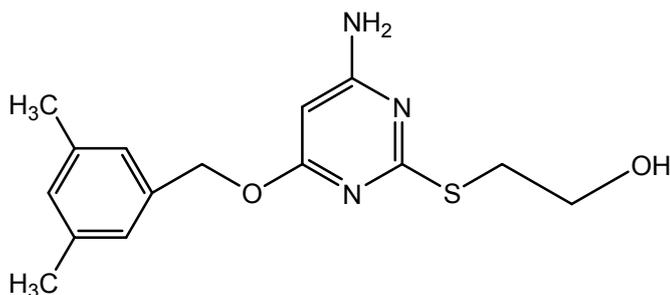
$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_2S$
Mol. Wt.: 346,23

Resa: 23%.

Punto di fusione: 141-145 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.01 (s, 1H); 3.11-3.19 (m, 2H); 3.63-3.65 (m, 2H); 4.32 (s, 1H); 5.43 (s, 2H); 5.75 (bs, 2H); 7.45-7.59 (m, 3H).

2-[4-amino-6-(3,5-dimetil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etanolo (11j)



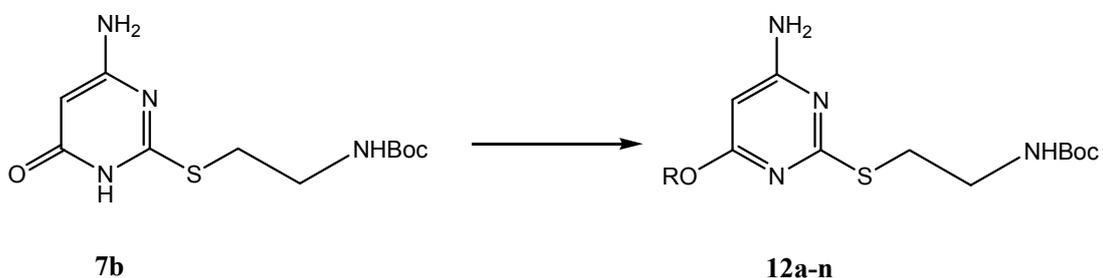
$C_{15}H_{19}N_3O_2S$
Mol. Wt.: 305,4

Resa: 12%.

Punto di fusione: 98-102 °C.

1H NMR (CDCl $_3$) δ : 2.13 (s, 1H); 2.316 (s, 6H); 3.21-3.29 (m, 2H); 3.88-3.93 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 4.78 (bs, 2H); 5.25 (s, 2H); 5.54 (s, 1H); 6.96-6.99 (m, 3H).

Procedura generale per la sintesi dei composti **12a-n**



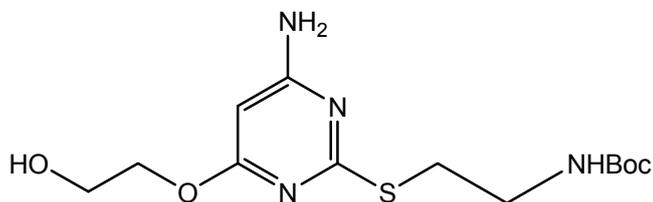
A una soluzione del composto **7b** (100 mg, 0.348 mmol) in DMF anidra (1.044 ml), vengono aggiunti K_2CO_3 anidro (3 eq) e goccia a goccia l'opportuno alchilante (1 eq).

La soluzione viene lasciata in agitazione a 80-85°C per 2-3 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H_2O (10 mL) ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 , è stata evaporata e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:1 o 1:2) ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

{2-[4-amino-6-(2-idroossi-etossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico tert-butil estere (12a)



$C_{13}H_{22}N_4O_4S$
Mol. Wt.: 330,4

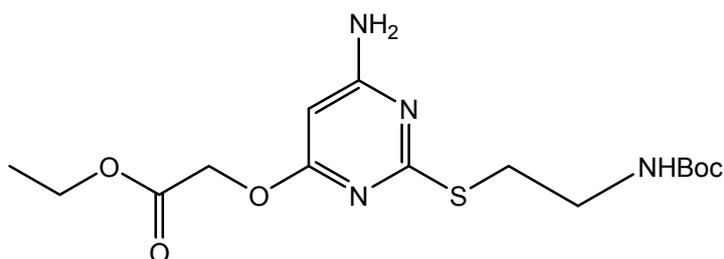
Resa: 20%.

1H NMR (CDCl₃) δ : 1.42 (s, 9H); 3.16-3.19 (t, 2H, J = 6.6 Hz); 3.43-3.47 (q, 2H, J = 6.4 Hz); 3.86- 3.91 (t, 2H, J = 5 Hz); 4.46 (t, 2H); 4.90 (bs, 2H); 5.50 (s, 1H).

IR (KBr) : 1800, 1773, 1156, 1070 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 331.3.

[6-amino-2-(2-tert-butossicarbonilamino-etilsulfanil)-pirimidin-4-ilossi]-acido acetico etil estere (12b)



$C_{15}H_{24}N_4O_5S$
Mol. Wt.: 372,44

Resa: 43%.

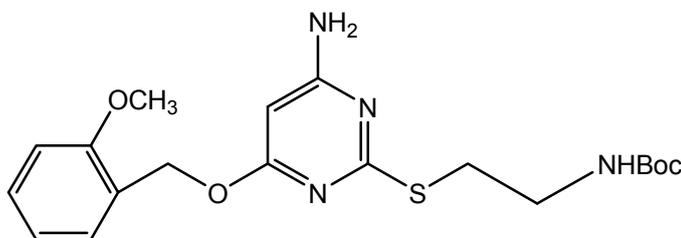
Punto di fusione: 106-112 ° C.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.27 (m, 3H), 1.44 (s, 9H); 3.11-3.14 (t, 2H, J = 6.4 Hz); 3.38-3.41 (q, 2H, J = 6.6 Hz); 4.17-4.28 (q, 2H, J = 7 Hz); 4.78 (bs, 2H); 4.82 (s, 2H); 5.62 (s, 1H).

IR (KBr) : 3460, 1746, 1654, 1188 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 373.3.

**{2-[4-amino-6-(2-metossi-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido
carbammico *tert*-butil estere (12c)**



C₁₉H₂₆N₄O₄S
Mol. Wt.: 406,5

Resa: 42%.

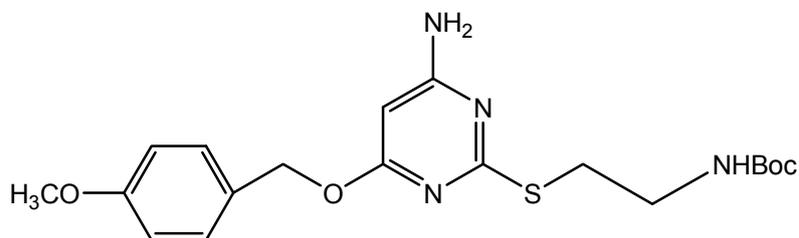
Punto di fusione: 112-122 ° C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.36 (s, 9H); 3.15 (m, 2H); 3.20 (m, 2H); 3.81 (s, 3H); 5.25 (s, 2H); 5.45 (s, 1H); 6.68 (bs, 2H); 6.99-7.11 (m, 3H); 7.16 (m, 2H).

IR (KBr) : 3348, 2973, 1694, 1578, 1244, 1161 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 406.8.

{2-[4-amino-6-(4-metossi-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12d)



C₁₉H₂₆N₄O₄S
Mol. Wt.: 406,5

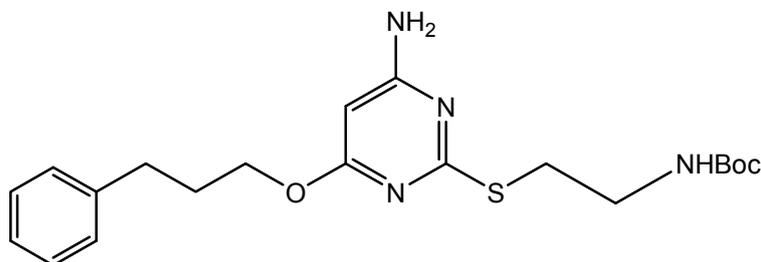
Resa: 23%.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.36 (s, 9H); 3.05 (m, 2H); 3.20 (m, 2H); 3.75 (s, 3H); 5.22 (s, 2H); 5.43 (s, 1H); 6.67 (bs, 2H); 6.89-6.94 (d, 2H, J = 8.4 Hz); 7.03 (bs, 1H); 7.32-7.36 (d, 2H, J = 8.8 Hz).

IR (KBr) : 3349, 2973, 1692, 1578, 1513, 1171 cm⁻¹.

MS (ESI): [MH]⁺ = 407.0.

{2-[4-amino-6-(3-fenil-propossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12e)

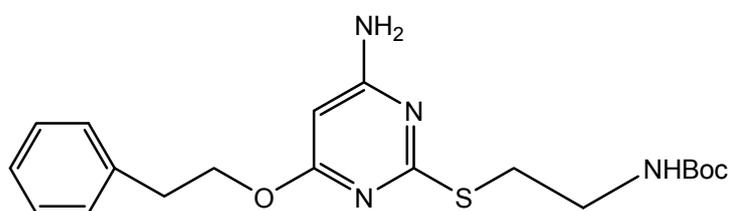


C₂₀H₂₈N₄O₃S
Mol. Wt.: 404,53

Resa: 27%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.43 (s, 9H); 2.04-2.06 (m, 2H); 2.75 (t, 2H, $J = 6$ Hz); 3.15 (m, 2H); 3.43-3.49 (m, 4H); 4.36 (bs, 2H); 5.09 (bs, 1H); 5.59 (s, 1H); 7.21-7.29 (m, 5H).

[2-(4-amino-6-fenilossi-pirimidin-2-ilsulfanil) -etil]-acido carbammico *tert*-butil estere (12f)



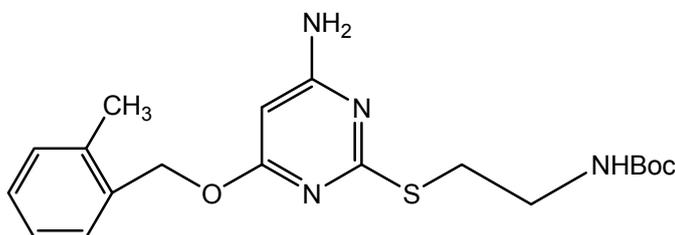
$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$
Mol. Wt.: 390,5

Resa: 20%.

Punto di fusione: 104-108 °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.42 (s, 9H); 3.04 (t, 2H, $J = 6$ Hz); 3.21 (m, 2H); 3.25 (m, 2H); 4.53 (t, 2H, $J = 6$ Hz); 5.05 (bs, 1H); 5.15 (bs, 2H); 5.52 (s, 1H); 7.28 (m, 5H).

**{2-[4-amino-6-(2-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico
tert-butil estere (12g)**



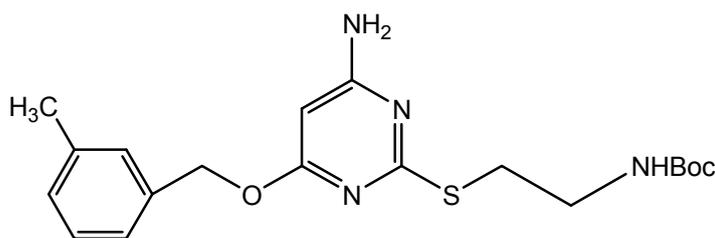
$C_{19}H_{26}N_4O_3S$
Mol. Wt.: 390,5

Resa: 71%.

Punto di fusione: 105-112 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H); 2.36 (s, 3H); 3.21 (m, 2H); 3.24 (m, 2H); 5.18-5.38 (bs, 3H); 5.38 (s, 2H); 5.64 (s, 1H); 7.23-7.39 (m, 4H).

**{2-[4-amino-6-(3-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico
tert-butil estere (12h)**

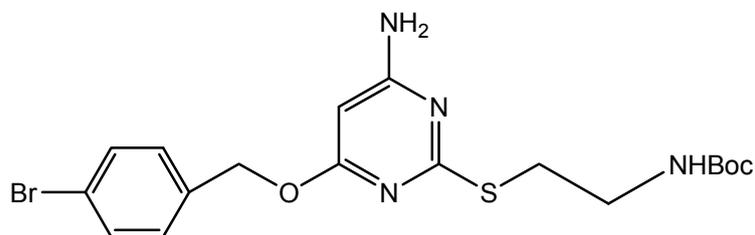


$C_{19}H_{26}N_4O_3S$
Mol. Wt.: 390,5

Resa: 68%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.43 (s, 9H); 2.36 (s, 3H); 3.21 (m, 2H); 3.24 (m, 2H); 5.20 (bs, 2H); 5.35 (s, 2H); 5.61 (s, 1H); 7.19-7.23 (m, 4H); 8.00 (bs, 1H).

**{2-[4-amino-6-(4-bromo-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido
carbammico *tert*-butil estere (12i)**



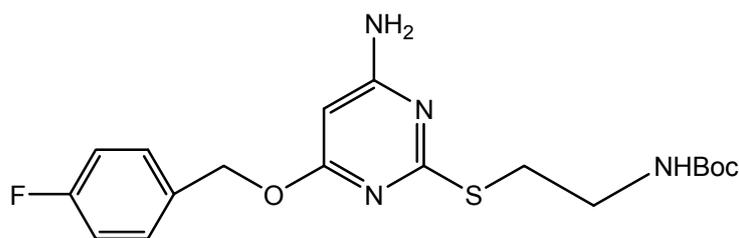
$C_{18}H_{23}BrN_4O_3S$
Mol. Wt.: 455,37

Resa: 40%.

Punto di fusione: 101-105 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H); 3.25 (m, 2H); 3.39 (m, 2H); 5.20 (bs, 1H); 5.36 (s, 2H); 5.66 (s, 1H); 5.80 (bs, 1H); 7.25 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz); 7.52 (d, 2H, $J=8$ Hz).

**{2-[4-amino-6-(4-fluoro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido
carbammico *tert*-butil estere (12j)**



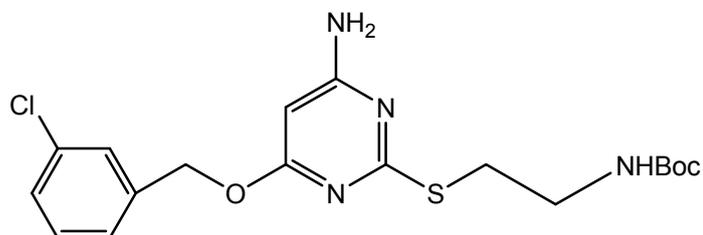
$C_{18}H_{23}FN_4O_3S$
Mol. Wt.: 394,46

Resa: 49%.

Punto di fusione: 106-112 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H); 3.20 (m, 2H); 3.43 (m, 2H); 5.25 (s, 3H); 5.60 (s, 1H); 7.01 (m, 2H); 7.41 (m, 2H).

{2-[4-amino-6-(3-cloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12k)

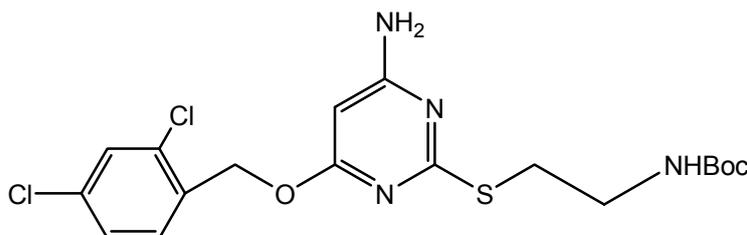


$C_{18}H_{23}ClN_4O_3S$
Mol. Wt.: 410,92

Resa: 58%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.40 (s, 9H); 3.17 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.39 (t, 2H, J = 6 Hz); 5.18 (bs, 3H); 5.34 (s, 2H); 5.58 (s, 1H); 7.24-7.39 (m, 4H).

{2-[4-amino-6-(2,4-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12l)



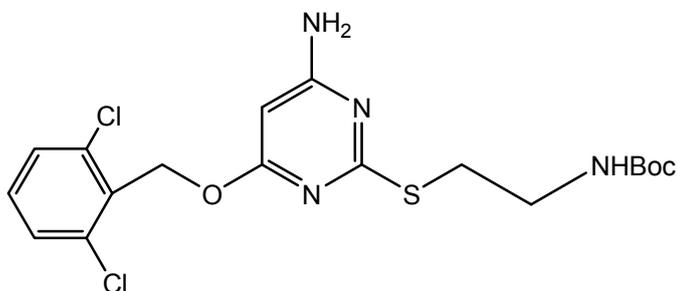
$C_{18}H_{22}Cl_2N_4O_3S$
Mol. Wt.: 445,36

Resa: 65%.

Punto di fusione: 136-140 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H); 3.20 (m, 2H); 3.45 (m, 2H); 5.18 (bs, 1H); 5.45 (s, 2H); 5.69 (s, 1H); 5.80 (bs, 2H); 7.26-7.42 (m, 3H).

{2-[4-amino-6-(2,6-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12m)



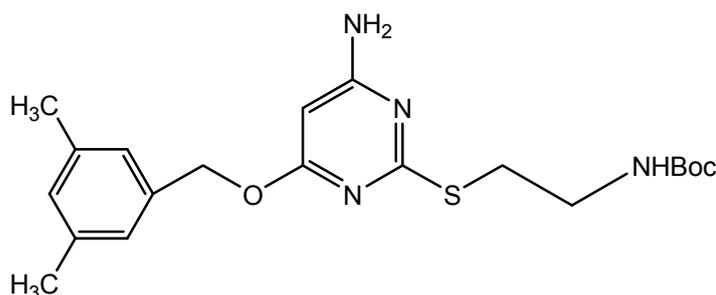
$C_{18}H_{22}Cl_2N_4O_3S$
Mol. Wt.: 445,36

Resa: 67%.

Punto di fusione: 140-145 °C.

1H NMR (CDCl₃) δ : 1.42 (s, 9H); 3.26 (m, 2H); 3.58 (m, 2H); 5.21 (bs, 1H); 5.41 (bs, 2H); 5.58 (s, 2H); 5.62 (s, 1H); 7.29-7.38 (m, 3H).

{2-[4-amino-6-(3,5-dimetil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-acido carbammico *tert*-butil estere (12n)



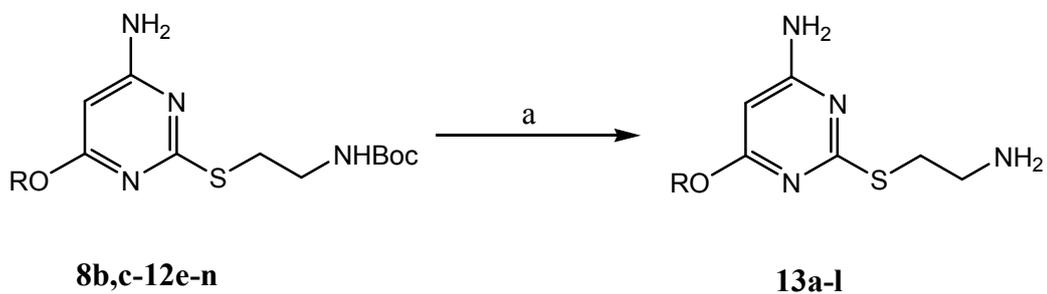
$C_{20}H_{28}N_4O_3S$
Mol. Wt.: 404,53

Resa: 43%.

Punto di fusione: 124-129 °C.

1H NMR (CDCl₃) δ : 1.43 (s, 9H); 2.32 (s, 6H); 3.23 (m, 2H); 3.41 (m, 2H); 5.19 (bs, 1H); 5.21 (bs, 2H); 5.31 (s, 2H); 5.60 (s, 1H); 6.97-6.99 (m, 3H).

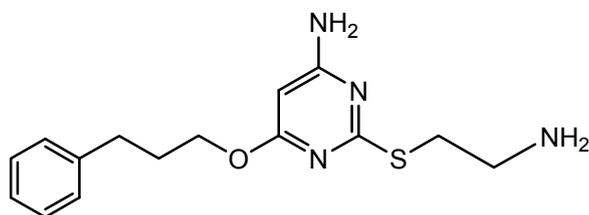
Procedura generale per la sintesi dei composti **13a-l**



Si scioglie il composto protetto NHBoc (**8b,c-12e-n**), (0.1236 mmol) in CF_3COOH per 45 minuti o in una soluzione di HCl al 37% in AcOEt (3 ml) per 1-2 ore in agitazione a temperatura ambiente.

Quindi si evapora il solvente ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

2-(2-aminoetilsulfanil)-6-(3-fenil-propossi)-pirimidin-4-ilamina (13a)

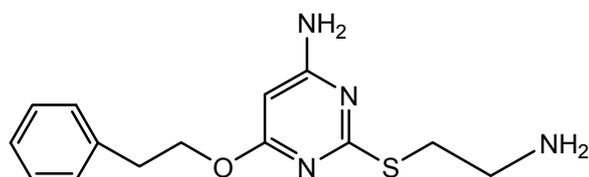


$C_{15}H_{20}N_4OS$
Mol. Wt.: 304,41

Punto di fusione: 195-200 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.91-1.99 (m, 2H); 2.65-2.73 (m, 4H); 3.20-3.23 (m, 4H); 4.15-4.21 (bs, 2H); 5.49 (s, 1H); 7.23-7.29 (m, 5H); 8.21 (bs, 2H).

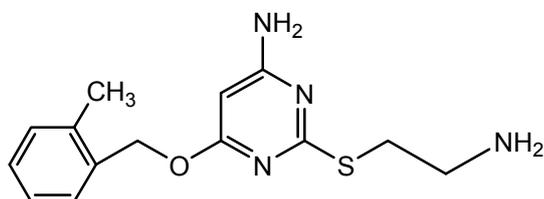
2-(2-aminoetilsulfanil)-6-fenetilossi-pirimidin-4-ilamina (13b)



$C_{14}H_{18}N_4OS$
Mol. Wt.: 290,38

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.91-1.99 (m, 2H); 2.99-3.00 (m, 2H); 3.13 (m, 2H); 3.25 (m, 2H); 4.37-4.44 (bs, 2H); 5.46 (s, 1H); 7.29 (m, 5H); 8.17 (bs, 2H).

2-(2-aminoetilsulfanil)-6-(2-metil-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13c)

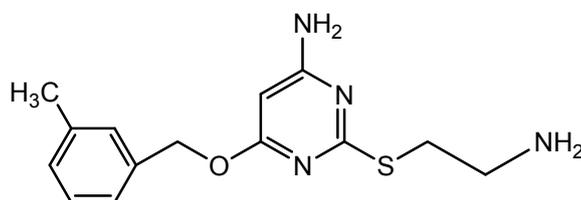


$C_{14}H_{18}N_4OS$
Mol. Wt.: 290,38

Punto di fusione: 140-148 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.30 (s, 3H); 3.12 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 4.54 (bs, 2H); 5.27 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 7.23-7.37 (m, 4H); 8.17 (bs, 2H).

2-(2-aminoetilsulfanil)-6-(3-metil-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13d)

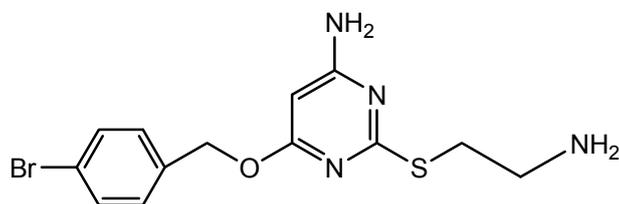


$C_{14}H_{18}N_4OS$
Mol. Wt.: 290,38

Punto di fusione: 174-179 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.31 (s, 3H); 3.11 (m, 2H); 3.23 (m, 2H); 5.25 (bs, 4H); 5.54 (s, 1H); 7.16-7.27 (m, 4H); 8.17 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(4-bromo-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13e)

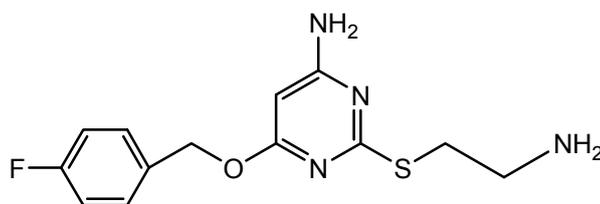


$C_{13}H_{15}BrN_4OS$
Mol. Wt.: 355,25

Punto di fusione: 203-206 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.09 (m, 2H); 3.24 (m, 2H); 4.78 (bs, 2H); 5.26 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 7.356-7.40 (d, 2H, J = 8.8 Hz); 7.56-7.60 (d, 2H, J = 8.4 Hz); 8.16 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(4-fluoro-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13f)

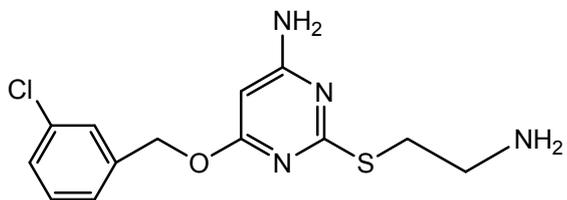


$C_{13}H_{15}FN_4OS$
Mol. Wt.: 294,35

Punto di fusione: 176-184 °C .

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.15 (m, 2H); 3.25 (m, 4H); 4.89 (bs, 2H); 5.28 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 7.21 (m, 2H); 7.47 (m, 2H); 8.17 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(3-cloro-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13g)



$C_{13}H_{15}ClN_4OS$
Mol. Wt.: 310,8

Punto di fusione: 84-89 °C .

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.09 (m, 2H); 3.25 (m, 2H); 4.53 (bs, 2H); 5.31 (s, 2H); 5.55 (s, 1H); 7.40-7.49 (m, 4H); 8.16 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(2,4-dicloro-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13h)

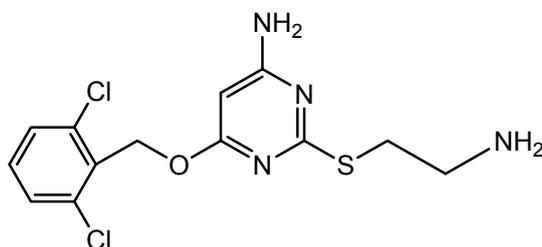


$C_{13}H_{14}Cl_2N_4OS$
Mol. Wt.: 345,25

Punto di fusione: 158-168 °C .

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.11 (m, 2H); 3.25 (m, 2H); 5.34 (bs, 2H); 5.55 (s, 2H); 7.49-7.69 (m, 3H); 7.70 (s, 1H); 8.17 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(2,6-dicloro-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13i)

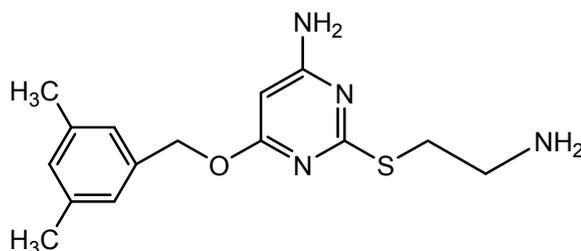


$C_{13}H_{14}Cl_2N_4OS$
Mol. Wt.: 345,25

Punto di fusione: 180-190 °C .

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 3.16 (m, 2H); 3.29 (m, 2H); 5.45-5.49 ((bs, 5H); 7.51-7.59 (m, 3H); 8.18 (bs, 2H).

2-(2-amino-etilsulfanil)-6-(3,5-dimetil-benzilossi)-pirimidin-4-ilamina (13j)

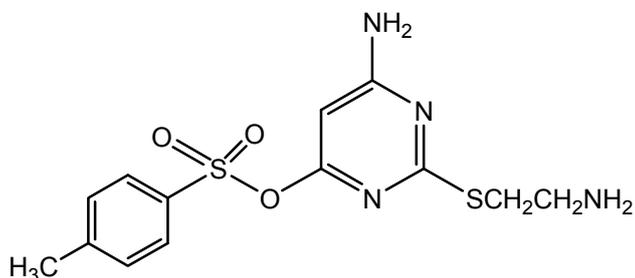


$C_{15}H_{20}N_4OS$
Mol. Wt.: 304,41

Punto di fusione: 155-162 °C .

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.27 (s, 6H); 3.11 (m, 2H); 3.27 (m, 2H); 4.94 (bs, 2H); 5.20 (s, 2H); 5.54 (s, 1H); 6.96-7.01 (m, 3H); 8.18 (bs, 2H).

Toluene-4- acido solfonico 6-amino-2-(2-amino-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (13k)



$C_{13}H_{16}N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 340,42

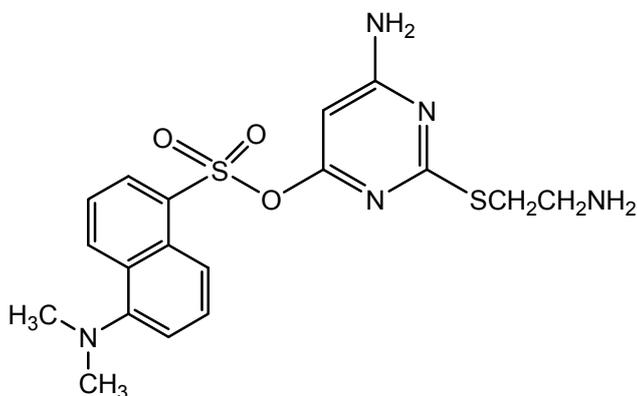
Resa: 87%.

Punto di fusione: 104-106 °C.

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.43 (s, 3H); 2.63 (t, 2H, J = 8 Hz); 2.78 (t, 2H, J = 8 Hz); 3.35 (bs, 2H); 5.82 (s, 1H); 7.31 (bs, 2H); 7.50 (d, 2H, J = 8 Hz); 7.86 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr): 3560, 3450, 3220, 1360, 1183 cm^{-1} .

5-dimetilamino-naftalene-1- acido solfonico 6-amino-2-(2-amino-etilsulfanil)-pirimidin-4-il estere (13l)



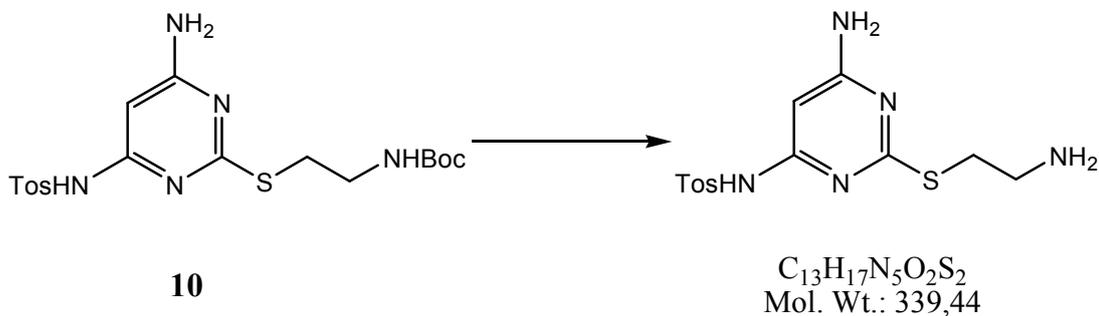
$C_{18}H_{21}N_5O_3S_2$
Mol. Wt.: 419,52

Resa: 86%.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 2.80 (s, 6H); 2.81-2.98 (m, 4H); 5.18 (bs, 2H); 5.69 (s, 1H); 5.85 (bs, 2H); 7.12 (d, 1H, J = 8 Hz); 7.42-7.57 (m, 2H); 8.21 (d, 2H, J = 8 Hz); 8.54 (d, 2H, J = 8 Hz).

IR (KBr): 3564, 3449, 3220, 1365, 1178 cm⁻¹.

N-[6-amino-2-(2-amino-etil)-pirimidin-4-il]-4-metil-benzenesolfonamide (14)



Il composto **10** viene sciolto in CF_3COOH (3 mL) e la soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 45 minuti.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H_2O (5 mL), neutralizzato con una soluzione satura di NaHCO_3 ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 , è stata evaporata ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **14**:

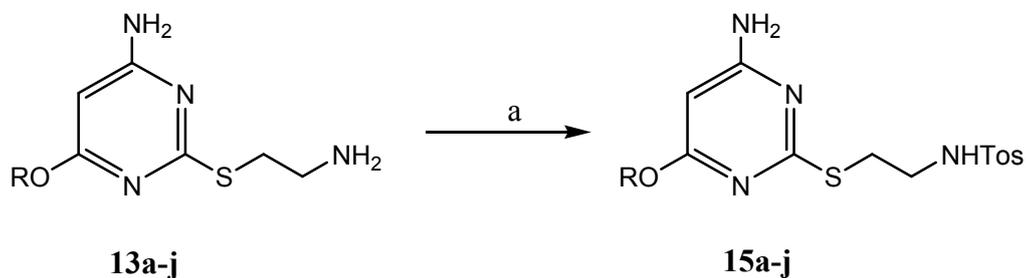
Resa: 42%.

Punto di fusione: 282-284 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.30 (s, 3H); 2.81-2.84 (m, 2H); 2.96-3.03 (m, 2H); 4.98 (bs, 2H); 5.49 (s, 1H); 5.81 (bs, 2H); 7.18 (d, 2H, $J = 8$ Hz); 7.63 (d, 2H, $J = 8$ Hz); 10.97 (bs, 1H).

IR (KBr) : 3455, 3230, 1690 cm^{-1} .

Procedura generale per la sintesi dei composti **15a-j**



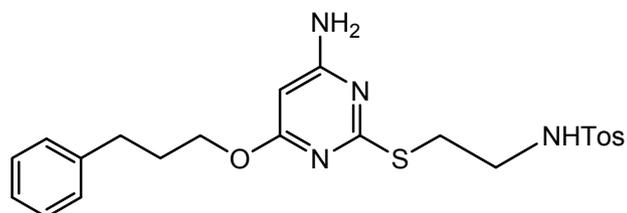
A una soluzione del composto di partenza (**13a-j**) (0.243 mmol) in piridina (2 ml), viene aggiunto Tosil cloruro al 98 % (1.1 eq.).

La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2-3 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H₂O (10 mL) ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:1) ottenendo il composto desiderato (solido o olio).

N-{2-[4-amino-6-(3-fenil-propossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15a)

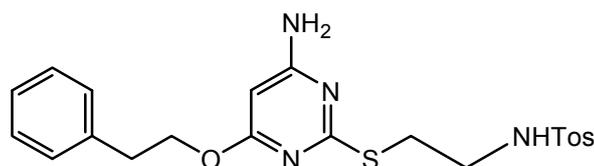


$C_{22}H_{26}N_4O_3S_2^-$
Mol. Wt.: 458,6

Resa: 20%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.00-2.08 (m, 2H); 2.39 (s, 3H); 2.71-2.79 (m, 2H); 3.09-3.31 (m, 4H); 4.21-4.27 (m, 2H); 4.89 (bs, 2H); 5.49 (s, 1H); 7.26 (m, 7H); 7.69-7.72 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz); 8.25 (bs, 1H).

N-[2-(4-amino-6-fenilossi-pirimidin-2-ilsulfanil)-etil]-4-metil-benzen sulfonamide (15b)

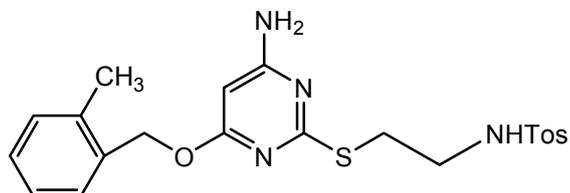


$C_{21}H_{24}N_4O_3S_2^-$
Mol. Wt.: 444,57

Resa: 26%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.37 (s, 3H); 2.97-3.02 (m, 2H); 3.18 (m, 2H); 3.24 (m, 2H); 4.35-4.45 (m, 2H); 4.99 (bs, 2H); 5.48 (s, 1H); 7.07-7.23 (m, 7H); 7.67-7.71 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz); 8.30 (bs, 1H).

N-{2-[4-amino-6-(2-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15c)

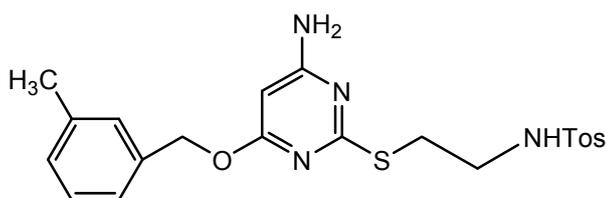


$C_{21}H_{24}N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 444,57

Resa: 31%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.40 (s, 3H); 2.44 (s, 3H); 3.13-3.18 (t, 2H, J = 5.8 Hz); 3.29-3.35 (t, 2H, J = 4.8 Hz); 4.95 (bs, 2H); 5.34 (s, 2H); 5.59 (s, 1H); 6.73 (bs, 1H); 7.30-7.39 (m, 6H); 7.71-7.76 (d, 2H, J = 8.2 Hz).

N-{2-[4-amino-6-(3-metil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15d)

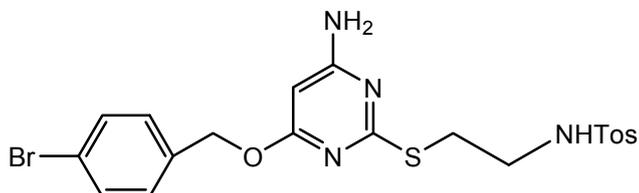


$C_{21}H_{24}N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 444,57

Resa: 34%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.36 (s, 3H); 2.59 (s, 3H); 3.07-3.13 (t, 2H, J = 5.8 Hz); 3.25-3.29 (t, 2H, J = 5.2 Hz); 4.89 (bs, 2H); 5.27 (s, 2H); 5.57 (s, 1H); 6.50 (bs, 1H); 7.11-7.23 (m, 6H); 7.67-7.71 (d, 2H, J = 8.4 Hz).

N-{2-[4-amino-6-(4-bromo-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15e)

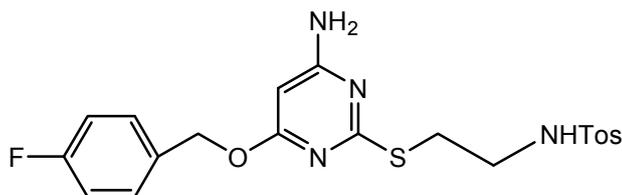


Resa: 38%.

Punto di fusione: 144-149 °C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.39 (s, 3H); 3.07-3.12 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.25-3.31 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 4.94 (bs, 2H); 5.26 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 6.67 (bs, 1H); 7.22-7.27 (m, 4H); 7.45-7.49 (d, 2H, J = 8.4 Hz); 7.66-7.70 (d, 2H, J = 8 Hz).

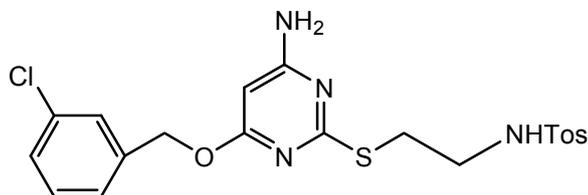
N-{2-[4-amino-6-(4-fluoro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15f)



Resa: 38%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.39 (s, 3H); 3.08-3.13 (t, 2H, J = 5.8 Hz); 3.27-3.35 (t, 2H, J = 5.4 Hz); 4.92 (bs, 2H); 5.27 (s, 2H); 5.53 (s, 1H); 6.71 (bs, 1H); 7.03-7.39 (m, 6H); 7.67-7.71 (d, 2H, J = 8 Hz).

N-{2-[4-amino-6-(3-cloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15g)

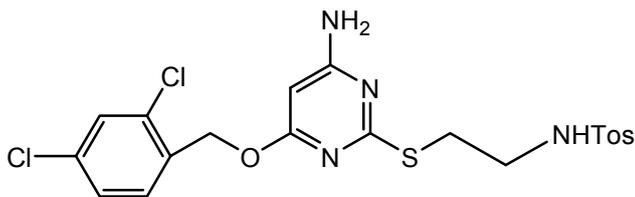


$C_{20}H_{21}ClN_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 464,99

Resa: 15%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.38 (s, 3H); 3.09-3.11 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz); 3.27 (m, 2H); 4.91 (bs, 2H); 5.28 (s, 2H); 5.56 (s, 1H); 6.57 (bs, 1H); 7.24-7.37 (m, 6H); 7.66-7.70 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz).

N-{2-[4-amino-6-(2,4-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15h)



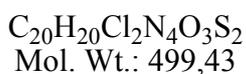
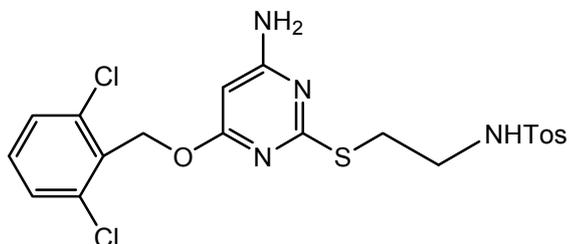
$C_{20}H_{20}Cl_2N_4O_3S_2$
Mol. Wt.: 499,43

Resa: 24%.

Punto di fusione: 165-167° C.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.40 (s, 3H); 3.11-3.13 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz); 3.27-3.31 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); 4.94 (bs, 2H); 5.36 (s, 2H); 5.58 (s, 1H); 6.57 (bs, 1H); 7.24-7.26 (m, 3H); 7.37-7.41 (d, 2H, $J = 8$ Hz); 7.66-7.72 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz).

N-{2-[4-amino-6-(2,6-dicloro-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15i)

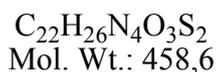
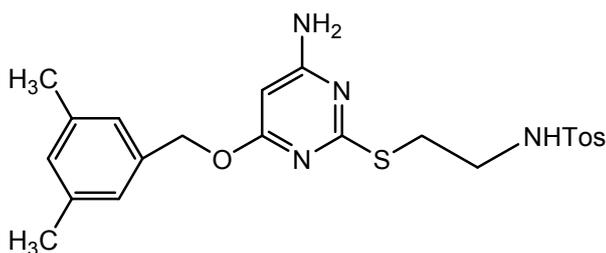


Resa: 54%.

Punto di fusione: 142-150 °C.

1H NMR (CDCl₃) δ : 2.40 (s, 3H); 3.17-3.19 (t, 2H, J = 6 Hz); 3.37 (m, 2H); 4.96 (bs, 2H); 5.43 (s, 2H); 5.54 (s, 1H); 6.65 (bs, 2H); 7.11-7.38 (m, 5H); 7.69-7.73 (d, 2H, J = 8 Hz); 8.25 (bs, 1H).

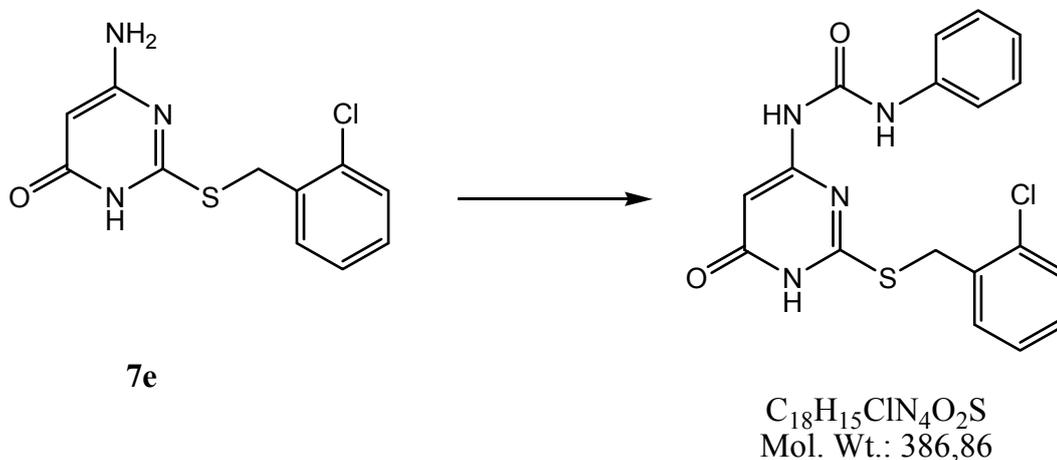
N-{2-[4-amino-6-(3,5-dimetil-benzilossi)-pirimidin-2-ilsulfanil]-etil}-4-metil-benzen sulfonamide (15j)



Resa: 19%.

1H NMR (CDCl₃) δ : 2.31 (s, 6H); 2.39 (s, 3H); 3.10-3.13 (t, 2H, J = 5.8 Hz); 3.27-3.29 (t, 2H, J = 5.6 Hz); 4.88 (bs, 2H); 5.23 (s, 2H); 5.55 (s, 1H); 6.66 (bs, 1H); 6.95-6.97 (d, 2H, J = 6.6 Hz); 7.23-7.26 (m, 3H); 7.67-7.71 (d, 2H, J = 8.2 Hz).

Preparazione di: **1-[2-(2-cloro-benzilsulfanil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-3-fenil-urea (16)**



A una soluzione del composto **7e** (0.05 g, 0.19 mmol) in diossano (10 mL), viene aggiunto fenil isocianato (0.03 mL, 0.26 mmol) e la soluzione viene lasciata a refluxo per 18 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato 100%) ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **16**:

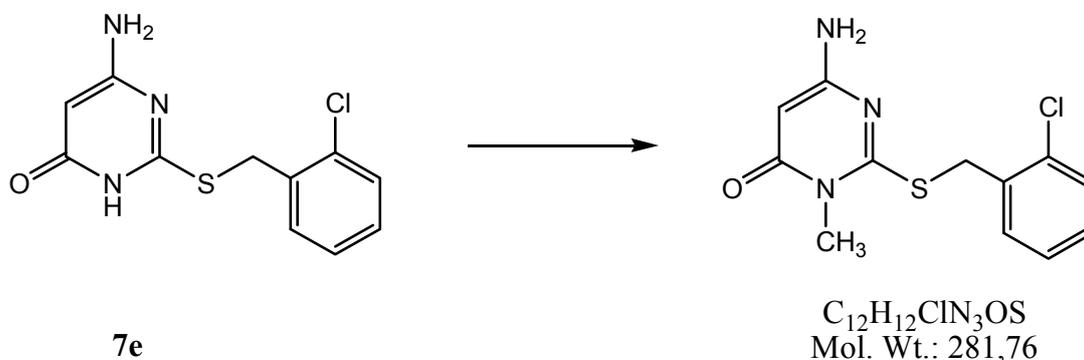
Resa: 43%.

Punto di fusione: > 270 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 4.49 (s, 2H); 5.81 (s, 1H); 6.99 (bs, 1H); 7.06-7.70 (m, 9H); 8.42 (bs, 1H); 9.27 (bs, 1H);.

IR (KBr) : 3425, 3340, 1678, 1558 cm⁻¹.

Preparazione di: **6-amino-2-(2-cloro-benzilsulfanil)-3-metil-3H-pirimidin-4-one**
(17)



A una soluzione del composto **7e** (0.05 g, 0.19 mmol) e K₂CO₃ (0.025 g, 0.19 mmol) in DMF anidro (3 mL), viene aggiunto CH₃I (0.034 mL, 0.55 mmol).

La soluzione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H₂O (10 mL), neutralizzato con una soluzione di HCl 1M ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **17**:

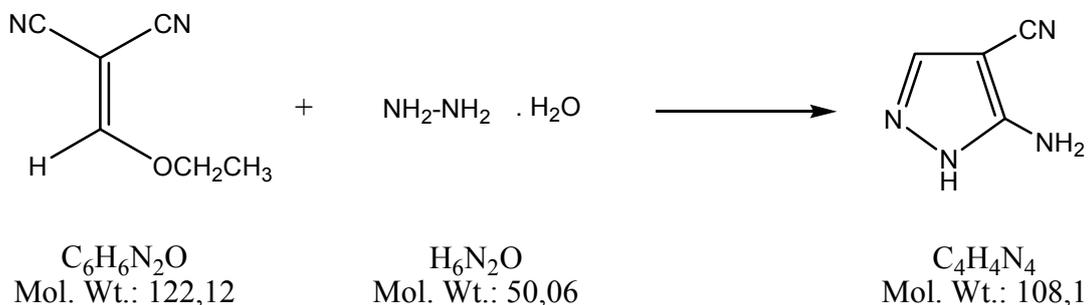
Resa: 87%.

Punto di fusione: > 270 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 3.21 (s, 3H); 4.50 (s, 2H); 4.93 (s, 1H); 6.57 (bs, 2H); 7.30-7.34 (m, 2H); 7.46-7.51 (m, 1H); 7.74-7.78 (m, 1H).

IR (KBr) : 3440, 3220, 1685 cm⁻¹.

Preparazione di: **5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile (20)**

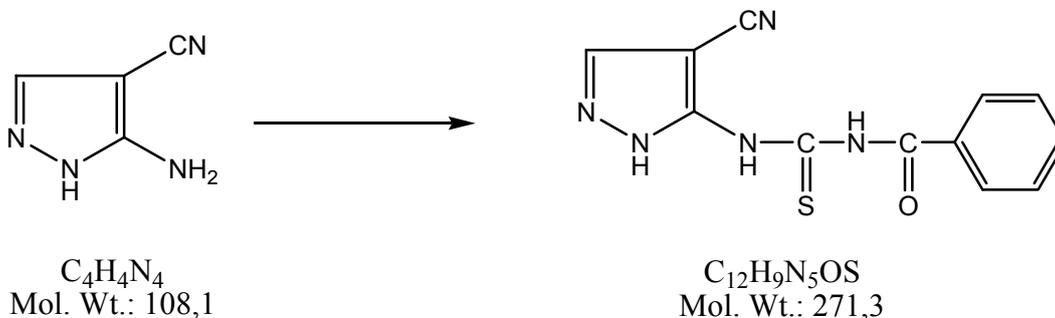


A una soluzione di etossietilen malononitrile (100 g, 0.8188 mmol) in 500 ml di etanolo vengono aggiunti goccia a goccia a 0°C , 1.1 eq di idrazina (43.75 ml).

Quando la miscela di reazione è stabile si pone in condizioni di riflusso a 80-90° C overnight. Successivamente si evapora il solvente, si riprende con una miscela AcOEt/EtPt e si pone in freezer per un paio di ore. Quindi si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Resa: 90 %.

Preparazione di: **5-[[benzoylamino]carbonioil]amino}-1H-pirazol-4-carbonitrile (21)**



A una soluzione del composto **20** (1 g, 9.2593 mmol) in 20 ml di diossano vengono aggiunti goccia a goccia 1.21 ml di benzoyl isotiocianato (1.1 eq).

La miscela è posta in bomba in condizioni di riflusso a 120° C per 2 ore.

Quindi si evapora il solvente ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **21**:

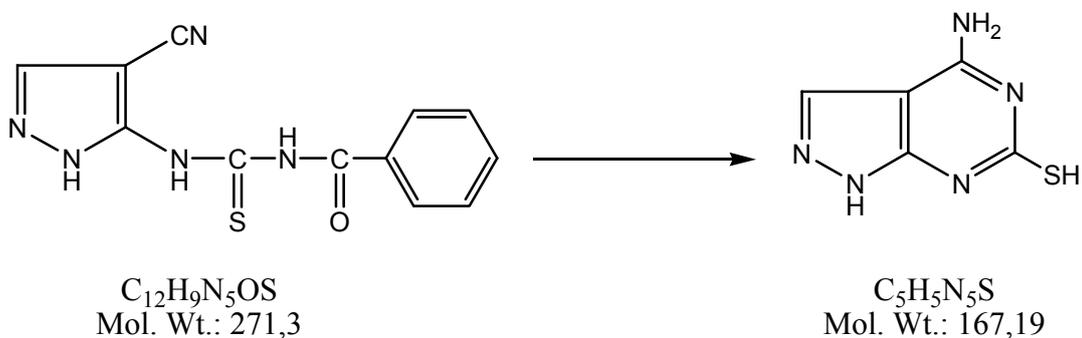
Resa: 87 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 272.4$.

IR (KBr): 3196, 2912, 2228, 1597, 1525, 1250 cm^{-1} .

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 7.55-7.61 (m, 4H); 7.98-8.04 (m, 2H); 11.99 (bs, 1H); 12.23 (bs, 1H), 13.68 (bs, 1H).

Preparazione di: **4-amino-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-6-tiolo (22)**



300 mg del composto **21** (1.106 mmol) sono sciolti in 6 ml di NaOH 10%.

La miscela è posta in condizioni di riflusso a 120 °C per 1 ora e controllata mediante TLC con eluente AcOEt/MeOH 8:2.

Successivamente si aggiunge H₂O, si acidifica a 0°C con HCl al 37% p/p fino a pH fortemente acido; quindi si pone in frigo per 12 ore e successivamente si filtra su Gooch.

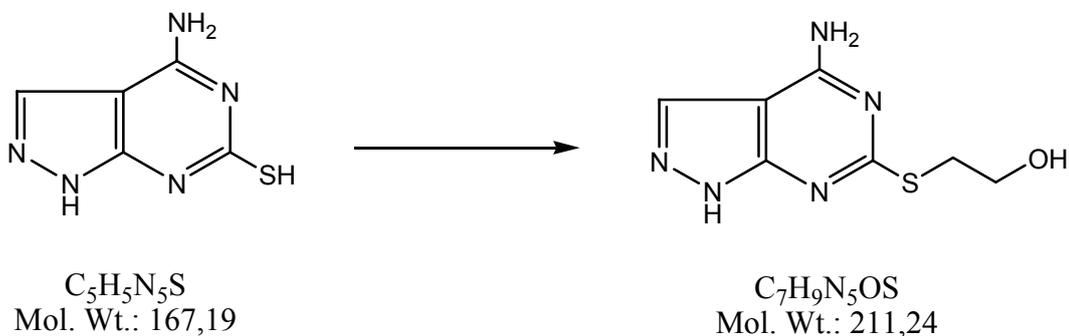
Si cristallizza con Acetato di Etile per 15 minuti con bagno d'olio a 120 °C; si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **22**:

Resa: 75 %.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8.80 (s, 1H); 9.00 (bs, 1H); 10.86 (bs, 1H), 14.20 (bs, 2H).

Preparazione di: **2-(4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (23)**



A una soluzione del composto **22** (600 mg, 3.588 mmol) in 35 ml di NaOH 0.1 M in MeOH vengono aggiunti 0.637 ml di bromo etanolo al 97% (2.5 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight.

Quindi si evapora il solvente e si pone il residuo in frigo per 2 giorni.

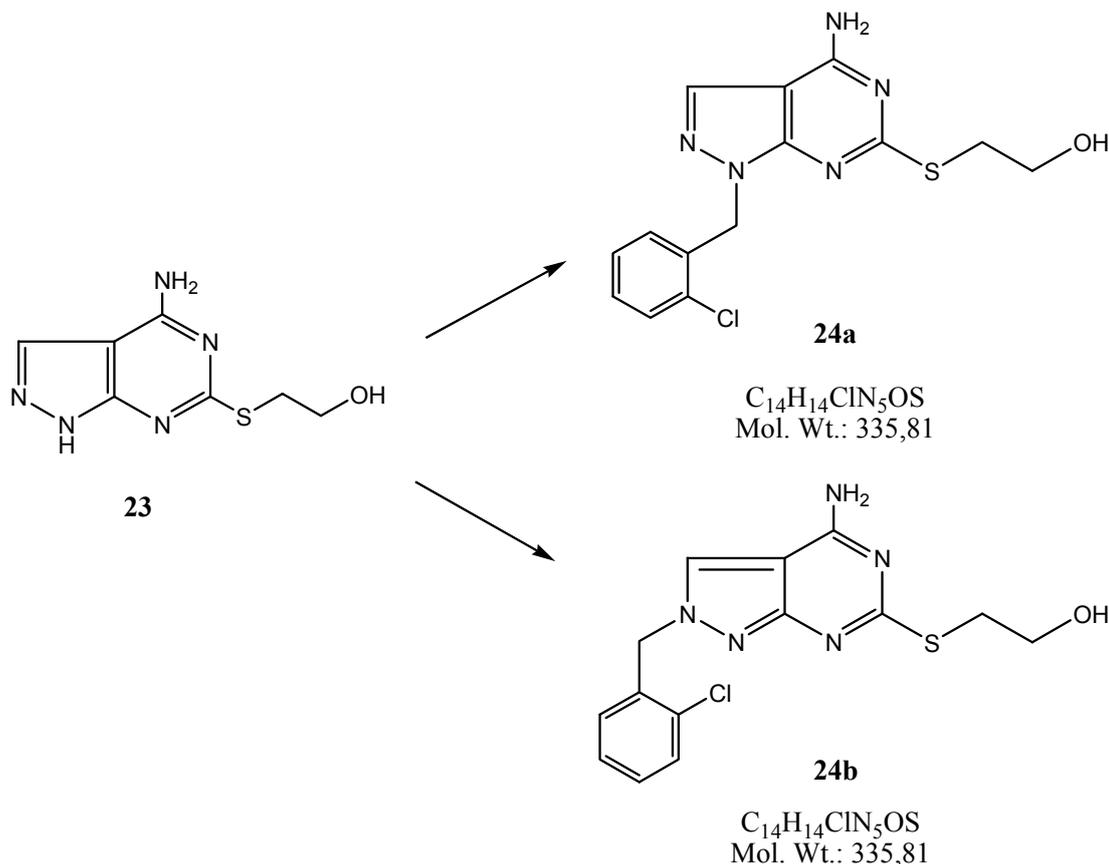
Si procede aggiungendo H₂O e filtrando su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **23**:

Resa: 67 %.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 3.20-3.36 (m, 2H); 3.40-3.62 (m, 2H); 4.95 (bs, 1H); 7.55-7.94 (bs, 2H); 8.04 (s, 1H); 13.21 (bs, 1H).

Preparazione di: **2-(1-(2-clorobenzil)-4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (24a)** e **2-(2-(2-clorobenzil)-4-amino-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (24b)**



A una soluzione del composto **23** (450 mg, 2.13 mmol) in DMF anidra (6.39 ml), vengono aggiunti K_2CO_3 anidro (3 eq, 883.16 mg) e goccia a goccia 2-clorobenzil cloruro (1 eq, 0.27 ml).

La soluzione viene lasciata in agitazione a 80-85°C per 2 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash in gradiente (Etile Acetato/Etere di Petrolio 4:1, Etile Acetato) ottenendo i composti desiderati **24a** e **24b** (solidi).

La tecnica NOE ha permesso l'attribuzione della corretta isomeria.

Resa: 17%.

Caratteristiche del composto **24a**:

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 335.8$.

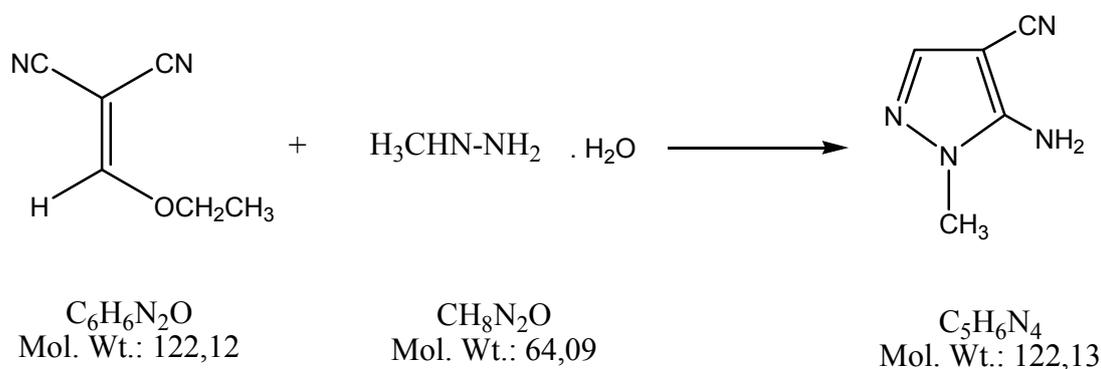
$^1\text{H NMR (DMSO-}d_6)$ δ : 3.15-3.19 (t, 2H, $J = 3.4$ Hz); 3.59-3.63 (m, 2H); 4.87-4.89 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz); 5.52 (s, 2H); 7.03-7.49 (m, 1H), 7.28-7.33 (m, 2H); 7.45-7.49 (m, 1H); 7.65-7.84 (bs, 2H); 8.03 (s, 1H).

Caratteristiche del composto **24b**:

MS (ESI): $[\text{MH}]^+ = 335.8$.

$^1\text{H NMR (DMSO-}d_6)$ δ : 3.09-3.13 (m, 2H); 3.59-3.61 (m, 2H); 4.94 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz); 5.59 (s, 2H); 7.26-7.28 (m, 1H), 7.37-7.41 (m, 2H); 7.52-7.53 (m, 1H); 7.61-7.79 (bs, 2H); 8.29 (s, 1H).

Preparazione di: **5-amino-1-metil-1H-pirazol-4-carbonitrile (26)**

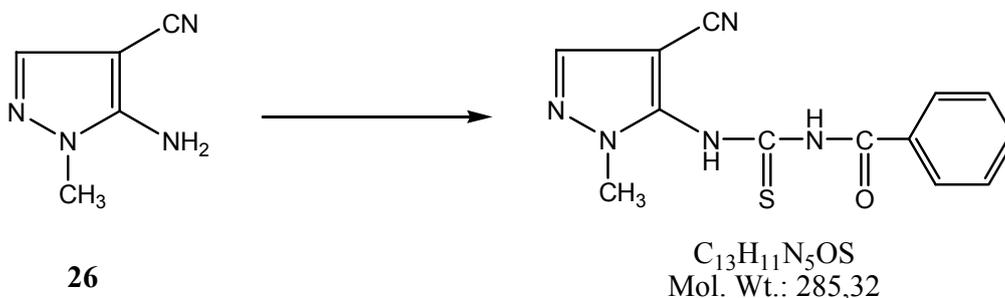


A una soluzione di etossietilen malononitrile (100 g, 0.8188 mmol) in 500 ml di etanolo vengono aggiunti goccia a goccia a 0°C , 1.1 eq di metil idrazina.

Quando la miscela di reazione è stabile si pone in condizioni di riflusso a 80-90° C overnight. Successivamente si evapora il solvente, si riprende con una miscela AcOEt/EtPt e si pone in freezer per un paio di ore. Quindi si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Resa: 90 %.

Preparazione di: **5-[(benzoylamino)-carbonioil]amino-1-metil-1H-pirazol-4-carbonitrile (27)**



A una soluzione del composto **26** (1 g, 8.1967 mmol) in 20 ml di diossano vengono aggiunti goccia a goccia 1.21 ml di benzoyl isotiocianato (1.1 eq).

La miscela è posta in bomba in condizioni di riflusso a 120° C per 2 ore e controllata mediante TLC con eluente AcOEt/EtPt 1:1.

Quindi si evapora il solvente ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **27**:

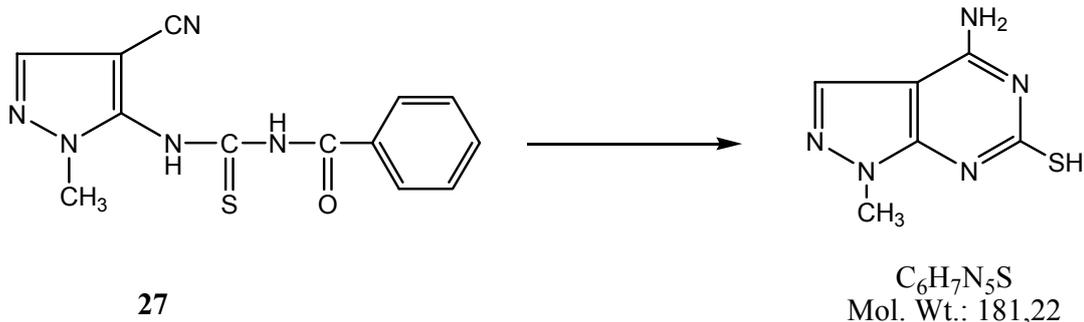
Resa: 87 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 286.4$.

IR (KBr): 2057, 1658, 1603, 1513, 1267 cm^{-1} .

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 4.00 (s, 3H); 7.56-7.76 (m, 3H); 8.05-8.09 (m, 2H); 8.47 (s, 1H); 11.64 (bs, 2H).

Preparazione di: **4-amino-1-metil-1-H-pirazol [3,4-*d*]pirimidin-6-tiolo (28)**



100 mg del composto **27** (0.35047 mmol) sono sciolti in 2 ml di NaOH 10%.

La miscela è posta in condizioni di riflusso a 120° C per 1 ora e controllata mediante TLC con eluente AcOEt/MeOH 8:2.

Successivamente si aggiunge H₂O, si acidifica a 0°C con HCl al 37% p/p fino a pH fortemente acido; quindi si pone in frigo per 12 ore e successivamente si filtra su Gooch.

Si cristallizza con Acetato di Etile per 15 minuti con bagno d'olio a 120°C; si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **28**:

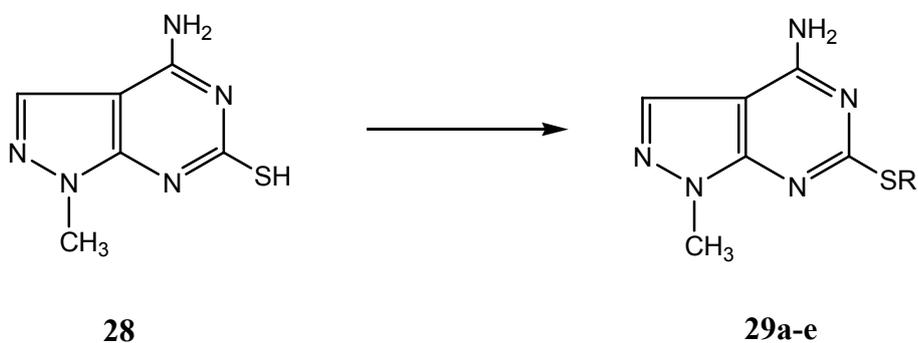
Resa: 63 %.

MS (ESI): [MH]⁺ = 182.3.

IR (KBr): 3166, 2731, 1668, 1606, 1154, cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3.86 (s, 3H); 8.31 (s, 1H); 8.68 (bs, 1H); 10.39 (bs, 1H); 12.19 (bs, 1H).

Procedura generale per la sintesi dei composti **29a-e**



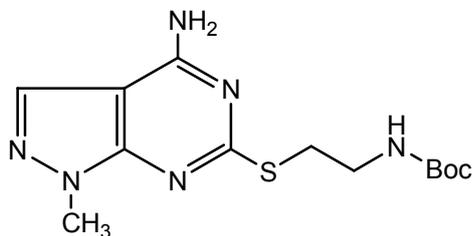
A una soluzione del composto **28** (250 mg, 1.3795 mmol) in piridina o in NaOH 0.1 M in MeOH (14 ml) viene aggiunto l'opportuno alchilante (2.5 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight.

Quindi si evapora il solvente e si pone il residuo in frigo per 2 giorni.

Si procede aggiungendo H₂O e filtrando su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

tert-butil 2-(4-amino-1-metil-1H-pirazol [3,4-d]pirimidin-6-iltio)etil carbammato (29a)



$C_{13}H_{20}N_6O_2S$
Mol. Wt.: 324,4

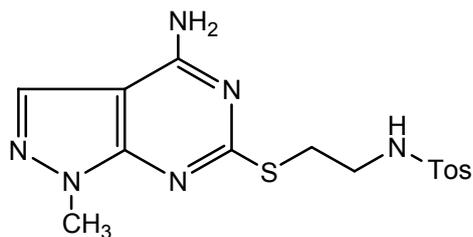
Resa: 18 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 324.9$.

IR (KBr): 3166, 2731, 1668, 1606, 1154 cm^{-1} .

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 1.37 (s, 9H); 3.13 (m, 4H); 3.84 (s, 3H); 7.12 (bs, 1H); 7.68 (bs, 2H); 7.96 (s, 1H).

6-(2-(tosil-amino)etil-tio)-1-metil-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-amina (29b)



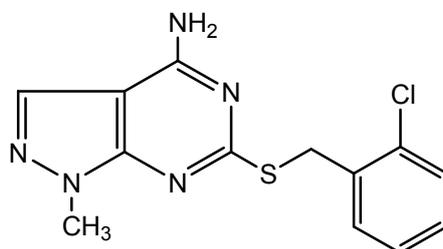
$C_{15}H_{18}N_6O_2S_2$
Mol. Wt.: 378,47

Resa: 63 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 379.3$.

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.30 (s, 3H); 2.68-2.75 (m, 2H); 2.80 (bs, 1H); 2.96 (s, 1H); 3.15-3.19 (m, 5H); 7.10-7.14 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz); 7.47-7.51 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz).

6-(2-clorobenziltio)-1-metil-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-amina (29c)



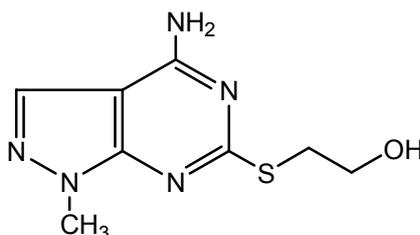
$C_{13}H_{12}ClN_5S$
Mol. Wt.: 305,79

Resa: 11 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 305.9$.

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.87 (s, 3H); 4.49 (s, 2H); 7.26-7.72 (m, 4H); 7.80 (bs, 2H); 7.97 (s, 1H).

2-(4-amino-1-metil-1-H-pirazol [3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (29d)



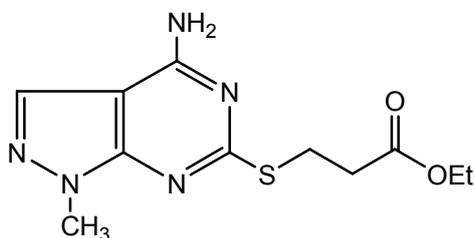
$C_8H_{11}N_5OS$
Mol. Wt.: 225,27

Resa: 14 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 226.2$.

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.17 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz); 3.66 (m, 2H); 3.82 (s, 3H); 4.92 (bs, 1H); 7.67 (bs, 2H); 7.95 (s, 1H).

etil 3-(4-amino-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)propanoato (29e)



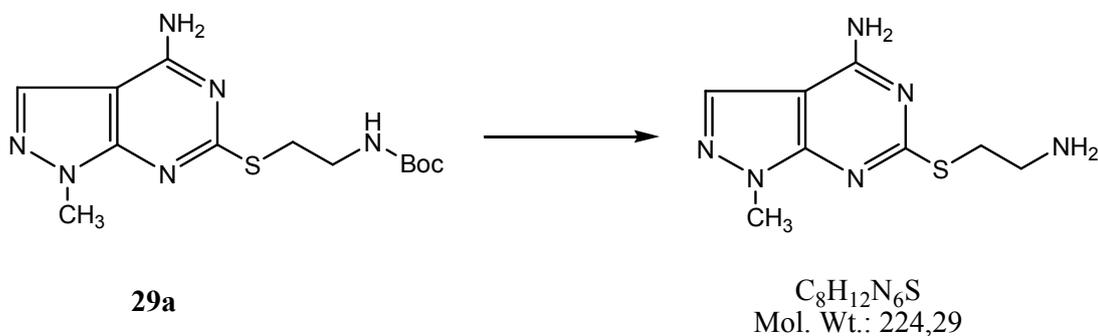
C₁₁H₁₅N₅O₂S
Mol. Wt.: 281,33

Resa: 11 %.

MS (ESI): [MH]⁺ = 282.0.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.22-1.24 (m, 3H); 2.85-2.89 (m, 2H); 3.39-3.46 (m, 2H); 3.96 (s, 3H); 4.15-4.19 (m, 2H); 5.69 (bs, 2H); 7.81 (s, 1H).

Preparazione di: **6-(2-aminoetiltilio)-1-metil-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-ammina (29f)**



Si scioglie il composto **29a** (50 mg, 0.1542 mmol) in 0.3 ml di TFA e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti.

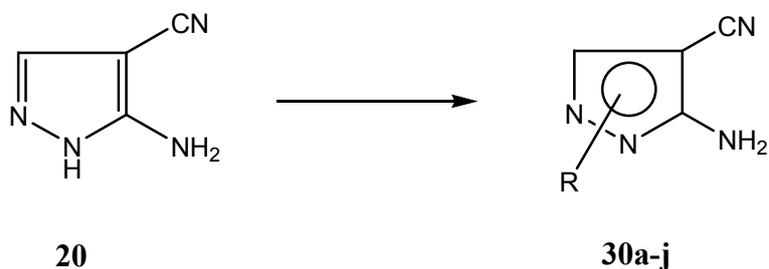
Quindi si evapora il solvente e si aggiunge al residuo una soluzione, preparata istantaneamente, HCl 37% p/p in etere etilico. Si evapora il solvente ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **29f**:

MS (ESI): $[MH]^+ = 224.8$.

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.17 (m, 2H); 3.34-3.38 (m, 2H); 3.88 (s, 1H); 8.09 (s, 1H); 8.30 (bs, 4H).

Procedura generale per la sintesi dei composti **30a-j**



A una soluzione del composto **20** (3 g, 27.78 mmol) in DMF anidra (10 ml), vengono aggiunti K_2CO_3 anidro (1 eq, 3.84 g) e goccia a goccia l'opportuno alchilante(1.1eq).

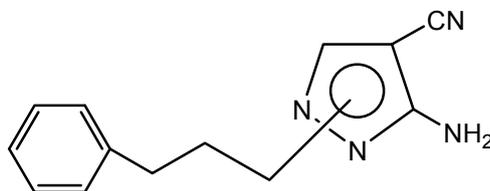
La soluzione viene lasciata in agitazione a 80-85°C per 4 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H_2O (10 mL) ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na_2SO_4 , è stata evaporata e il residuo viene purificato con cromatografia flash in gradiente (Etile Acetato/Etere di Petrolio 3:7, 4:6, 8:2) ottenendo il composto desiderato (solido), miscela dei due isomeri.

5-amino-1-(3-fenetilpropil)-1H-pirazol-4-carbonitrile;
fenetilpropil)-1H-pirazol-4-carbonitrile (30a)

3-amino-1-(3-



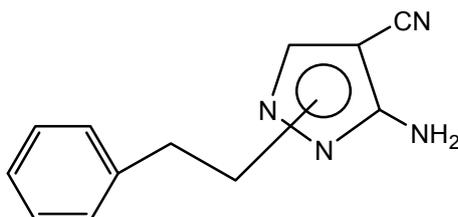
$C_{13}H_{14}N_4$
Mol. Wt.: 226,28

Resa: 16%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.13-2.20 (m, 2H); 2.57-2.69 (m, 2H); 3.87-3.94 (m, 2H); 4.03 (bs, 2H); 7.14-7.31 (m, 5H); 7.44 (s, 1H).

5-amino-1-fenetil-1H-pirazol-4-carbonitrile;
carbonitrile (30b)

3-amino-1-fenetil-1H-pirazol-4-

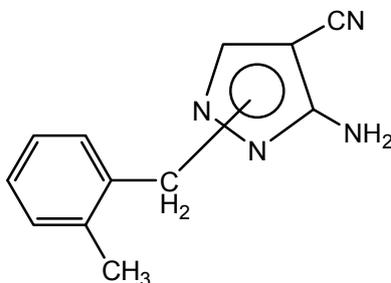


$C_{12}H_{12}N_4$
Mol. Wt.: 212,25

Resa: 26%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 3.05-3.12 (m, 2H); 3.41 (bs, 2H); 4.09-4.16 (t, 2H, $J = 7$ Hz); 7.03-7.29 (m, 5H); 7.53 (s, 1H).

1-(3-metilbenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(3-metilbenzil)- 3-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile (30c)

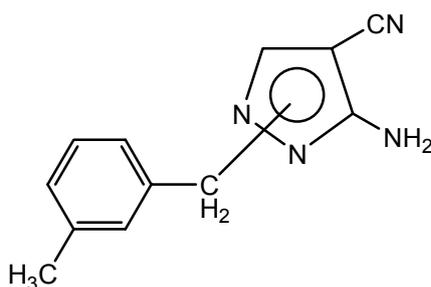


$C_{12}H_{12}N_4$
Mol. Wt.: 212,25

Resa: 11%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 2.21-2.36 (m, 5H); 4.44 (bs, 2H); 7.14-7.28 (m, 4H); 7.51 (s, 1H).

1-(3-metilbenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile;1-(3-metilbenzil)- 3-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile (30d)

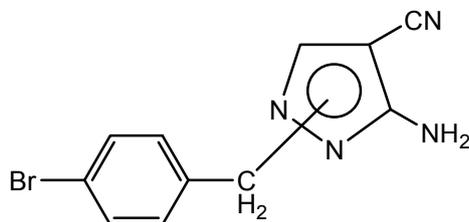


$C_{12}H_{12}N_4$
Mol. Wt.: 212,25

Resa: 15%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 1.44 (s, 3H); 2.35 (s, 3H); 3.60 (bs, 2H); 4.11 (bs, 2H); 5.03 (s, 2H); 5.14 (s, 2H); 6.99-7.31 (m, 4H); 7.36 (s, 1H); 7.45 (s, 1H).

1-(4-bromobenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(4-bromobenzil)- 3-amino 1H-pirazol-4-carbonitrile (30e)

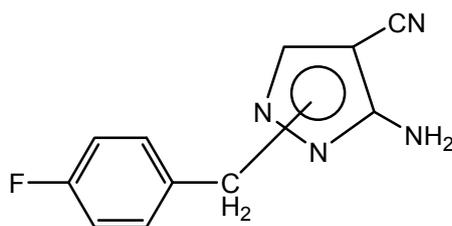


$C_{11}H_9BrN_4$
Mol. Wt.: 277,12

Resa: 20%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4.17 (bs, 2H); 4.42 (bs, 2H); 5.03-5.12 (s, s, 2H); 7.05-7.52 (m, 4H); 7.65 (s, 1H).

1-(4-fluorobenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(4-fluorobenzil)- 3-amino 1H-pirazol-4-carbonitrile (30f)

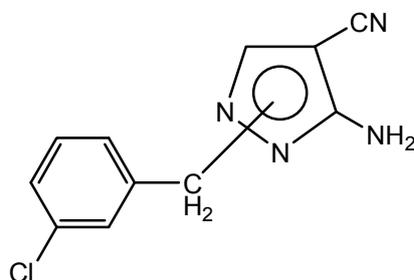


$C_{11}H_9FN_4$
Mol. Wt.: 216,21

Resa: 24%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4.14 (bs, 2H); 4.46 (bs, 2H); 5.05-5.14 (s, s, 2H); 7.04-7.47 (m, 4H); 7.67 (s, 1H).

1-(3-clorobenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(3-clorobenzil)- 3-amino 1H-pirazol-4-carbonitrile (30g)

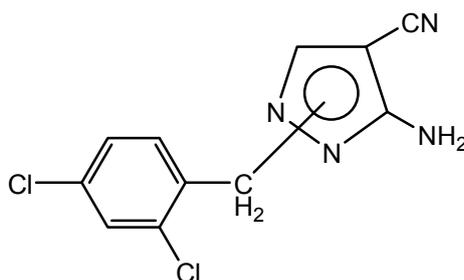


$C_{11}H_9ClN_4$
Mol. Wt.: 232,67

Resa: 35%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4.17 (bs, 2H); 4.46 (bs, 2H); 5.05-5.14 (s, s, 2H); 7.09-7.56 (m, 4H); 7.64 (s, 1H).

1-(2,4-diclorobenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(2,4-diclorobenzil)- 3-amino 1H-pirazol-4-carbonitrile (30h)



$C_{11}H_8Cl_2N_4$
Mol. Wt.: 267,11

Resa: 58%.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.13 (bs, 2H); 5.16 (s, 2H); 7.09-7.28 (m, 3H); 7.44 (s, 1H).
7.57 (s, 1H).

Si è proseguito separando i due isomeri con cromatografia flash in gradiente (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:6, 1:4, 1:1) ottenendo i composti desiderati **34a** e **34b**, prevalente rispetto al **34a** (solidi).

Resa: 65%.

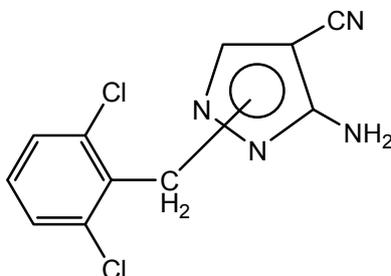
Caratteristiche del composto **34a**:

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.33 (bs, 2H); 5.19 (s, 2H); 6.99 (s, 1H); 7.23-7.28 (m, 1H);
7.44-7.45 (m, 1H); 7.55 (s, 1H).

Caratteristiche del composto **34b**:

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 5.19 (s, 2H); 5.64 (bs, 2H); 7.16 (s, 1H); 7.42-7.48 (m, 1H);
7.65-7.66 (m, 1H); 8.24 (s, 1H).

**1-(2,6-diclorobenzil)- 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrile; 1-(2,6-diclorobenzil)-
3-amino 1H-pirazol-4-carbonitrile (30i)**

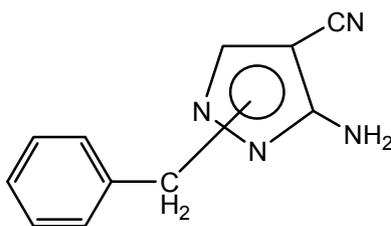


$C_{11}H_8Cl_2N_4$
Mol. Wt.: 267,11

Resa: 36%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4.21 (bs, 2H); 4.74 (bs, 2H); 5.32-5.45 (m, 4H); 7.22-7.43 (m, 3H); 7.67 (s, 1H).

**5-amino-1-benzil-1H-pirazol-4-carbonitrile; 3-amino-1-benzil-1H-pirazol-4-
carbonitrile (30j)**

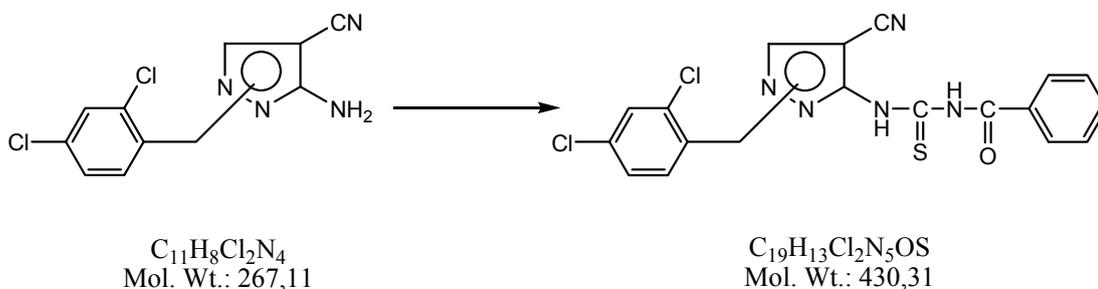


$C_{11}H_{10}N_4$
Mol. Wt.: 198,22

Resa: 25%.

1H NMR ($CDCl_3$) δ : 4.38 (bs, 2H); 4.98 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 7.10-7.37 (m, 5H); 7.45 (s, 1H); 7.17 (s, 1H).

Preparazione di: **1-(2,4-diclorobenzil)- 5-[[(benzoilamino)-carbonioil]amino]-1H-pirazol-4-carbonitrile;** **1-(2,4-diclorobenzil)- 3-[[(benzoilamino)-carbonioil]amino]-1H-pirazol-4-carbonitrile (31)**



A una soluzione del composto **30h** (100 mg, 0.3744 mmol) in 0.91 ml di diossano vengono aggiunti goccia a goccia 55.4 μ l di benzoil isotiocianato (1.1 eq).

La miscela è posta in bomba in condizioni di riflusso a 120° C per 4 ore.

Quindi si evapora il solvente ottenendo il composto desiderato (solido).

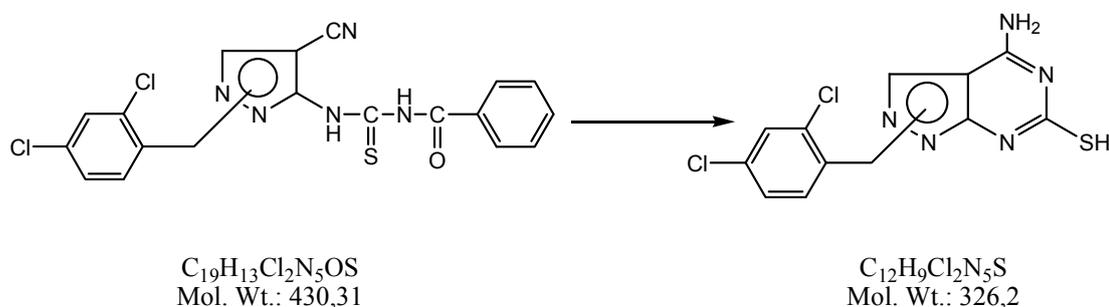
Caratteristiche del composto **31**:

Resa: 87 %.

MS (ESI): $[MH]^+ = 430.0$.

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 5.48 (s, 2H); 7.67 (m, 4H); 8.05 (m, 4H); 8.71 (s, 1H); 11.99 (bs, 1H); 12.18 (bs, 1H).

Preparazione di: **1-(2,4-diclorobenzil)-4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-tiolo**; **2-(2,4-diclorobenzil)-4-amino-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-tiolo (32)**



200 mg del composto **31** (0.4648 mmol) sono sciolti in 2.5 ml di NaOH 10%.

La miscela è posta in condizioni di riflusso a 120° C per 2 ore.

Successivamente si aggiunge H₂O, si acidifica a 0°C con HCl al 37% p/p fino a pH fortemente acido; quindi si pone in frigo per 12 ore e successivamente si filtra su Gooch.

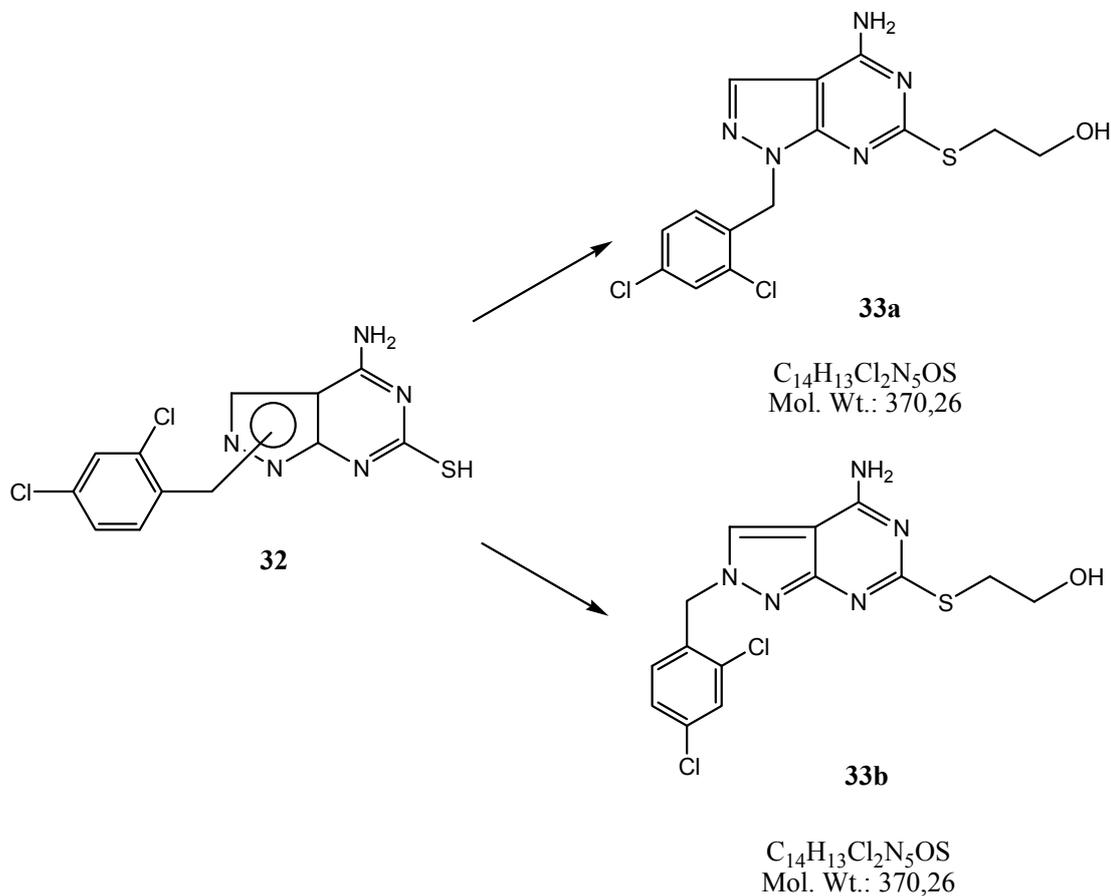
Si cristallizza con Acetato di Etile per 15 minuti con bagno d'olio a 120°C; si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **32**:

Resa: 53 %.

MS (ESI): [MH]⁺ = 327.7.

Preparazione di: **2-(1-(2,4-diclorobenzil)-4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (33a)**; **2-(2-(2,4-diclorobenzil)-4-amino-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-iltio)etanolo (33b)**



A una soluzione del composto **32** (76 mg, 0.2329 mmol) in 2.27 ml di NaOH 0.1 M in MeOH vengono aggiunti 43 μ l di bromo etanolo al 97% (2.5 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight.

Quindi si evapora il solvente e si pone il residuo in frigo per 2 giorni.

Si procede aggiungendo H₂O e filtrando su Gooch e il residuo viene purificato con cromatografia flash in gradiente (Etile Acetato/Etere di Petrolio 2:1, 4:1, Etile Acetato) ottenendo i composti desiderati **33a** (olio) e **33b** (solido).

Resa: 15%.

Caratteristiche del composto **33a**:

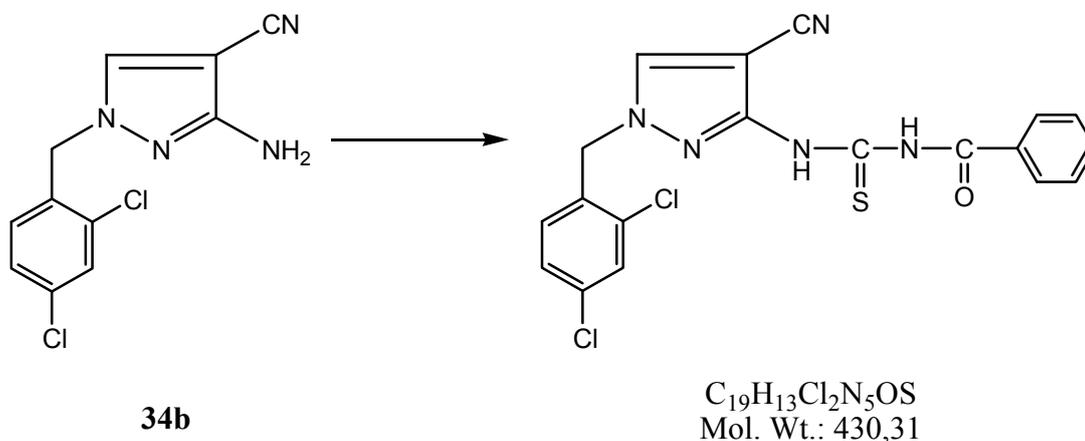
MS (ESI): $[MH]^+ = 371.8$.

1H NMR (CDCl₃) δ : 3.35-3.38 (t, 2H, J = 2.8 Hz); 3.95-3.98 (t, 2H, J = 2.8 Hz); 5.574 (s, 3H, CH₂+OH); 5.87 (bs, 2H); 6.96-6.98 (m, 1H), 7.16 (m, 1H); 7.42 (s, 1H); 7.87 (s, 1H).

Caratteristiche del composto **33b**:

1H NMR (CDCl₃) δ : 3.35-3.38 (t, 2H, J = 3 Hz); 3.99-4.03 (t, 2H, J = 2.8 Hz); 4.43 (m, 2H); 5.87 (bs, 2H); 6.71 (bs, 1H); 7.24 (s, 1H), 7.68 (s, 1H); 7.70 (s, H); 7.77 (s, 1H).

Preparazione di: **1-(2,4-diclorobenzil)- 3-[[benzoinamino]-carbonotioil]amino}-1H-pirazol-4-carbonitrile (35)**



A una soluzione del composto **34b** (80 mg, 0.2995 mmol) in 0.65 ml di diossano vengono aggiunti goccia a goccia 44 μ l di benzoin isotiocianato (1.1 eq).

La miscela è posta in bomba in condizioni di riflusso a 120° C per 4 ore.

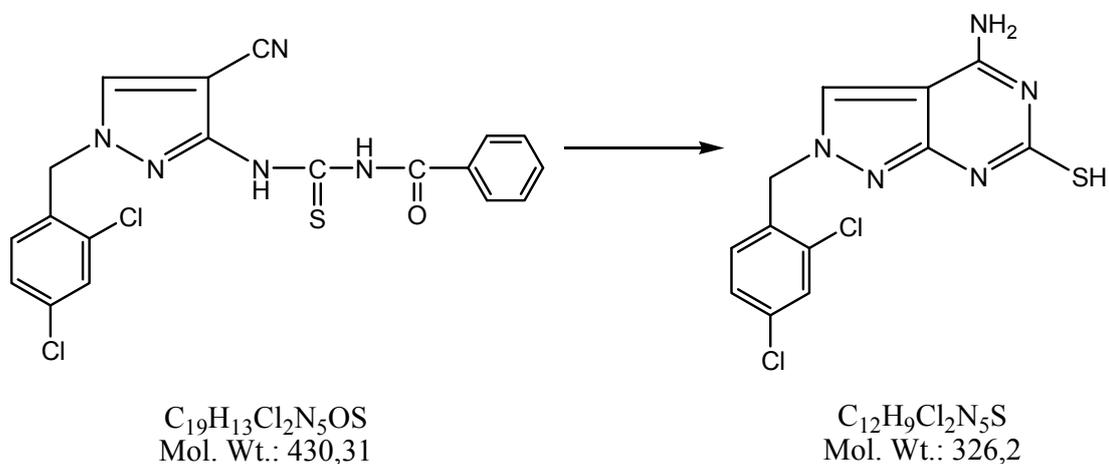
Quindi si evapora il solvente e il residuo viene purificato con cromatografia flash in gradiente (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:6, 1:4, 1:1) ottenendo il composto desiderato **35** (solido).

Caratteristiche del composto **35**:

Resa: 35 %.

1H -NMR (CDCl₃) δ : 5.38 (s, 2H); 7.29-7.47 (m, 2H); 7.48-7.68 (m, 4H); 7.87-7.91 (m, 3H); 9.21 (bs, 1H); 12.33 (bs, 1H).

Preparazione di: **2-(2,4-diclorobenzil)-4-amino-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-tiolo (36)**



300 mg del composto **35** (40 mg, 0.09 mmol) sono sciolti in 1.5 ml di NaOH 10%.

La miscela è posta in condizioni di riflusso a 120° C per 2 ore.

Successivamente si aggiunge H₂O, si acidifica a 0°C con HCl al 37% p/p fino a pH fortemente acido; quindi si pone in frigo per 12 ore e successivamente si filtra su Gooch.

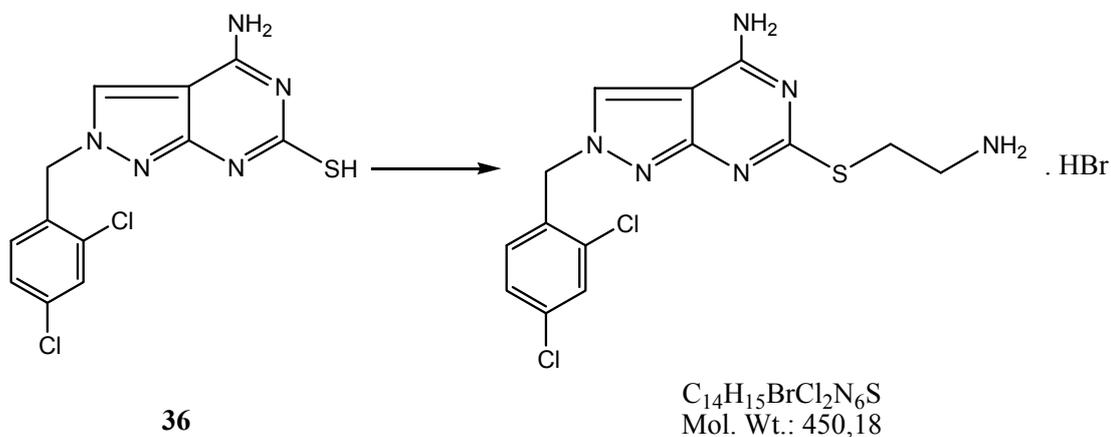
Si cristallizza con Acetato di Etile per 15 minuti con bagno d'olio a 120°C; si filtra su Gooch ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **36**:

Resa: 75 %.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 5.611 (s, 2H); 7.37-7.46 (m, 1H); 7.47 (m, 1H); 7.72-7.73 (m, 1H); 8.99 (s, 1H); 9.45 (bs, 1H); 11.120 (bs, 1H), 13.620 (bs, 1H).

Preparazione di: **2-(2,4-diclorobenzil)-6-(2-aminoetiltio)-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina idrobromuro (37)**



A una soluzione del composto **36** (100 mg, 0.3 mmol) in 2 ml di piridina vengono aggiunti 67 mg di bromo etil ammina (1.2 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a 80°C per 3 ore.

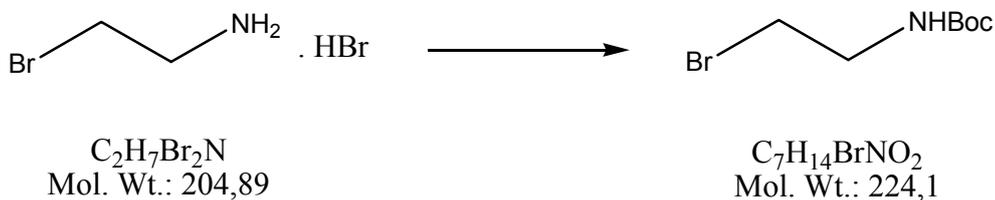
Quindi si elimina il solvente, si riprende con H₂O e ci si porta a pH 8 con NaHCO₃. poi si estrae con Etile acetato.

Caratteristiche del composto **37**:

MS (ESI): [MH]⁺ = 369.1.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 2.58-2.62 (q, 2H, J = 7 Hz); 3.35-3.38 (m, 2H); 3.45 (bs, 2H); 5.44 (s, 2H); 6.36-7.16 (m, 1H); 7.20 (bs, 2H); 7.43-7.47 (m, 1H); 7.68 (m, 1H); 8.08 (s, 1H).

Preparazione di: *tert*-butil 2-bromoetilcarbammato (**38**)



A una soluzione di bromo etil ammina (5 g, 24.4 mmol) in 40 ml di diossano vengono aggiunti 3.5 ml di TEA (1 eq) e 5.86 g di di-*tert*-butildicarbonato (1.1 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight.

Quindi si filtra su Gooch; si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H₂O ed estratto con cloruro di metilene, riestratto in seguito con HCl 2.5% e brine.

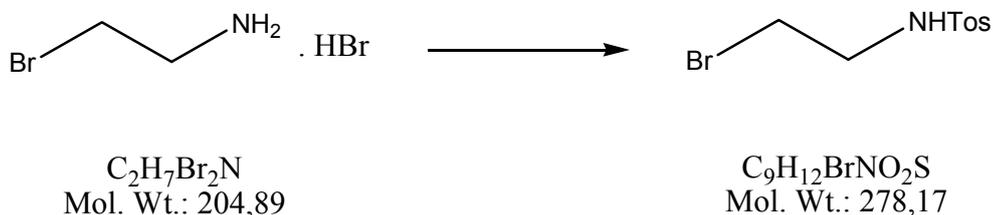
La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata ottenendo il composto desiderato (olio).

Caratteristiche del composto **38**:

Resa: 69%.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.45 (s, 9H); 3.45-3.47 (m, 4H); 4.970 (bs, 2H).

Preparazione di: 2-bromo-N-tosiletanamina (**39**)



A una soluzione di bromo etil ammina (2 g, 9.8 mmol) in 20 ml di DMF vengono aggiunti 2.73 ml di TEA (2 eq) e 1.861 g di Tosil cloruro (1 eq).

La miscela viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore.

Quindi si evapora il solvente e il residuo viene ripreso con H₂O (10 mL) ed estratto con Etile Acetato (10 mL x 3).

La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄, è stata evaporata e il residuo viene purificato con cromatografia flash (Etile Acetato/Etere di Petrolio 1:3) ottenendo il composto desiderato (solido).

Caratteristiche del composto **39**:

Resa: 13%.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.44 (s, 3H); 3.31-3.39 (m, 2H); 3.52-3.55 (m, 2H); 4.97 (bs, 2H); 7.30-7.44 (d, 2H, J = 8.2 Hz); 7.74-7.78 (d, 2H, J = 8.4 Hz).

BIBLIOGRAFIA

1. Xiang, Y.-Z.; Xia, Y.; Gao, X.-M.; Shang, H.-C.; Kang, L.-Y.; Zhang, B.-L. *Drugs* **2008**, 68 (12) 1647.
2. Kulbertus, H. *Rev. Med. Liege* **2004**, 59 (12) 695.
3. Packham, M., A.; Mustard, F. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, 31 (2) 129.
4. Von Kügelgen, I.; *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, 110, 415.
5. Hollopeter, G.; Jantzen, H.-M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnam, V.; Yang, R.-B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D.; Conley, P. B. *Nature* **2001**, 409, 202.
6. Wihlborg, A. K.; Wang, L.; Braun, O. O.; Eyjolfsson, A.; Gustafsson, R.; Gudbjartsson, T.; Erlinge, D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, 24, 1810.
7. Mamedova, L. K.; Gao, Z. G.; Jacobson, K. A. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72, 1031.
8. Gachet, C. *Thromb. Haemost.* **2008**, 99, 466.
9. Savi, P.; Pereillio, J. M.; Uzabiaga, M. F.; Combalbert, J.; Picard, C.; Maffrand, J.-P.; Pascal, M.; Herbert, J. M. *Thromb. Haemost.* **2000**, 84, 891.
10. Savi, P.; Zacharyus, J. L.; Delesque-Touchard, N.; Labouret, C.; Hervè, C.; Uzabiaga, M. F.; Pereillo, J. M.; Culouscou, J.M.; Bono, F.; Ferrara, P.; Herbert, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 11069.
11. Algaier, I.; Jakubowski, J. A.; Asai, F.; Von Kügelgen, I. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, 6, 1908.
12. Ingalls, A. H.; Dixon, J.; Bailey, A.; Coombs, M. E.; Cox, D.; McNally, J. I.; Hunt, S. F.; Kindon, N. D.; Teobald, B. J.; Willis, P. A.; Humphries, R. G.; Leff, P.; Clegg, J. A.; Smith, J. A.; Tomlinson, W. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 213.
13. Van Giezen, J. J. J.; Humphries, R. G. *Sem. Thromb. Hemost.* **2005**, 31, 195.
14. Nogard, NB. *Expert Opin Investig drugs* **2009**, 18 (8) 1219.
15. Cattaneo, M.; In *Platelets*; Michelson, A. D.; Ed.; Academic Press: San Diego, CA, **2006**, 1127.
16. Springthorpe, B.; Bailey, A.; Barton, P.; Birkinshaw, T. N.; Bonnert, R. V.; Brown, R. C.; Chapman, D.; Dixon, J.; Guile, S. D.; Humphries, R. G.; Hunt, S.

- F.; Ince, F.; Ingall, A. H.; Kirk, I. P.; et al *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 6013.
17. Wallentin, L.; Becker, RC.; Budaj, A.; Cannon, CP.; Emanuelsson, H.; Held, C.; Horrow, J.; Husted, S.; James, S.; Katus, H.; Mahaffey, KW.; Scirica, BM.; Skene, A.; Steg, PG.; Storey, RF.; Harrington, RA.; PLATO Investigators, Freij, A.; Thorsén, M.; *N Engl J Med.* **2009**, 361 (11), 1045.
18. Baqi, Y.; Atzler, K.; Köse, M.; Glänzel, M.; Müller, C., E.; *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (12), 3784.
19. Cristalli, G.; Podda, G., M., Costanzi, S.; Lambertucci, C.; Lecchi, A.; Vittori, S.; Volpini, R.; Zighetti, M., L.; Cattaneo, M. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2763.
20. Crepaldi, P.; Cacciari, B.; Bonache, M.C.; Spalluto, G.; Varani, K.; Borea, P. A.; Von Kügelgen, I.; Hoffmann, K.; Pugliano, M.; Razzari, C.; Cattaneo, M.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 4612.
21. Schenone, S.; Bruno, O.; Bondavalli, F.; Ranise, A.; Mosti, L.; Menozzi, G.; Fossa, P.; Manetti, F.; Morbidelli, L.; Trincavelli, L.; Martini, C.; Lucacchini, A.; *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 39, 153.
22. Cosimelli, B.; Greco, G.; Ehlaro, M.; Novellino, E.; Da Settimo, F.; Taliani, S.; La Motta, C.; Bellandi, M.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A.; Ciampi, O.; Trincavelli, M. L.; Martini, C. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (6) 1764.

www.farmacovigilanza.org

www.aifa.it

www.ministerodellasalute.it